



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ADRIANA PEDROSA MOURA

**O PAPEL DOS METABÓLITOS DA VIA 5-LIPOXIGENASE
NA REMODELAÇÃO ÓSSEA INDUZIDA POR FORÇA
MECÂNICA**

Belo Horizonte

2013

Adriana Pedrosa Moura

**O PAPEL DOS METABÓLITOS DA VIA 5-LIPOXIGENASE
NA REMODELAÇÃO ÓSSEA INDUZIDA POR FORÇA
MECÂNICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Tarcília Aparecida da Silva
Departamento de Clínica, Patologia e
Cirurgia Odontológicas – Faculdade
Odontologia/UFMG

Co-orientador: Prof. Mauro Martins Teixeira
Departamento de Bioquímica e
Imunologia- Instituto de Ciências
Biológicas/UFMG

Prof. Ildeu Andrade Júnior
Departamento de Odontologia –
Pontifícia Universidade Católica de
Minas Gerais.

Belo Horizonte

2013

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunofarmacologia (Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB/UFMG), Laboratório de Patologia Bucal (Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológica – Faculdade de Odontologia/UFMG), no Laboratório de Interação Microrganismo-Hospedeiro (Departamento de Microbiologia – ICB/UFMG) e no Laboratório de Osteoimunologia (Departamento de Ciências Biológicas – Faculdade de Odontologia de Bauru/USP).

Apoio Financeiro: FAPEMIG, CNPq e CAPES

AGRADECIMENTOS

Uma tese de doutorado não se faz sem ajuda e essa é uma oportunidade para homenagear aqueles que me permitiram construí-la.

À minha orientadora, Profa. Dra. Tarcília Aparecida da Silva, por ser um exemplo de profissionalismo, seriedade e dedicação. Agradeço eternamente as correções, discussões acadêmicas e orientações. Sem dúvida, aprendi e aprendo muito com seu exemplo.

Ao Dr. Ildeu Andrade, pela atenção, disponibilidade e por ter me incentivado a prosseguir essa linha de pesquisa.

Ao professor Mauro, por ter compartilhado seus conhecimentos, suas contribuições foram essenciais na elaboração dos artigos. Além disso, por ter cedido seu laboratório e os meios para a execução deste projeto.

Ao Celso, meu querido amigo, por ter sido meu braço direito. Agradeço toda sua ajuda na elaboração, realização e análise dos experimentos e resultados obtidos ao longo do meu doutorado. Agradeço por sua alegria, companhia e disponibilidade. Você é essencial!

À Mila, pelo auxílio em toda a parte experimental *in vitro*. Admiro muito sua competência, profissionalismo e dedicação. Muito obrigada por sempre ter uma resposta para minhas dúvidas.

À Letícia, minha filhinha, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos desse doutorado. Por seu sorriso, por sua amizade e carinho. Jamais esquecerei sua contribuição e apoio para realização na parte experimental.

À Soraia, pela amizade. Por ter me acolhido em sua família e por ter sido sempre um ombro amigo ao longo desses anos.

À Silvana, por ter me incentivado a seguir essa linha de pesquisa. Além disso, sua contribuição foi inestimável para a realização dos artigos aqui apresentados, muito obrigada!

Aos meus queridos amigos do dental club, obrigada pelo carinho. Me orgulho de fazer parte desse grupo e só tenho a agradecer a todos vocês.

Aos professores da pós-graduação em Biologia Celular por terem contribuído para minha formação acadêmica.

Aos demais professores e colaboradores, pela contribuição essencial para a construção dessa tese.

À minha família, que desde início acreditou em mim e apoiou minha decisão de aceitar este desafio. Em especial aos meus pais Claudia e Artur por terem me ensinado a importância do estudo e terem proporcionado a mim a melhor educação possível. Serei

eternamente grata ao amor verdadeiro, atenção e cuidado que têm por mim hoje e sempre. A Flá, minha irmã por sua amizade verdadeira, pelo carinho e apoio. Aos meus avós, por serem exemplos de vida, luta, conquista, sucesso e amor. Aos meus avós paternos, Manoel e Noélia, por serem essenciais na minha formação profissional e pessoal. Aos avós maternos, Zé e Teita, pelo carinho, incentivo e alegria. São todos estes pilares da minha formação e razão da minha existência e sucesso. A eles agradeço eternamente proporcionado um aprendizado de grande inestimável.

Ao Bernardo, por ter compreendido os desafios que atravessei este ano. Por ter me apoiado e colaborado para minimizar os problemas enfrentados e por ter tornado essa jornada um pouco mais leve. Obrigada pela paciência, sem você teria sido impossível.

Aos meus sogros, por terem me acolhido como uma filha, me orientando e, por vezes, acalmado, principalmente neste último ano.

RESUMO

A aplicação de força mecânica sobre o tecido ósseo resulta em remodelação, caracterizada pela reabsorção e deposição óssea em sítios específicos. Esses processos são regulados pela liberação de mediadores inflamatórios, dentre esses os metabólitos derivados do ácido araquidônico (AA). O AA, quando metabolizado pela via 5 lipoxigenase (5-LO) resulta na formação de leucotrieno B₄ (LTB₄) e cisteinil leucotrienos (CysLTs). Esses metabólitos têm sido amplamente estudados na resposta inflamatória e, mais recentemente, na remodelação óssea. Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram: (i) desenvolver um modelo de remodelação óssea associada à movimentação dentária ortodôntica induzida por força mecânica; (ii) investigar o papel dos metabólitos da via 5-LO no processo de remodelação óssea, bem como no recrutamento e diferenciação de osteoclastos. Inicialmente, para definição da força mecânica ideal, camundongos C57BL/6 foram submetidos a uma força de intensidade entre 0,1 N e 0,5 N. A força ideal obtida, 0,35 N, foi aplicada nos demais grupos experimentais: C57BL/6 ou SV129 (*Wild Type*-WT); animais deficientes da enzima 5-LO (5-LO^{-/-}), ou tratados com veículo (VH), zileuton (ZN) (inibidor da 5-LO) e montelucaste (MT) (antagonista do receptor de CysLTs). A quantidade movimentação dentária e o número de osteoclastos foram avaliados histomorfometricamente. A expressão de marcadores de remodelação óssea e citocinas foi avaliada em sítios de compressão e tensão do periodonto. O efeito dos metabólitos da via 5-LO na diferenciação de osteoclastos, bem como na expressão de TNF- α foi avaliada *in vitro* após estímulo de células RAW 264.7 com LTB₄ e LTD₄. A força de 0,35 N promoveu movimentação dentária e recrutamento de osteoclastos sem induzir reabsorção radicular. A movimentação dentária e o número de osteoclastos estavam diminuídos na ausência ou inibição da enzima 5-LO e do receptor de CysLTs em comparação com os grupos WT e VH, respectivamente. Foi observada uma expressão diferenciada de citocinas e marcadores de remodelação óssea nos sítios de tensão e compressão. Catepsina K e o TNF- α tiveram maior expressão nos sítios de compressão, enquanto OCN e RUNX2 no sítio de tensão. A expressão das moléculas TNF- α , IL-10, RUNX2 e RANK estava diminuída nos grupos 5-LO^{-/-} e MT em relação ao WT e ao VH, respectivamente. No grupo ZN a expressão reduzida de TNF- α , IL-10 e RUNX2 foi observada em relação ao grupo VH. *In vitro*, LTB₄ promoveu aumento da diferenciação de osteoclastos, enquanto LTB₄ e LTD₄ induziram a liberação de TNF- α . Nossos resultados demonstram a contribuição dos metabólitos da via 5-LO, LTB₄ e CysLTs, no processo de remodelação óssea por afetarem diretamente o recrutamento e diferenciação de osteoclastos.

ABSTRACT

Bone remodeling, induced by mechanical force, results in bone resorption and bone deposition in specific sites and is regulated by the release of inflammatory mediators, among those, arachidonic acid (AA). AA, can be metabolized by 5-lipoxygenase (5-LO) pathway resulting in leukotriene B₄ (LTB₄) and cysteinyl leukotriene (CysLTs) formation. This metabolites of this pathway have long been studied in inflammatory response and, more recently, in bone remodeling. Thus, the aims of this study were i) develop a bone remodeling model during tooth movement induced by mechanical loading. ii) Investigate the role of 5-LO metabolites in bone remodeling and in osteoclast differentiation and recruitment. First, for ideal mechanical force definition for this model, C57BL/6 mice were submitted to orthodontic forces ranging from 0.1 N to 0.5 N. The ideal orthodontic force, 0.35 N, was used in the following groups: C57BL/6 or SV 129 (Wild Type-WT); 5-LO *knockout* (5-LO^{-/-}) or treated with vehicle (VH), zileuton (ZN) (5-LO inhibitor) and montelukast (MT) (antagonist of the receptor of CysLTs). The amount of tooth movement and osteoclast numbers were evaluated histomorphometrically. Cytokine and bone remodeling expression was evaluated in compression and tension strains of the periodontium. The effect of 5-LO metabolites in osteoclast differentiation and also in TNF- α release were evaluated in vitro in RAW 264.7 cells stimulated with LTB₄ and LTD₄. The 0.35 N force promoted tooth movement and osteoclast recruitment without root resorption. Tooth movement and osteoclast numbers were diminished in the absence or inhibition of 5-LO and treatment with CysLTs (MT) comparing to the respective WT and VH groups. It was observed the differential expression of cytokine and bone remodeling markers in tension and compression sites. Cathepsin K and TNF- α were more expressed in compression site and OCN and RUNX2 in tension site. Moreover, TNF- α , IL-10, RUNX2 and RANK expression diminished in 5-LO^{-/-} and MT groups comparing to WT and VH, respectively. Also, TNF- α , IL-10 and RUNX2, were diminished in ZN group compared to its VH. In vitro experiment demonstrated that LTB₄ promoted more osteoclast differentiation than control and LTB₄ and LTD₄ increased TNF- α release. Our results demonstrated the 5-LO metabolites, LTB₄ and CysLTs, contribution to osteoclast recruitment and differentiation and consequently bone remodeling.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-LO – 5 lipoxigenase

5-LO^{-/-} - *Knockout* para 5-LO

AA – Ácido araquidônico

ANOVA – Análise de variância

C – Compressão

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CT – Cycle threshold

c-DNA – DNA complementar

CATK – Catepsina K

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CysLTs– Cisteinil leucotrienos

COX – Cicloxigenase

DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco

FAPEMIG –Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FBS – Soro fetal bovino

G - Gramas

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IL-10 – Interleucina 10

INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial

JAC – Junção Amelo-Cementária

LPS – Lipopolissacarídeo

LT – Leucotrienos

LTA₄ – Leucotrieno A4

LTB₄ – Leucotrieno B4

LTC₄ – Leucotrieno C4

LTD₄ – Leucotrieno D4

LTE₄ – Leucotrieno E4

M-CSF – Fator Estimulador de Colônia de Macrófago

ME – Maxila lado esquerdo- controle

MD – Maxila lado direito com aparelho ortodôntico

MMP – Metaloproteinase da Matriz

MT – montelucaste

N- Newton

Ni-Ti – Níquel e Titânio

OCN – Osteocalcina

OPG – Osteoprotegerina

RANK – Receptor Ativador de NF-kappa-B

RANKL – Ligante do Receptor ativador de NF-kappa-B

RGD – Arginina - Glicina - Ácido aspártico

RT-PCR –Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

RUNX2 – *Runt-related transcription factor 2*

RUNX2^{-/-} - knockout para RUNX2

Rpm – Rotações por minuto

T – Tensão

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa

TRAP – Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VH – Veículo

WT – *Wild-type* / selvagem

ZN – zileuton

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Remodelação óssea	12
2.2 Células ósseas	12
2.2.1 Osteoclastos	13
2.2.1 Osteoblastos	15
2.3 Movimentação ortodôntica	16
2.4 Metabólitos do ácido araquidônico	17
3 JUSTIFICATIVA	21
4 OBJETIVOS	22
4.1 Gerais:	22
4.2 Específicos:	22
5 MATERIAL E MÉTODOS	23
5.1 Delineamento Experimental	23
5.2 Protocolo experimental	23
5.2.1 Instalação do aparelho ortodôntico	24
5.2.2 Protocolo do tratamento com zileuton	26
5.2.3 Protocolo do tratamento com Motelucaste	26
5.3 Processamento histológico	27
5.4 Análise histomorfométrica	28
5.4.1 Contagem do Número de Células TRAP- positivas	28
5.4.2 Mensuração da movimentação dentária	28
5.5 Medida dos Níveis de Citocinas e Marcadores de Osteoclastos e Osteoblastos	28
5.5.1 qPCR	28
5.6 Cultura de osteoclastos	30
5.6.1 ELISA	31
5.7 Análise Estatística	31
6 RESULTADOS	32
6.1 Artigo científico I	33

6.2 Artigo científico II.....	40
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
7.1 Desenvolvimento do modelo de remodelação óssea induzido por força ortodôntica..	65
7.2 O papel dos metabólitos da via 5-LO na remodelação.....	67
8 CONCLUSÕES	73
9 PERSPECTIVAS.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXO A.....	83
ANEXO B.....	89

1 INTRODUÇÃO

A descoberta dos leucotrienos (LTs) há mais de trinta anos abriu um amplo e promissor campo de pesquisa básica, principalmente com relação à resposta inflamatória (BORGEAT *et al.*, 1976; FUNK; CHEN, 2000). Nas décadas seguintes inúmeros estudos descreveram a cascata de produção dos LTs com identificação de enzimas responsáveis por cada etapa (CHEN *et al.*, 1994; FUNK *et al.*, 1996; FUNK, 2001). A 5-lipoxigenase (5-LO) foi identificada como uma das principais enzimas da via lipoxigenase e passou a ser amplamente estudada, pois sua inibição ou bloqueio impede a formação de todas as classes de LTs. (FUNK, 2001; WERZ; STEINHILBER, 2006).

Uma vez identificada a relevância da via 5-LO, foram realizados estudos utilizando camundongos *knockout* para 5-LO (5-LO^{-/-}) e fármacos inibidores dessa enzima (CHEN *et al.*, 1994; FUNK *et al.*, 1996; FUNK; CHEN, 2000; WERZ; STEINHILBER, 2005). Estas ferramentas permitiram significativo avanço para o entendimento do papel desses metabólitos em diferentes doenças inflamatórias como artrite reumatóide e asma (WERZ; STEINHILBER, 2005).

Embora os metabólitos da via 5-LO tenham sido identificados como importantes mediadores do processo inflamatório, as relações entre esses e a remodelação óssea, precisam ser estabelecidas. Estudos mais recentes apontam a influência destes metabólitos em doenças inflamatórias associadas a reabsorção óssea como na artrite reumatóide, periodontite e osteoartrite (HIKIJ *et al.*, 2008; LASCELLES *et al.*, 2009; MATHIS *et al.*, 2010; GATTI *et al.*, 2011; SANCHEZ *et al.*, 2013).

A necessidade de compreensão do papel dos metabólitos da via 5-LO na remodelação óssea, bem como a necessidade de estabelecimento de um modelo padronizado de remodelação óssea induzida por força mecânica foram os pontos de partida para o desenvolvimento deste trabalho.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Remodelação óssea

O osso é um tecido dinâmico que sofre remodelação fisiológica constante para manutenção sua integridade estrutural e homeostase mineral (BOYCE; XING, 2008; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010; BOYCE *et al.*, 2012). Essa característica do tecido ósseo permite sua adaptação frente a alterações de carga mecânica, necessidades minerais, crescimento e reparo de fraturas (BOYLE *et al.*, 2003; BOYCE *et al.*, 2012). Além disso, a renovação constante proporciona uma maior resistência à fadiga por estresse e repara pequenas microfraturas no tecido (RAGGATT; PARTRIDGE, 2010; BOYCE *et al.*, 2012).

Embora todos os ossos sejam capazes de sofrer remodelação, esse processo pode ser mais rápido em alguns sítios como no osso alveolar. O osso alveolar está presente tanto na mandíbula quanto na maxila e, conjuntamente com o ligamento periodontal e cemento, constitui o sistema de ancoragem do dente no alvéolo (SODEK; MCKNEE, 2000). A alta capacidade deste osso de sofrer reabsorção/deposição possibilita a erupção dentária, movimentação fisiológica dos dentes durante o crescimento dos maxilares e a movimentação dentária induzida por aparelho ortodôntico (MELSEN, 1999; SODEK; MCKNEE, 2000). A formação óssea local também garante a osteointegração de implantes e é importante na regeneração tecidual após infecções periodontais (SODEK; MCKNEE, 2000).

A remodelação óssea é controlada por fatores sistêmicos e locais (ROBERTS; HUJA; ROBERTS, 2004; BOYCE; XING, 2008). Alguns hormônios, como o paratormônio, estrógeno, glicocorticóides e a vitamina D₃, dentre outros, controlam a atividade de osteoclastos e osteoblastos (ROBERTS; HUJA; ROBERTS, 2004). Além disso, fatores locais como citocinas e fatores de crescimento também participam do controle da atividade dessas células (SODEK; MCKNEE, 2000; KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006). Desta forma, qualquer desequilíbrio na liberação de hormônios ou de fatores locais pode resultar em doenças ósseas (BOYCE *et al.*, 2012).

2.2 Células ósseas

A remodelação óssea é possível pela ação coordenada de osteoclastos e osteoblastos, responsáveis respectivamente pela reabsorção e deposição óssea.

2.2.1 Osteoclastos

Os osteoclastos são células multinucleadas com capacidade reabsortiva, originários de precursores, da linhagem monocítica fagocítica, presentes na medula óssea (BOYLE *et al.*, 2003; BOYCE; XING, 2008; BOYCE *et al.*, 2012). O recrutamento e a diferenciação desses precursores são regulados por diversos fatores, tais como citocinas (BOYLE *et al.*, 2003; BOYCE *et al.*, 2012).

Os fatores que contribuem para o recrutamento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos em osteoclastos vêm sendo amplamente estudados nas últimas décadas (SUDA *et al.*, 1999; BOYLE *et al.*, 2003; ANDRADE JR *et al.*, 2007; TADDEI *et al.*, 2012). Inicialmente, observou-se que osteoclastos podem ser formados a partir de células indiferenciadas da medula óssea ou baço quando cultivadas em co-cultura com osteoblastos (TAKADASHI *et al.*, 1988). Estudos como esse indicaram que alguns fatores derivados de osteoblastos, são necessários na osteoclastogênese (TAKADASHI *et al.*, 1988; SUDA *et al.*, 1999; BOYLE *et al.*, 2003). A descoberta do sistema do receptor ativador do NF- kappa B (RANK), de seu ligante (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) foi um dos principais avanços nesta área, pois demonstrou de forma definitiva o papel dos osteoblastos na osteoclastogênese (SIMONET *et al.*, 1997; YASUDA *et al.*, 1998). Sendo assim, o RANK é o receptor expresso na superfície de osteoclastos e também de seus progenitores, enquanto que RANKL é seu ligante, que pode ser expresso na membrana de osteoblastos e células T ativadas ou secretado por estas células (KOHSLA, 2001; BOYLE *et al.*, 2003). No entanto, mais recentemente, estudos apontam para o papel chave os osteócitos na produção de RANKL durante a remodelação óssea induzida por força mecânica (NAKASHIMA; TAKAYANAGI, 2011; XIONG *et al.*, 2011). OPG é um receptor *decoy* que inibe a ligação RANK/RANKL e pode ser produzido por células B, cardíacas, renais, do pâncreas, do fígado e por osteoblastos (KOHSLA, 2001; BOYLE *et al.*, 2003). Na remodelação óssea, durante a movimentação ortodôntica, células do ligamento periodontal expressam RANKL e secretam OPG, desta forma, regulando a diferenciação de osteoclastos (KASANKI *et al.*, 2001). Sendo assim, a ligação do RANKL no receptor RANK desencadeia a diferenciação e ativação de osteoclastos (KOHSLA, 2001; BOYLE *et al.*, 2003; YAMASHITA; TAKAHASHI; UDAGAWA, 2012).

A ligação RANK/RANKL resulta da expressão, em pré-osteoclastos, de genes que codificam para a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), catepsina K (CATK), receptor de calcitonina e da integrina $\alpha\beta3$, típicas de osteoclastos, caracterizando assim a diferenciação da célula (LANCEY *et al.*, 1998; BOYLE *et al.*, 2003). O osteoclasto

multinucleado adere a matriz óssea pela ligação da integrina $\alpha\beta3$, da membrana celular, com radicais peptídicos com a sequência arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) presentes na matriz óssea. A célula em diferenciação reorganiza seu citoesqueleto e cria junções oclusivas compartimentando e isolando a área a ser reabsorvida (BOYCE; XING, 2008). Nessa área a matriz inorgânica é degradada pela ação de íons ácidos, H^+ e Cl^- , e a orgânica por enzimas líticas como metaloproteinases (MMP), CATK e TRAP, liberados a partir da borda em escova do osteoclasto (DELAISSÉ *et al.*, 2000). A CATK é uma das principais enzimas proteolíticas liberadas, responsáveis pela degradação de colágeno tipo I, e, conjuntamente com a TRAP, são considerados marcadores de atividade de osteoclastos (LOGAR *et al.*, 2007). A matriz degradada é endocitada pelo osteoclasto e posteriormente liberada na circulação (BOYLE *et al.*, 2003).

O sistema RANK-RANKL/OPG é uma das principais vias de diferenciação dos osteoclastos, contudo, estudos demonstraram a contribuição de diferentes mediadores na osteoclastogênese (LAM *et al.*, 2000; KOBAYASHI *et al.*, 2000; JIANG *et al.*, 2005; BRAUN; SCHEET, 2012). Dentre esses fatores, cabe destacar o fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF) que em conjunto com RANKL é capaz de induzir a formação de osteoclastos maduros (BOYCE; XING, 2008). O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), uma citocina pró-inflamatória, pode induzir a diferenciação de osteoclastos por um mecanismo tanto dependente quanto independente da liberação de RANKL por osteoblastos (HOFBAUER *et al.*, 1999; AZUMA *et al.*, 2000; LAM *et al.*, 2000; KOBAYASHI *et al.*, 2000). Estudos empregando camundongos *knock out* para o receptor de TNF- α demonstraram menor quantidade de células TRAP⁺ após aplicação de força mecânica nesses camundongos quando comparados com animais selvagens (YOSHIMATZO *et al.*, 2006; ANDRADE JR *et al.*, 2007). Contudo, em outro estudo, utilizando metodologia distinta, não foi detectada a expressão de TNF- α no periodonto submetido a forças de compressão durante movimentação ortodôntica (ALHASHIMI *et al.*, 2001).

A osteoclastogênese também pode ser modulada por citocinas anti-inflamatórias como a Interleucina-10 (IL-10). Em co-culturas de células de medula óssea e osteoblastos primários a adição de IL-10 foi capaz de impedir a diferenciação destas células em osteoclastos, de maneira dose-dependente (HONG *et al.*, 2000). A adição de IL-10 à cultura de células do folículo dentário resultou na maior expressão de OPG e menor de RANKL e M-CSF. (LIU; YAO; WISE, 2006). Os resultados obtidos nos permitem inferir que a maior expressão de IL-10, durante a erupção dentária, reduz a osteoclastogênese (LIU; YAO; WISE, 2006). Como esperado, camundongos *knock out* para IL-10 possuem fenótipo osteoporótico comprovando a

importância dessa citocina na remodelação óssea (DRESNER–POLLAK *et al.*, 2004). Além disso, estes mesmos animais também apresentam significativa perda óssea alveolar e expressão diminuída de marcadores de osteócitos e osteoblastos nos tecidos periodontais (osso alveolar, tecido gengival, ligamento periodontal e cimento) (CLAUDINO *et al.*, 2010).

Existem ainda evidências que outras moléculas inflamatórias, como os leucotrienos, participam do processo de recrutamento e diferenciação de pré-osteoclastos. A influência destas moléculas na osteoclastogênese será discutida nas próximas sessões. Entretanto, a participação exata e a interação de todos os mediadores que coordenam a osteoclastogênese ainda precisa ser melhor compreendida visando interferências terapêuticas mais seletivas no processo.

2.2.1 Osteoblastos

Os osteoblastos têm origem mesenquimal e se organizam ao longo da superfície endosteal e periosteal. A origem do osteoblasto é comum a outros tipos celulares como adipócitos, mioblastos, células do estroma e condroblastos (LERNER, 2012). A diferenciação dessas células em osteoblastos é controlada por fatores de transcrição tais como *Runt-related transcription fator 2* (RUNX2) (THIRUNAVUKKARASU *et al.*, 2000; YAMAGUSHI *et al.*, 2000). A ausência da formação óssea em camundongos *knockout* para (RUNX2^{-/-}) e de osteoclastos comprova a importância desse fator tanto na osteoblastogênese quanto na osteoclastogênese (KOMORI *et al.*, 1997; BANIWAL *et al.*, 2012). Um possível mecanismo de ação do RUNX2, na osteoclastogênese, é via controle da expressão de RANKL (THIRUNAVUKKARASU *et al.*, 2000; ENOMOTO *et al.*, 2003). Foi observado que nos camundongos RUNX2^{-/-} tanto OPG quanto M-CSF estavam expressos em níveis normais, contudo, a expressão de RANKL estava diminuída (ENOMOTO *et al.*, 2003).

No final do processo de diferenciação, os osteoblastos passam a secretar osteocalcina (OCN), uma proteína não-colagênica (NEVE; CORRADO; CANTATORE, 2012). O nível sérico dessa proteína pode ser utilizado como um marcador de formação óssea por apresentar boa correlação com o aumento da deposição de matriz (DELMAS *et al.*, 1990; CANTATORE *et al.*, 2004).

2.3 Movimentação ortodôntica

A movimentação ortodôntica é um processo complexo que envolve a transdução de um estímulo mecânico em resposta biológica, resultando em remodelação do tecido ósseo alveolar (HENNEMAN; VON DEN HOFF; MALTHA, 2008; DAVIDOVITCH, 2009). A remodelação óssea é dependente da ação coordenada de osteoclastos e osteoblastos (KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006; BOYCE; XING, 2008; BOYCE *et al.*, 2012).

Estudos prévios demonstram que a movimentação ortodôntica pode ser dividida basicamente em três fases: fase inicial, fase platô e fase pós-platô (KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006). Após a aplicação da força, ocorre uma pequena movimentação dentária imediata. A seguir, há um período sem movimentação aparente, com intensa atividade metabólica que é sucedida por uma retomada da movimentação dentária (KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006). Esse ciclo se repete até a nova ativação do aparelho ortodôntico.

Na primeira fase, logo após a aplicação de uma força mecânica, surgem duas áreas distintas no ligamento periodontal: área de pressão decorrente da compressão provocada pela movimentação inicial do dente no alvéolo e a área de tensão com o estiramento das fibras do ligamento periodontal (CATTANEO; DALTRA; MELSEN, 2005). Esta alteração na região do ligamento periodontal desencadeia uma resposta inflamatória aguda com a liberação de mediadores químicos, tais como: fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e metabólitos do ácido araquidônico (DAVIDOVITCH, 1988; KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006). Estes fatores podem atuar conjuntamente para promover o recrutamento e diferenciação de osteoclastos e osteoblastos para sítios de compressão e tensão, respectivamente (KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006).

A estagnação da movimentação ortodôntica, característica da segunda fase, é resultado da presença de tecidos necróticos na região do ligamento periodontal (KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006). Isto ocorre porque a aplicação de uma força mecânica, mesmo em quantidade adequada, promove uma redução do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, o surgimento de uma pequena área hialinizada nos sítios de compressão. Este tecido deve ser removido através da ação de macrófagos e osteoclastos recrutados de regiões adjacentes (NAKAMURA *et al.*, 2001; KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006). Ainda no sítio de compressão, a ação de osteoclastos multinucleados TRAP⁺ é essencial para reabsorção óssea (ROBERTS; HUJA; ROBERTS, 2004). Nos sítios de tensão, osteoblastos são estimulados a

secretar osteóide enquanto células-tronco são recrutadas para se diferenciarem em osteoblastos (MASSELLA; MEISTER, 2006). As últimas fases da movimentação ortodôntica são marcadas pela deposição óssea e multiplicação de fibroblastos para reconstituir a matriz nos sítios de tensão. Contudo, a irregularidade das fibras colágenas e da superfície óssea alveolar ainda pode ser observada em sítios de compressão (KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006).

2.4 Metabólitos do ácido araquidônico

Na primeira fase da movimentação dentária, como já descrito, é desencadeada uma inflamação aguda na região periodontal. Células inflamatórias, principalmente leucócitos, migram para a região alveolar desencadeando uma cascata de liberação de mediadores inflamatórios, dentre estes, metabólitos do ácido araquidônico (KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006; BROOKS *et al.*, 2009; LERNER, 2012).

O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo essencial presente na membrana celular. Sua liberação, como já citado, pode ocorrer ainda nas primeiras fases da movimentação ortodôntica, pois depende de estímulos como: a alteração do fluxo sanguíneo, trauma mecânico, ação de citocinas específicas e fatores de crescimento (FUNK, 2001; KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006).

Uma vez liberado, o AA pode ser metabolizado por diferentes vias (FIG.1). Dentre estas, cabe destacar três: a via da cicloxigenase (COX), cuja ação resulta na produção de prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina (WANG; DUBOIS, 2010); a via da 15-lipoxigenase, que origina as lipoxinas e a via da lipoxigenase. A via da lipoxigenase tem como enzima chave a 5-LO e sua ação sobre o AA resulta na formação de LTs (COLLET; STEWART, 1991; FUNK, 2001; HIKIJI *et al.*, 2008).

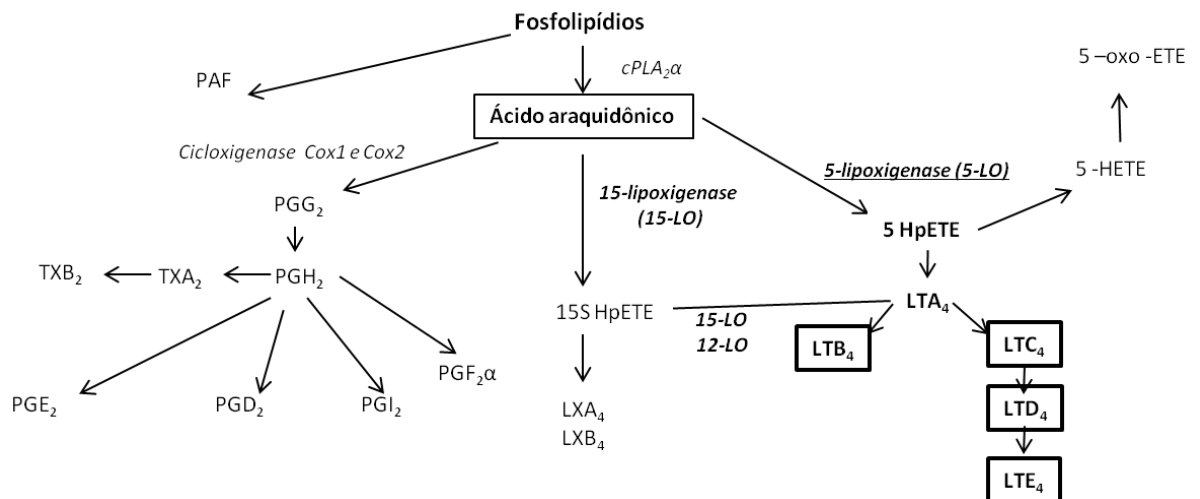


Figura 1: Vias de metabolização do ácido araquidônico.

Os leucotrienos podem ser classificados em cisteinil leucotrienos (leucotrienos C₄, D₄ e E₄), (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) e leucotrieno B₄ (LTB₄) (HAEGGSTRÖM; WETTERHOLM, 2002). A divisão destes dois grupos ocorre após a formação do leucotrieno A₄ (LTA₄), intermediário altamente instável, que pode sofrer hidrólise enzimática em LTB₄ ou ser conjugado com glutamina dando origem ao LTC₄ e subsequentemente LTE₄ (HAEGGSTRÖM; WETTERHOLM, 2002). Diversos tipos celulares, predominantemente células inflamatórias, possuem sistema enzimático para a síntese e liberação de leucotrienos (COLLET; STEWART, 1991; FUNK; CHEN, 2000; FUNK, 2001). Os cisteinil leucotrienos (CysLTs) são sintetizados principalmente por basófilos, mastócitos e eosinófilos, enquanto que macrófagos e neutrófilos geram principalmente LTB₄ (FUNK; CHEN, 2000; FUNK, 2001). A descoberta que células ósseas possuem tal sistema enzimático e, portanto, produzem LTs suscitou interesse acerca do papel destes mediadores sobre a remodelação óssea (COLLET; STEWART, 1991; HIKIJI *et al.*, 2009).

Uma vez demonstrada a produção de leucotrienos por células ósseas, estudos subsequentes, realizados *in vitro* e *in vivo*, têm buscado elucidar o efeito dos LTs sobre o tecido ósseo. Um dos primeiros estudos *in vitro* sobre o papel deste metabólito demonstrou que os LTs estimulam a reabsorção óssea em cultura obtida de calvária de camundongos neonatos (MEGHJI *et al.*, 1988). Estudos *in vitro* posteriores, utilizando células isoladas de medula óssea de aves, confirmaram este resultado, indicando que metabólitos da via 5-LO estimulam osteoclastos a reabsorver osso *in vitro* (GALLAWITZ *et al.*, 1993) e a reabsorver matrizes calcificadas, à medida que, aumentam a expressão de TRAP (FLYNN *et al.*, 1999).

A administração de LTB₄ na calvária de camundongos *in vivo* aumenta a reabsorção óssea por induzir o aumento na formação de osteoclastos (GARCIA *et al.*, 1996a). Os CysLTs, tais como LTC₄, LTD₄ e LTE₄, *in vitro* têm efeito semelhante pois estimulam a formação de lacunas de reabsorção e o aumentam a expressão de TRAP (GARCIA *et al.*, 1996b). Além disso, foi demonstrado que animais *knockout* para 5-LO possuem maior espessura da cortical óssea e menor perda óssea após ovariectomia, quando comparados a animais selvagens (BONEWALD *et al.*, 1997a; BONEWALD *et al.*, 1997b).

Níveis de LTB₄ estão aumentados em doenças inflamatórias associadas à reabsorção óssea, como a periodontite (PRADEEP *et al.*, 2007), osteomielite pós traumática (KLOSTERHALFEN *et al.*, 1996) e artrite reumatóide (GURSEL *et al.*, 1997). O aumento da expressão de LTB₄ nessas doenças está relacionado a quimiotaxia de neutrófilos para o sítio de inflamação. Em outras doenças, como asma, o aumento de CysLTs promove o extravasamento de plasma em vênulas pós-capilares e a secreção de muco (DIAMANT; SAMPSON, 1999; FUNK; CHEN, 2000).

Evidências recentes apontam ainda o efeito dos LTs na patofisiologia de doenças inflamatórias agudas e crônicas como a doença de Bowel, psoríase e asma (CUZZOCREA *et al.*, 2005). Apesar do proeminente papel destes mediadores em doenças crônicas, apenas alguns fármacos estão disponíveis comercialmente (WERZ; STEINHILBER, 2006). Dentre estes, o zileuton (Zyflo[®]), fármaco inibidor da via 5-LO ou antagonistas dos receptores para CysLTs, como o montelucaste (Singulair[®]) e o Zafirlucaste (Accolate[®]) (GARCIA-MARCOS; SCHUSTER, 1999). Estes fármacos são amplamente utilizados para o tratamento da asma e possuem pequeno efeito sobre outras doenças inflamatórias como colite, doença de Bowel e artrite reumatóide. (WEINBLATT, 1992; WERZ; STEINHILBER, 2005; WERZ; STEINHILBER, 2006). O zileuton é o único inibidor da 5-LO liberado para utilização em humanos, contudo, não é comercializado no Brasil (WERZ; STEINHILBER, 2006).

Os LTs são mediadores presentes no processo inflamatório, contudo, não está completamente elucidada a relação destes mediadores com citocinas pró e anti-inflamatórias. Por exemplo, na resposta inflamatória associada à artrite reumatóide, demonstrou-se que o TNF- α , participa da quimioatração de neutrófilos produtores de LTB₄ (CHEN *et al.*, 2006). Em estudos *in vivo* a aplicação intravenosa de TNF- α estimula a síntese de leucotrienos e o LTB₄ também aumenta a expressão desta citocina em cultura de fibroblastos sinoviais retirados de pacientes com artrite reumatóide (HUBER *et al.*, 1988; XU *et al.*, 2010). O tratamento com montelucaste é capaz de reverter o decréscimo na expressão de IL-10 no lavado broncoalveolar em modelo de asma (WU *et al.*, 2006). Sendo assim, possui efeito

benéfico, pois o aumento da IL-10 está relacionado a menor severidade da doença (BORISH *et al.*, 1996; WOSZCZEK *et al.*, 2008). Dessa forma, moléculas pró-inflamatórias podem estimular a expressão de LTs e fármacos antagonistas dos receptores de CysLTs podem aumentar a expressão de IL-10. Contudo, o efeito dos LTs sobre a expressão dessas moléculas precisa ser melhor compreendida.

Além da indicação clínica comprovada dos antileucotrienos em doenças inflamatórias e alérgicas, alguns inibidores, não comercialmente disponíveis, foram testados em modelos de reabsorção óssea. Em um modelo de remodelação óssea em ratos, foi observada uma diminuição do número de osteoclastos e de células TRAP⁺ após o tratamento com o inibidor BWA4C (FRANCHI-MILLER; SAFFAR, 1995). A utilização de outro inibidor da 5-LO, AA861, se mostrou eficiente na redução da produção de LTB₄ e promoveu uma menor movimentação ortodôntica (MOHAMMED *et al.*, 1989). Apesar do AA861 e BWA4C terem apresentado efeito na remodelação óssea *in vivo*, sua utilização em humanos fica contraindicada pela severidade dos seus efeitos colaterais (FORD-HUTCHINSON; GRESSER; YOUNG, 1994; WERZ; STEINHILBER, 2006). No entanto, o montelucaste, disponível no mercado brasileiro, utilizado no controle de asma e alergia, é bem tolerado e pode apresentar efeitos adversos brandos como cefaléia e dor abdominal (DIAMANT; SAMPSON, 1999; LEE *et al.*, 2012). De forma semelhante, os pacientes em tratamento com zileuton podem apresentar efeitos adversos leves como: tosse, dor de cabeça, febre, náusea, fraqueza e dor (CORNERSTONE THERAPEUTIC inc, 2013).

Embora existam evidências do possível papel destes medicamentos na remodelação óssea, o efeito dos fármacos comercialmente disponíveis como o montelucaste e o zileuton não foi ainda testado em modelos de remodelação óssea.

3 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, importantes avanços no campo da biologia óssea foram feitos e nos permitiram compreender melhor os mecanismos envolvidos no recrutamento e diferenciação de osteoclastos. A inflamação tem sido descrita como um importante fator associado à perda óssea, pois a liberação de mediadores inflamatórios, citocinas e quimiocinas pode influenciar a diferenciação e atividade de células ósseas.

No intuito de investigar os fatores envolvidos com a remodelação óssea, foi aperfeiçoado um modelo de movimentação dentária induzido por força mecânica. Neste modelo, com uma força padronizada, foi possível gerar áreas de tensão e compressão no ligamento periodontal e assim, desencadear a reabsorção e deposição óssea em sítios específicos.

O entendimento do papel de diferentes moléculas na remodelação óssea pode auxiliar no desenvolvimento de fármacos específicos para o tratamento de doenças inflamatórias associadas à reabsorção óssea como periodontite e artrite reumatóide. Este conhecimento pode ainda contribuir para a redução de efeitos colaterais e otimização da técnica de movimentação dentária ortodôntica.

4 OBJETIVOS

4.1 Gerais:

1. Desenvolver um modelo de remodelação óssea induzida por força mecânica em camundongos;
2. Investigar o papel dos metabólitos da via 5-LO na remodelação óssea induzida por força mecânica.

4.2 Específicos:

1. Determinar a força ideal para movimentação dentária induzida por força mecânica em modelo experimental em camundongos;
2. Avaliar a influência dos leucotrienos (LTB₄ e CysLTs) no recrutamento de osteoclastos e na remodelação óssea induzida por força mecânica;
3. Determinar a expressão de marcadores de remodelação óssea e citocinas nos sítios de compressão e tensão do ligamento periodontal; bem como a influência dos metabólitos da via 5-LO na expressão destes marcadores;
4. Avaliar o efeito *in vitro* de LTB₄ e LTD₄ na diferenciação de células RAW 264.7 em osteoclastos e na liberação de TNF- α por estas células.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Delineamento Experimental

Inicialmente foram utilizados camundongos C57BL/6 para a determinação e padronização da força ideal para este modelo. Esses camundongos foram sacrificados após 6 dias para análise histomorfométrica. A expressão de citocinas e marcadores de remodelação óssea, no periodonto, foi analisada por *quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR) nos tempos 0, 12 e 72 horas. Sendo que no grupo 0 hora não houve colocação do aparelho.

Em segundo momento, foram utilizados camundongos: Selvagens C57BL/6 ou SV129 (WT), e *knockout* para 5-LO (5-LO^{-/-}), tratados com veículo (VH), zileuton (ZN) e montelucaste (MT). Os camundongos foram sacrificados após 6 e 12 dias de movimentação ortodôntica para análise histomorfométrica. O nível citocinas e marcadores de remodelação óssea foram analisados no periodonto, por qPCR, após 72 horas.

Além disso, foram realizados experimentos *in vitro* com células RAW 264.7 para análise da influência dos metabólitos da via 5-LO sobre a diferenciação de osteoclastos. A expressão de TNF- α foi avaliada por ELISA no sobrenadante destas culturas após 24 horas.

5.2 Protocolo experimental

Os animais foram mantidos, durante todo período experimental, em gaiolas plásticas com dieta pastosa e água sob o ciclo de 12 horas claro e escuro. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de ética no uso animal (CEUA) (ANEXO A)

Foram empregados animais de aproximadamente 10 semanas e peso médio de 25 g. Nesta idade os animais já tinham atingido a maturidade sexual e peso máximo corporal, monitorado durante o período experimental. Como critérios de inclusão foram considerados os seguintes aspectos: ausência de irritações ou inflamações na cavidade oral, permanência do aparelho nos elementos dentários até o final do tratamento e perda de peso inferior a 20%.

5.2.1 Instalação do aparelho ortodôntico

Os camundongos foram anestesiados por injeção intraperitoneal de 0,2 mL/25 g de peso corporal, de uma solução contendo xilazina (0,02 mg/mL), ketamina (50 mg/mL) e solução salina em uma proporção de 1: 0,5: 3, respectivamente. Uma vez anestesiados, os animais foram colocados com o dorso sob a mesa cirúrgica, especialmente desenhada para restringir movimentos e permitir o acesso intra-oral (FIG.2). Foi utilizado também um afastador confeccionado com fio de aço para afastar a mucosa do camundongo, um 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), com o intuito de possibilitar melhor visualização dos molares superiores.

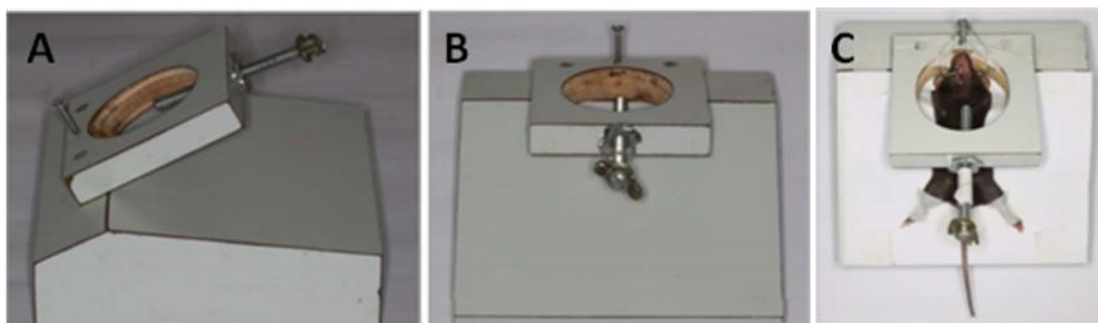


Figura 2: mesa cirúrgica.

(A) vista lateral da mesa cirúrgica. (B) vista superior. (C) Animal posicionado e imobilizado na mesa cirúrgica.

A superfície oclusal do primeiro molar superior do lado direito e os incisivos foi limpa com acetona por 10 segundos e posteriormente um selante auto-condicionante (*self-etching primer*, Unitek/3M, Mineapolis, MN, EUA) foi aplicado (FIG.3A). A porção distal/posterior de uma 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 (FIG.3B). A colagem da mola foi realizada com resina fotopolimerizável (Transbond, Uniteck/3M). A porção anterior/mesial da mola foi ativada no sentido mesial e fixada com a mesma resina nos incisivos (FIG.3C).

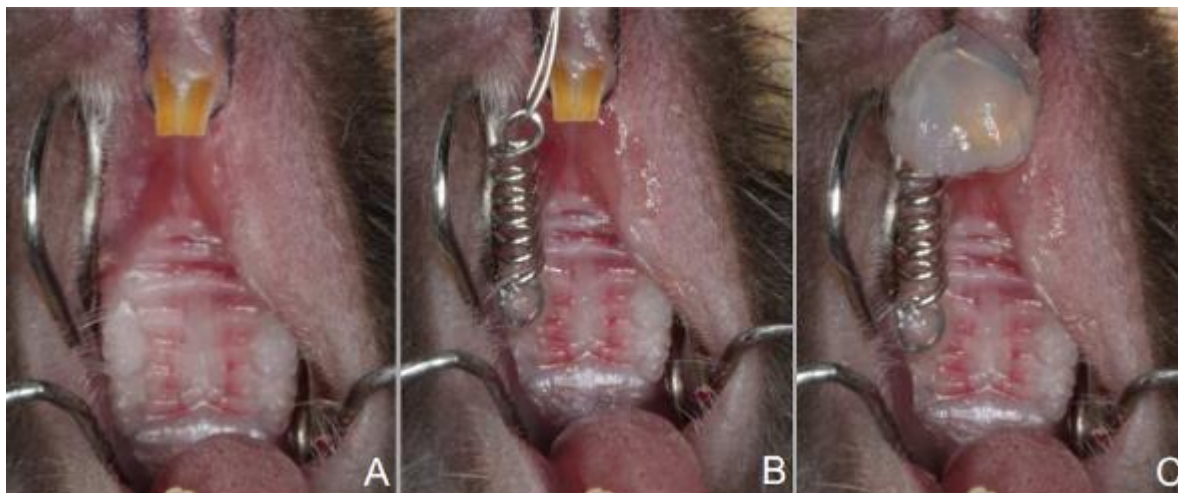


Figura 3: Colocação da mola

(A) Vista oclusal da maxila. (B) Vista oclusal da maxila com apenas a extremidade distal/posterior da mola aberta de Ni-Ti fixada na superfície oclusal do primeiro molar superior do lado direito, sem ativação. (C) Vista oclusal da maxila com mola ativada e posicionada entre o primeiro molar superior direito e os incisivos superiores.

Foi preconizada a força de 0,35 N para ativação da mola. Para a mensuração desta força foi utilizado um dinamômetro (Shimpo Corp., Tóquio, JHS, Japão), fixado sobre uma plataforma (FIG. 4). Esta plataforma possui em uma extremidade uma manivela e na extremidade oposta o dinamômetro fixado sobre uma torre (FIG.4A). A utilização desta plataforma tem o objetivo de impedir a interferência de fatores como vibração e calor transmitidos a partir do contato com as mãos do operador. Um fio 0,8 mm de espessura e 4 cm de comprimento (Morelli Ortodontia, Sorocaba, SP, Brasil) foi utilizado para conectar a extremidade mesial/ anterior da mola ao gancho do dinamômetro (FIG.4C). Para a ativação da mola, a manivela da plataforma pode ser girada movimentando assim a mesa cirúrgica para até registrar no dinamômetro a força desejada. Após isto, a mola foi fixada nos incisivos (FIG. 4D).

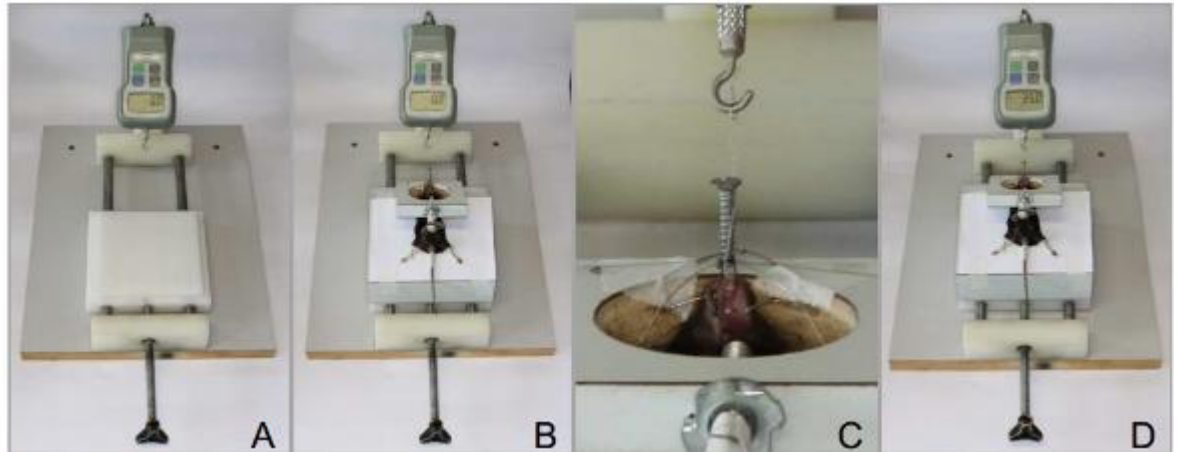


Figura 4: Ativação da mola

(A) Plataforma de ativação da mola ortodôntica com o dinamômetro fixado. (B) Plataforma de ativação da mola ortodôntica com a mesa cirúrgica em posição. (C) Fio de aço posicionado entre a extremidade mesial/anterior da mola e o gancho de medição do dinamômetro. (D) Dinamômetro marcando 0,35 N de ativação da mola ortodôntica.

5.2.2 Protocolo do tratamento com zileuton

Os animais do grupo zileuton (Zyflo[®], Cornerstone Therapeutics Inc, Cary, NC, EUA) receberam dose de 30 mg/kg/dia diluída em veículo carboximetil a 0,5%. A droga foi administrada via oral por gavagem. Os animais receberam o tratamento com a droga por 6 ou 12 dias de acordo com o protocolo de eutanásia do grupo. Os animais do grupo tratado com veículo receberam apenas carboximetil a 0,5%, também administrado por gavagem, por 6 ou 12 dias de acordo com o protocolo de eutanásia do grupo.

5.2.3 Protocolo do tratamento com Motelucaste

Os animais do grupo montelucaste (Singulair[®], Merck Sharp and Dohme, Hoddesdon, HRT, Reino Unido) receberam dose de 2 mg/kg/dia diluída em água potável. O tratamento foi realizado via oral por gavagem. Os animais receberam o tratamento com a droga por 6 ou 12 dias de acordo com o protocolo de eutanásia do grupo. Os animais do grupo tratado com veículo receberam apenas água potável, também administrado por gavagem, por 6 ou 12 dias de acordo com o protocolo de eutanásia do grupo.

5.3 Processamento histológico

Para o processamento histológico, o maxilar superior dos animais foi dissecado. O material foi imediatamente imerso em solução contendo formalina tamponada a 10% (pH 7,2) por 48 horas para a fixação. Em seguida, foi iniciado o processo de desmineralização. As amostras foram, então, mantidas em uma solução de EDTA 14% (pH 7.4) durante um período de 21 dias. A troca da solução foi realizada a cada 48 horas. Após esse período, as amostras foram lavadas por 4 horas com água corrente.

Para a obtenção de seções longitudinais, 2 cortes foram realizados nas maxilas com auxílio de uma lâmina de bisturi e um estereomicroscópio (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil). Inicialmente foi feito um corte na região anterior para a liberação e descarte dos incisivos. Em seguida, foi realizado um corte transversal na região do palato. Para efeitos de padronização do corte, todos os cortes foram realizados a 1 mm da superfície palatal da coroa dos molares e paralelos a uma linha imaginária que passa pelo centro da superfície oclusal molares. Todas as amostras eram compostas de três molares.

Como parte do processamento, foi realizada a desidratação do material utilizando-se banhos em álcool, 70%, 80%, 90% e absoluto durante 30 minutos cada. Em seguida as amostras foram clarificadas através de 3 banhos de xilol de 20, 15 e 10 minutos utilizando o processador de Tecido Mono 2000, (Lupe Indústria e Comércio Ltda, São Carlos, SP, Brasil). Em seguida foi realizada a inclusão em parafina. A superfície palatina foi posicionada sempre para baixo, ou seja, voltada para o plano da microtomia. Uma vez incluídas, o bloco foi cortado com espessura de 5 µm utilizando-se um micrótomo rotatório (Leica Jung, Histocut 820, Wetzlar, Hessen Alemanha).

Os cortes foram colocados em lâmina e selecionados para coloração. Como critérios de inclusão para análise histológica, foram selecionadas lâminas com cortes sem artefatos, apresentando ao menos 1/3 de formação da raiz disto-vestibular do primeiro molar e mesio-vestibular do segundo molar superior. As lâminas foram coradas com TRAP (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) e contra coradas com hematoxilina (Sigma-Aldrich,).

5.4 Análise histomorfométrica

5.4.1 Contagem do Número de Células TRAP-positivas

Os osteoclastos foram identificados como células multinucleadas TRAP⁺ presentes em lacunas ósseas do osso mesial da raiz distovestibular do primeiro molar superior. A contagem foi realizada com a objetiva de aumento de 40x com o microscópio Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Niedersachsen, Alemanha). Foi feita a contagem em cinco cortes representativos por animal, e em três campos microscópicos consecutivos por corte. O número total de osteoclastos, por corte, foi obtido somando-se todos os três campos. Posteriormente este valor foi dividido pelo número total de cortes analisados. Dessa forma, era obtido um valor final de osteoclastos por camundongo.

5.4.2 Mensuração da movimentação dentária

Para a mensuração da movimentação dentária, as lâminas foram fotografadas com um microscópio Axioskop 40 (Carl Zeiss) conectado a uma câmera digital (PowerShot A620, Canon, Tóquio, Honshu, Japão). A quantidade de movimentação dentária foi calculada a partir da diferença entre a distância da junção amelo-cementária (JAC) do primeiro e segundo molares do lado experimental (hemi-maxila direita) em relação ao lado controle (hemi-maxila esquerda) do mesmo animal empregando-se *software Image J* (Research Service Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MA, EUA). A mensuração foi realizada avaliando-se 5 cortes por animal e a menor distância obtida foi considerada a distância amelocementária deste camundongo

5.5 Medida dos níveis de citocinas e marcadores de osteoclastos e osteoblastos

5.5.1 qPCR

O ligamento periodontal e o osso alveolar foram extraídos da região do primeiro molar superior com a ajuda de um estereomicroscópio. Todo o tecido gengival, mucosa oral e dentes foram descartados. O tecido periodontal e o osso alveolar que foi extraído da área distal da raiz distovestibular do primeiro molar superior foi considerado lado de tensão. A área mesial

em relação à mesma raiz foi considerada lado de compressão. Foi então utilizado um reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) seguido pela homogeneização em vortex. A amostra foi mantida por cinco minutos à temperatura ambiente. Para cada 1 mL da suspensão foi adicionado 200 µL de clorofórmio, em seguida as amostras foram centrifugadas a 1300 rpm durante 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, ao qual foi adicionado 500 µL de isopropanol, agitado em vortex e incubado por 20 minutos a -20°C para precipitação do RNA. Os tubos foram centrifugados a 1300 rpm durante 15 minutos a 4°C e o precipitado foi lavado em etanol 100%. Os tubos foram novamente centrifugados a 1300 rpm durante 15 minutos a 4°C e o precipitado lavado em etanol 100%. Os tubos foram novamente centrifugados a 1300 rpm durante 15 minutos a 4°C, invertidos sobre papel de filtro e o precipitado suspenso em água deionizada. Alíquotas de cada amostra foram diluídas em água deionizada para quantificação do RNA.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA através de uma reação de transcriptase reversa. A análise quantitativa da expressão de RNA mensageiro foi realizada utilizando do ABI Prism 5700 *Sequence Detection System* utilizando o sistema de fluorescência SYBR-green (Applied Biosystems, Warrington, UK) para a quantificação dos produtos de amplificação. As condições de reação de PCR foram de: 95°C (10 minutos), seguidas por 40 ciclos de 94°C (1 minuto), 65°C, (1 minuto), e 72°C (2 minutos), seguidas por uma curva padrão de desnaturação. As condições de reação de PCR para cada gene de interesse foram otimizadas com relação à concentração de primers, ausência da formação de dímeros e eficiência da amplificação do gene alvo. SYBR Green PCR Master Mix, 400 nM dos primers específicos e 2,5 ng de cDNA foram utilizados em cada reação. O limiar para determinação da positividade da reação foi determinado baseado em controles negativos (ausência de SYBR-green, ausência de amostra, ausência de primer, e amostra contendo apenas água). O cálculo para determinação do nível relativo de expressão do gene de interesse foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, utilizando como referência a expressão de β -actina na mesma amostra, utilizando-se do método do “ciclo limiar” (cycle threshold - Ct). A média dos valores de Ct obtidas de duplicatas foi utilizada para o cálculo do nível de expressão gênica, normalizado pela β -actina e comparado aos valores do gene alvo de uma amostra controle para o cálculo do aumento relativo de expressão, através da fórmula $2^{-\Delta Ct}$. A Sequência de *primers* empregados e as propriedades da reação estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Sequencia de *primes* utilizados e propriedades da reação

<i>Target</i>	<i>Sense and anti-sense sequences</i>	At (°C)	Mt (°C)	Bp
RANKL	CAGAAGATGGCACTCACTGCA CACCATCGCTTTCTCTGCTCT	65	73	203
RANK	CAAACCTTGGACCAACTGCAC GCAGACCACATCTGATTCCGT	60	84	76
RUNX2	AACCACAGAACCACAAGTGCG AAATGACTCGGTTGGTCTCGG	58	80	119
OPG	GGAACCCAGAGCGAAATACA CCTGAAGAATGCCTCCTCACA	57	77	225
OCN	AAGCCTTCATGTCCAAGCAGG TTTGTAGGCGGTCTTCAAGCC	60	78	170
IL-10	AGATC TCCGAGATGC CTTCA CCGTGGAGCAGGTGAAGAAT	58	85	307
Catepsina K	CTCCCTCTCGATCCTACAGTAATGA TCAGAGTCAATGCCTCCGTTC	58	80	307
MMP13	AGAGATGCGTGGAGAGTCGAA AAGGTTTGGAATCTGCCAGG	65	85	162
TNF- α	AAGCCTGTAGCCCATGTTGT CAGATAGATGGGCTCATACC	59	79	330
B-actina	ATGTTTGAGACCTTCAACA CACGTCAGACTTCATGATGG	56	95	495

5.6 Cultura de osteoclastos

A linhagem celular monócitos/macrófagos RAW 264.7, adquirida do American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EUA), foi cultivada em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, GIBCO, Invitrogen) contendo penicilina (40 U/ml) e gentamicina (40 U/ml) e suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB), inativado por calor. As células foram cultivadas em atmosfera úmida contendo 5% CO₂ a 37°C. Para a diferenciação de osteoclastos, 1 x 10⁴ células/poço foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro com 13 mm de diâmetro e estimuladas por 48 horas com 50 ng/ml de RANKL

(PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, EUA). Em seguida, as células foram estimuladas com LTB₄ 10⁻⁷ M ou LTD₄ 10⁻⁷ M (Sigma-Aldrich, MO, EUA) 30 minutos antes da adição de novo meio contendo 50 ng/ml de RANKL (PeproTech Inc.) e cultivadas por mais 48 horas. Após este período, o meio foi trocado a cada 48 horas e 10 dias após o estímulo inicial as células foram coradas para TRAP (Acid Phosphatase, Leukocyte (TRAP) Kit, Sigma-Aldrich, USA), segundo instruções do fabricante. O número de células TRAP⁺ foi obtido pela contagem do número de células positivas por campo, em cada lamínula (n=3).

5.6.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Os níveis de TNF- α foram determinados por ELISA utilizando kits comerciais (Duo-Set, R&D Systems, Minneapolis MN, EUA) seguindo-se as instruções do fabricante. O limite de detecção do kit foi de 31.2 – 2,000 pg/mL. Para os ensaios, 100 uL do sobrenadante da cultura foram coletados 24 horas após o 2º estímulo com RANKL, e estocados a -20°C. O sobrenadante foi diluído 1:3 em solução de extração de citocina. Os resultados foram expressos em picogramas/mL.

5.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm SEM (Erro padrão da média). As comparações entre os grupos foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls. O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0, 05$.

6 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na forma de dois artigos científicos apresentados em sequencia e um depósito de patente (apresentado como Anexo A).

O primeiro artigo “*Experimental model of tooth movement in mice: a standardized protocol for studying bone remodeling under compression and tensile strains*” publicado no periódico *Journal of Biomechanics*.

O segundo artigo “*Leukotrienes affect mechanical loading-induced bone remodeling by stimulating osteoclast differentiation*” em fase de preparação para submissão.

6.1 Artigo científico I

Journal of Biomechanics 45 (2012) 2729–2735



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Biomechanics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jbiomech
www.JBiomech.com



Experimental model of tooth movement in mice: A standardized protocol for studying bone remodeling under compression and tensile strains

Silvana Rodrigues de Albuquerque Taddei^{a,d,1}, Adriana Pedrosa Moura^{a,d,1}, Ildeu Andrade Jr.^b, Gustavo Pompermaier Garlet^c, Thiago Pompermaier Garlet^c, Mauro Martins Teixeira^d, Tarcília Aparecida da Silva^{a,d,*}

^a Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^b Department of Orthodontics, School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^c Department of Biological Sciences, School of Dentistry of Bauru, São Paulo University, Bauru, São Paulo, Brazil

^d Laboratory of Immunopharmacology, Department of Biochemistry and Immunology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Accepted 7 September 2012

Keywords:
Orthodontic tooth movement
Bone remodeling
Cytokines
Proteolytic enzymes

ABSTRACT

During orthodontic tooth movement (OTM), alveolar bone is resorbed by osteoclasts in compression sites (CS) and is deposited by osteoblasts in tension sites (TS). The aim of this study was to develop a standardized OTM protocol in mice and to investigate the expression of bone resorption and deposition markers in CS and TS. An orthodontic appliance was placed in C57BL6/J mice. To define the ideal orthodontic force, the molars of the mice were subjected to forces of 0.1 N, 0.25 N, 0.35 N and 0.5 N. The expression of mediators that are involved in bone remodeling at CS and TS was analyzed using a Real-Time PCR. The data revealed that a force of 0.35 N promoted optimal OTM and osteoclast recruitment without root resorption. The levels of TNF- α , RANKL, MMP13 and OPG were all altered in CS and TS. Whereas TNF- α and Cathepsin K exhibited elevated levels in CS, RUNX2 and OCN levels were higher in TS. Our results suggest that 0.35 N is the ideal force for OTM in mice and has no side effects. Moreover, the expression of bone remodeling markers differed between the compression and the tension areas, potentially explaining the distinct cellular migration and differentiation patterns in each of these sites.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Bone remodeling is essential for bone turnover and occurs principally as a result of osteoclast and osteoblast activity (Riancho and Delgado-Calle, 2011; Tanaka et al., 2005). The coordinated action of these two cell types leads to bone resorption and deposition, in response to stress and mechanical loading (Hadjidakis and Androulakis, 2006).

Models of orthodontic tooth movement (OTM) are effective for the study of mechanical loading-induced bone remodeling (Verna et al., 2004). Different animal models (e.g., rats, dogs, monkeys and mice) have been described in recent decades (Ren et al., 2007). Nevertheless, the availability of murine *knock out* strains has encouraged the study of protein and receptor functions during OTM in these animals (Andrade Jr et al., 2007, 2009; Taddei et al.,

2012; Yoshimatsu et al., 2006). However, only a small number of studies have been performed in mice, and the methodologies that have been used for these analyses, including the amount of applied force, have varied (Andrade Jr et al., 2007; Brooks et al., 2009; Huang et al., 2009; Taddei et al., 2012; Yoshimatsu et al., 2006). The achievement of an optimal force is essential for obtaining the maximum rate of OTM without deleterious effects on the root, the PDL and the alveolar bone (Krishnan and Davidovitch, 2006; Ren et al., 2007). Moreover, a standardized methodology is important to allow the comparison of different studies.

There is a general agreement in the literature that the mechanical loading that is provided by an orthodontic appliance generates two different strains in the periodontal ligament (PDL): compression and tension. In compression site (CS), the force that is generated by the root against the alveolar bone induces bone resorption. In tension site (TS); however, PDL fibers are strained and bone tissue is deposited (Krishnan and Davidovitch, 2006; Masella and Meister, 2006). The alteration of PDL vascularity in combination with strain-induced mechanosensitivity promotes the release of several molecules, such as chemokines/cytokines, neurotransmitters, growth factors and arachidonic acid metabolites (Alhashimi et al., 1999; Davidovitch et al., 1988; Krishnan and

* Corresponding author at: Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Presidente Antônio Carlos 6627, Campus Pampulha CEP 30270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Tel.: +55 31 3499 2402; fax: +55 31 3399 2430.

E-mail address: silva.tarcilia@gmail.com (T.A. da Silva).

¹ Contributed equally to the work presented in this paper.

Davidovitch, 2006). The distinct expression of these mediators in CS and TS may be responsible for the specific pattern of cell migration and bone remodeling that is observed to occur following OTM (Cattaneo et al., 2005; Garlet et al., 2007; Masella and Meister, 2006).

The aim of this study was to develop a standardized OTM protocol in mice and to analyze the expression of bone remodeling markers in CS and TS.

2. Material and methods

2.1. Experimental animals

Ten-week-old C57BL6/J wild-type mice were used in this experiment. The ethical regulations of the Institutional Ethics Committee were followed for all of the treatments. No significant weight loss was observed in the mice.

2.2. Experimental protocol

The mice were anesthetized i.e. with 0.2 mL of a xylazine (0.02 mg/mL) and ketamine (50 mg/mL) solution. The mice were then placed in the dorsal decubitus position, with the 4 limbs affixed to a surgical table (Fig. 1a). To permit the full visualization of intra-oral structures, a mouth-opener (*m*) was developed for this experiment and was affixed to the surgical table with a 0.08 mm wire to inhibit any forward movement of the head (*w*) (Fig. 1b).

A stereomicroscope (Quimis Aparelhos Científicos Ltd, Diadema, São Paulo, Brazil) (*s*) and an optical light system (Multi-Position Fiber Optic Illuminator

System, Cole-Parmer Instrument Company Ltd., London, England) (*o*) were used to better visualize the intra-oral structures (Fig. 1c). The right first maxillary molar and incisors surface were cleaned using acetone and were etched using a self-etching primer (Unitek/3M, Minneapolis, USA). The distal end of an eight-loop, nickel-titanium open-coil spring 0.25×0.76 mm (Lancer Orthodontics, San Marcos, CA, USA) (*c*) (Fig. 1d) was bonded to the occlusal surface of the right first maxillary molar (*f*) using a light-cured resin (Transbond, Unitek/3 M, Monrovia, CA, USA) (Fig. 1d).

To activate the coil, the surgical table was attached to a specially designed apparatus that contained a rail (*r*) and a crank (*cr*) to allow the table to slide back and forth. A tension gauge (*t*) allowed for the measurement of the amount of delivered force (Fig. 1e). A 0.08 mm round wire was used to connect the anterior portion of the coil spring to the tension gauge (*h*) (Fig. 1e). Therefore, when the crank (*cr*) was activated, the surgical table slid along the rail (*r*) until the tensiometer registered the desired force (Fig. 1e). Next, the anterior portion of the coil was bonded to both of the upper incisors (Fig. 1f) to prevent their further eruption and anchorage loss (Beertsen et al., 1982). No reactivation was performed during the entire experimental period. The left side of the maxilla (without an orthodontic appliance) was used as a control.

The experiment was divided into two portions (1) to determine the optimal orthodontic force and (2) to determine the molecular profile in CS and TS following OTM in mice. First, 20 mice were divided into 4 groups, for which different levels of force were used (0.10 N, 0.25 N, 0.35 N and 0.50 N).

The mice were sacrificed after 0, 12 h, 72 h (for molecular analysis) or 6 days (for histopathological analysis). For each set of experiments, 5 animals were used at each time-point.

2.3. Histopathological analysis

As was previously described (Taddei et al., 2012), the right and the left maxillae halves were fixed in 10% buffered formalin (pH 7.4), decalcified in 14%

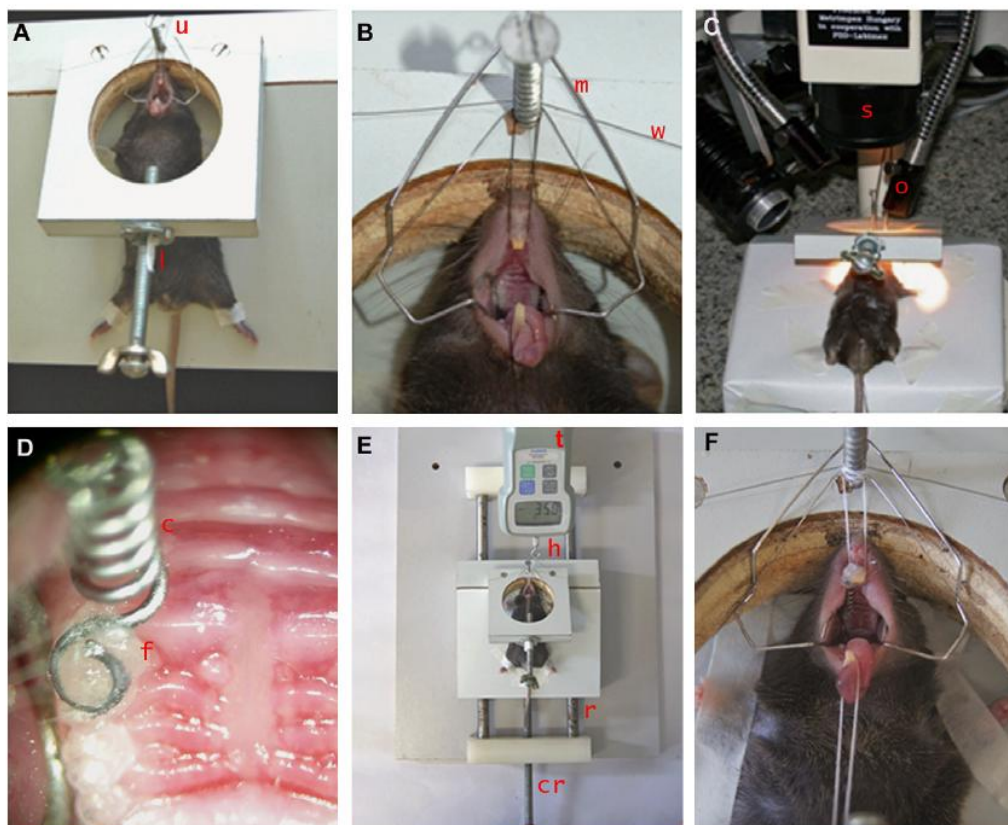


Fig. 1. (A) Mice positioned in the dorsal decubitus on the surgical table, developed to restrict animal movement and to permit intra-oral access. (B) Mouth-opener in position. (C) Surgical table placed under a stereomicroscope and a fiber optic lighting device. (D) Occlusal view of the maxillary molar region. Note the distal/posterior end of the Ni-Ti open coil spring bonded to the occlusal surface of the upper right first molar. (E) A tension gauge attached to the surgical table showing 0.35 N of mechanical loading. (F) The coil spring bonded to both upper incisors. Note the stainless steel wire positioned between the mesial/anterior end of the coil. Upper screw (*u*), lower screw (*l*), Wire (*w*), mouth-opener (*m*), stereomicroscope (*s*) optical fiber device (*o*), upper first molar (*f*), coil spring (*c*), tension gauge hook (*h*), rail (*r*), crank (*cr*) and tension gauge (*t*).

EDTA (pH 7.4) and paraffin-embedded. 5- μ m thick sagittal sections were stained for tartrate resistant acid phosphatase (TRAP; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), counterstained with hematoxylin and used for the histological examinations. The mesial periodontal site of the distal-buccal root of the first molar was used for the osteoclasts counts. Five sections were taken per animal. The osteoclasts were identified as TRAP-positive, multinucleated cells on the bone surface. The slides were evaluated by two examiners who were blinded to the group status.

2.4. Measurement of OTM

Images of the first and second molars were obtained using an optical microscope (Axioskop 40, Carl Zeiss, Göttingen, Germany) and an adapted digital camera (PowerShot A620, Canon, Tokyo, Honshu, Japan). Image J software (National Institutes of Health) was used to quantify the degree of OTM by measuring the distance between the cementum–enamel junction (CEJ) of the first molar and the second molar on the right hemi-maxilla in relation to the same measurements for the left hemi-maxilla. Five vertical sections per animal were evaluated, and three measurements were conducted for each evaluation.

2.5. RNA extraction and real-time PCR

The PDL and the surrounding alveolar bone were extracted from the upper first molars region using a stereomicroscope. All of the gingival tissue, oral mucosa and teeth were discarded. The periodontal tissues and the alveolar bone that was extracted from the distal area of the distal buccal root of the first maxillary molar were considered TS. The mesial area of the same root was considered CS. The CS and TS tissues were submitted to RNA extraction using TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Complementary DNA (cDNA) was synthesized using 2 μ g of RNA through a reverse transcription reaction (Superscript II, Invitrogen). Real-time PCR analysis was performed in a Mini Opticon (BioRad, Hercules, CA, USA) using a SYBR-green fluorescence quantification system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The standard PCR conditions were 95 °C (10 min) followed 40 cycles of 94 °C (1 min), 58 °C (1 min) and 72 °C (2 min). These cycles were followed by the standard denaturation curve. The primer sequences are listed in Table 1. The mean Ct values from duplicate measurements were used to calculate the expression levels of the target gene, with normalization to an internal control (β -actin) using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula.

2.6. Statistical analyses

The data were expressed as the mean \pm SEM. The comparison between the groups was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman–Keuls multiple comparison test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Definition of the optimal orthodontic force

The histological analysis revealed distal movement of the teeth in the control group, with TRAP activity observed on the distal alveolar bone and no activity observed on the mesial side of the distal-buccal root (Fig. 2c).

Following 6 days of mechanical loading, the experimental group exhibited a significant increase in TRAP activity and,

consequently, greater bone resorption on the mesial bone surface then was observed in the control group, (Fig. 2 e–j). The greatest degree of OTM and osteoclast recruitment was observed with 0.35 and 0.50 N of mechanical loading (Fig. 2a and b). However, significant root resorption was observed when 0.50 N was applied (Fig. 2i and j). Therefore, the results suggested that 0.35 N was the ideal force for this model, given that this magnitude promoted the maximum rate of OTM and relatively minor tissue damage.

3.2. Bone resorption markers are preferentially expressed in CS

Increased mRNA levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Fig. 3a), receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) (Fig. 3b), receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) (Fig. 3c) and metalloproteinase 13 (MMP-13) (Fig. 3e), were observed in both CS and TS compared to the control group. Cathepsin K expression was only significantly increased in the CS (Fig. 3d). Greater levels of TNF- α and Cathepsin K were observed in the CS than in the TS at both time points. However, increased levels were only observed at specific time-points for RANKL (at 12 h), MMP13 and RANK (both 72 h) (Fig. 3a–e).

3.3. Expression levels of both osteoblast markers and the bone resorption inhibitors were increased at TS

Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) (Fig. 4a) and osteocalcin (OCN) expression were only significantly augmented in TS (Fig. 4b). Moreover, IL-10 and OPG expression was increased in TS relative to CS after 72 and 12 h, respectively (Fig. 4c and d).

4. Discussion

This study proposed a standardized protocol to examine the cellular and molecular mechanisms of bone remodeling during OTM. This protocol allows for limited operator interference and, through a tension gauge and a specially designed apparatus, standardizes 0.35 N as the optimal force for OTM in a mouse model.

OTM models trigger bone remodeling by means of a mechanical loading that is applied to the teeth using a coil spring (Andrade Jr et al., 2009; Braga et al., 2011; Pavlin et al., 2000). The achievement of an optimal force is essential to promote an adequate biological response from periodontal tissues (Krishnan and Davidovitch, 2006). There is no agreement regarding the amount of optimal force for OTM in mice given that the applied force has varied between 0.10 and 0.35 N in previous works (Andrade Jr et al., 2007; Brooks et al., 2009; Huang, et al., 2009; Pavlin et al., 2000; Yoshimatsu et al., 2006). This range of force application is due to the use of different orthodontic appliances in these studies. The same diversity is also observed when a

Table 1
Primer sequences and reaction properties.

Target	Sense and anti-sense sequences	At (°C)	Mt (°C)	Bp
IL-10	AGATC TCCGAGATGC CTTCA CCGTGGAGCAGGTGAAGAAT	58	85	307
RUNX2	AACCACAGAACCACAAGTGGC AAATGACTCGGTGGTCTCTCGG	58	80	119
OCN	AAGCCTTCATGTCCAAGCAGG TTTGTAGGCGGTCTTCAAGCC	60	78	170
OPG	GGAAACCCAGAGCGAAATACA CCTGAAGAATGCTCCTCACA	57	77	225
RANKL	CAGAAGATGGCACTCACTGCA CACCATCGTTTCTCTCTCTCT	65	73	203
RANK	CAAACCTTGGACCAACTGCAC GCAGACCACATCTGATTCCTG	60	84	76
Cathepsin K	CTCCCTCTCGATCCTACAGTAATGA TCAGAGTCAATGGCCTCCGTTT	58	80	307
MMP13	AGAGATCGGTGGAGAGTGGAA AAGGTTTGAATCGCCAGG	65	85	162
TNF- α	AAGCCTGTAGCCATGTTGT CAGATAGATGGGCTCATAAC	59	79	330
β -actin	ATGTTTGAGACCTTCAACA CACGTCAAGCTTCATGATGG	56	75	495

At: annealing temperature; Mt: melting temperature; Bp: base pairs of amplicon size.

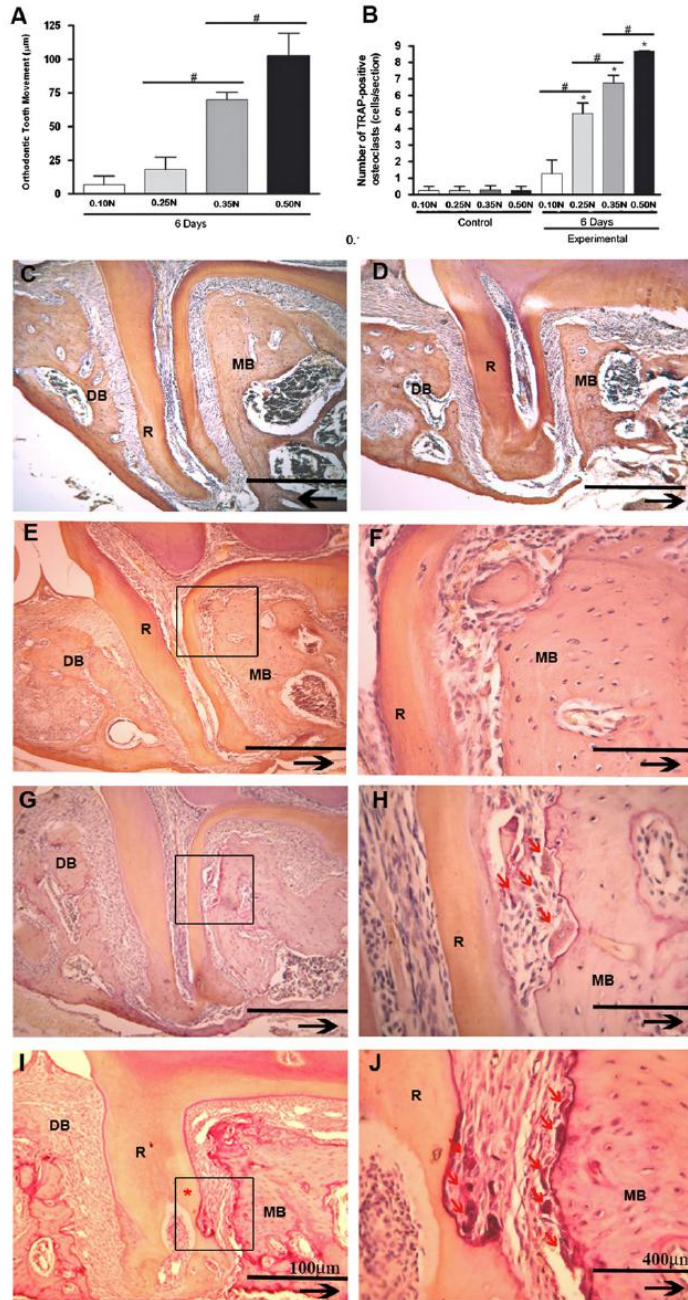


Fig. 2. (A) Amount of tooth movement in WT mice after 6 days of mechanical loading with 0.10 N, 0.25 N, 0.35 N and 0.50 N. (B) Number of TRAP-positive osteoclasts. (C–H) Histological changes related to OTM in WT mice (C) control group (without mechanical loading). (D) Experimental side with 0.10 N of orthodontic force (E) 0.25 N. (F) Magnified view of the identified area in (E). (G) 0.35 N. (H) Magnified view of the identified area in (G). (I) 0.50 N. (J) Magnified view of the identified area in (I). Small arrows indicate TRAP-positive osteoclasts. MB, mesial alveolar bone; DB, distal alveolar bone; R, root; *, root resorption area. Large arrows indicate the direction of tooth movement. Data are expressed as the mean \pm SEM. * $P < 0.05$ comparing the control group to the respective experimental group. $^{\#}P < 0.05$ comparing experimental groups. One-way ANOVA and Newman–Keuls multiple comparison test. Bar = 100 μ m.

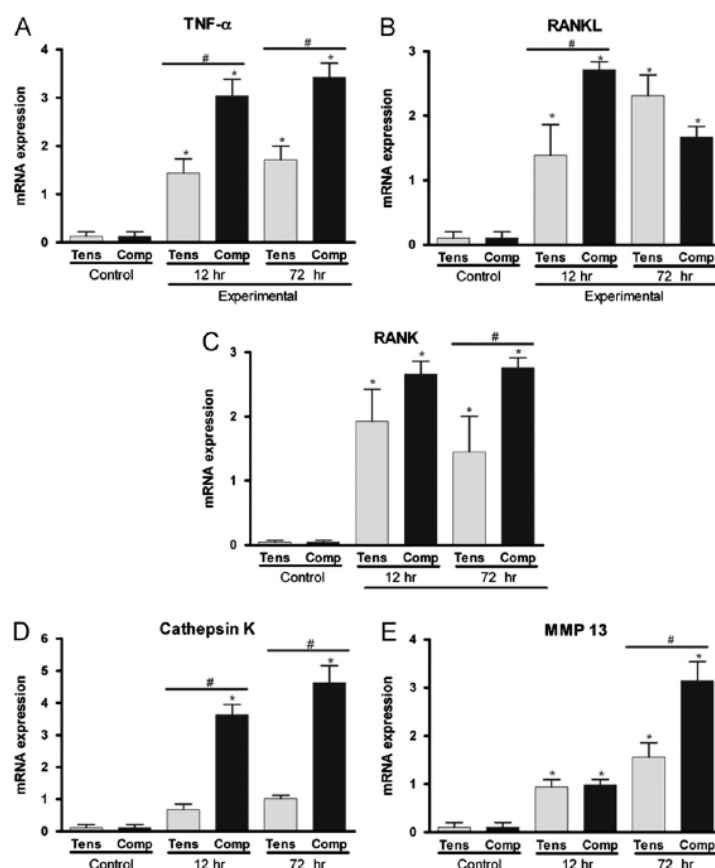


Fig. 3. mRNA expression of (A) TNF- α , RANKL (B), RANK (C), Cathepsin K (D) and MMP13 (E) in WT mice periodontium after 12 and 72 h of mechanical loading. Data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ comparing control to the respective experimental group. One-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test.

coil-spring is used given that there are different alloys and diameters of wire, which themselves can have different lengths (Andrade Jr et al., 2007; Brooks et al., 2009; Huang et al., 2009; Pavlin et al., 2000; Yoshimatsu et al., 2006).

The calibration of the delivered force is also extremely important for the reproducibility of experiments. For this reason, a surgical table was developed with an attached tension gauge to allow for the measurement of the desired force. This design abolished the possibility of any operator interference, such as hand vibrations or heating of the tension gauge. Several studies have proposed that the coil opens in a mesial direction, thus obtaining a specific extended length, resulting in a specific delivered force that is based on force/deflection rate of coil (Brooks et al., 2009; Pavlin et al., 2000). However, this approach may be influenced by undesirable movement from the manipulator's hand when bonding the coil, which alters the force. Notably, even when different coils stretch to the same length while activating, the original size of the coil also influences the amount of force that is delivered. For example, if the original size of wire is 2.88 mm (Ni-Ti 0.25 \times 0.76 mm) and the coil-spring is stretched up to 1 mm, the delivered force will be 40 g. However, this force can be 20 g if the original size of coil is 5.29 mm, as was demonstrated in our pilot study. Therefore, the protocol that is

described here used a standardized original size, wire diameter, alloy, length and diameter of the chosen coil.

Considering that OTM creates both TS and CS in the periodontium, protein expression, bone resorption and deposition markers were analyzed separately. The results of the present analysis confirmed a differential expression of marker for these processes, which allows for the creation of a positive microenvironment for bone resorption or deposition at specific sites. Higher expression levels of the cytokines TNF- α and RANKL and the bone resorption markers Cathepsin K and MMP13 were observed in CS relative to TS at both of the examined time-points. In agreement with these results, previous reports described elevated levels of TNF- α and RANKL in CS following mechanical loading (Brooks et al., 2009; Garlet et al., 2007; Nishijima, et al., 2006). Given that the RANKL/RANK axis and TNF- α participate in osteoclastogenesis by up-regulating osteoclast activity, it can be concluded that a more resorptive microenvironment was created in CS. Moreover, TNF- α is an apoptotic factor for osteoblasts and osteocytes (Suda et al., 2001; Yamashita et al., 2007; Yano et al., 2005). This cytokine may also be a signal for osteoclast recruitment and, consequently, bone resorption (Burger et al., 2003). Another important factor that is expressed in resorption sites is Cathepsin K because resorption itself depends on the secretion of this protease from

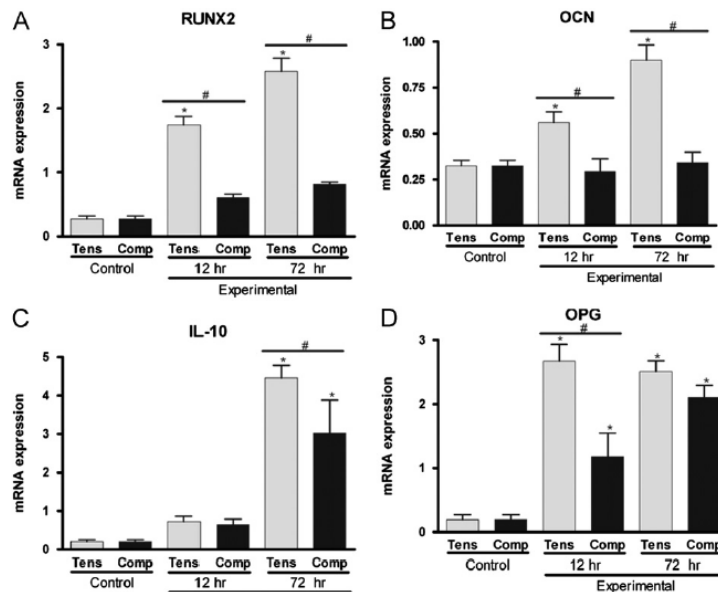


Fig. 4. mRNA expression of RUNX2 (A), OCN (B), IL-10 (C) and OPG (D) in WT periodontium after 12 and 72 h of mechanical loading. Data are expressed as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ comparing control group to the respective experimental group. One-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test.

osteoclasts (Troen, 2004). Together, these results point to a possible explanation for the higher osteoclast count and the consequent greater bone resorption in this area.

Our data revealed higher levels of OCN and RUNX2 (osteoblast differentiation markers) in TS compared to controls and CS. These results are in agreement with a previous study that also demonstrated higher OCN levels in TS than in CS (Garlet et al., 2008). This result may be due to the increased promotion of bone deposition in this area by mature osteoblasts.

In addition, we observed higher expression of IL-10 and OPG (negative regulators of osteoclasts) in TS compared to CS at different time-points. IL-10 may affect the development of osteoclast precursors by decreasing RANK calcium-dependent signaling (Park-Min et al., 2009). A previous study reported higher IL-10 expression in TS and associated this finding with reduced osteoclast activity and increased osteoblast activity in these sites (Garlet et al., 2007). In addition to IL-10, high OPG levels also decrease osteoclastogenesis via RANKL inhibition during induced mechanical stress (Kanzaki et al., 2004). Therefore, TS exhibited a differential expression pattern of anti-resorptive mediators that are known to be involved in bone formation.

5. Conclusions

This study developed of a standardized OTM protocol that controls the external variables that can influence the amount of force delivered. In this model, 0.35 N is the optimal force for OTM, with less-evident tissue damage than was observed for higher forces. CS and TS exhibit differential expression of mediators that are involved in bone remodeling. The observed increase in the levels of these mediators is essential for osteoclast and osteoblast function and differentiation and may account for increased bone resorption or deposition at specific sites.

Conflict of interest statement

We also affirm that this study is free of conflict of interest.

Acknowledgments

We are grateful to the Fundação de Amparo a Pesquisas do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) for financial support.

References

- Alhashimi, N., Frithiof, L., Brudvik, P., Bakht, M., 1999. Chemokines are upregulated during orthodontic tooth movement. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 19, 1047–1052.
- Andrade Jr, I., Silva, T.A., Silva, G.A., Teixeira, A.L., Teixeira, M.M., 2007. The role of tumor necrosis factor receptor type 1 in orthodontic tooth movement. *Journal of Dental Research* 86, 1089–1094.
- Andrade Jr, I., Taddei, S.R., Garlet, G.P., Garlet, T.P., Teixeira, A.L., Silva, T.A., Teixeira, M.M., 2009. CCR5 down-regulates osteoclast function in orthodontic tooth movement. *Journal of Dental Research* 88, 1037–1041.
- Beertsen, W., Everts, V., Niehof, A., Bruins, H., 1982. Loss of connective tissue attachment in the marginal periodontium of the mouse following blockage of eruption. *Journal of Periodontal Research* 17, 640–656.
- Braga, S.M., Taddei, S.R., Andrade Jr, I., Queiroz-Junior, C.M., Garlet, G.P., Repeke, C.E., Teixeira, M.M., da Silva, T.A., 2011. Effect of diabetes on orthodontic tooth movement in a mouse model. *European Journal of Oral Sciences* 119, 7–14.
- Brooks, P.J., Nilforoushan, D., Manolson, M.F., Simmons, C.A., Gong, S.G., 2009. Molecular markers of early orthodontic tooth movement. *Angle Orthodontist* 79, 1108–1113.
- Burger, E.H., Klein-Nulend, J., Smit, T.H., 2003. Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon—a proposal. *Journal of Biomechanics* 36, 1453–1459.
- Cattaneo, P.M., Dalstra, M., Melsen, B., 2005. The finite element method: a tool to study orthodontic tooth movement. *Journal of Dental Research* 84, 428–433.
- Davidovitch, Z., Nicolay, O.F., Ngan, P.W., Shanfeld, J.L., 1988. Neurotransmitters, cytokines and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dental Clinics of North America* 32, 411–435.

- Garlet, T.P., Coelho, U., Repeke, C.E., Silva, J.S., Cunha, F., Garlet, G.P., 2008. Differential expression of osteoblast and osteoclast chemoattractants in compression and tension sides during orthodontic movement. *Cytokine* 42, 330–335.
- Garlet, T.P., Coelho, U., Silva, J.S., Garlet, G.P., 2007. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *European Journal of Oral Sciences* 115, 355–362.
- Hadjidakis, D.J., Androulakis, I.L., 2006. Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1092, 385–396.
- Huang, X.F., Zhao, Y.B., Zhang, F.M., Han, P.Y., 2009. Comparative study of gene expression during tooth eruption and orthodontic tooth movement in mice. *Oral Diseases* 15, 573–579.
- Kanzaki, H., Chiba, M., Takahashi, I., Haruyama, N., Nishimura, M., Mitani, H., 2004. Local OPG gene transfer to periodontal tissue inhibits orthodontic tooth movement. *Journal of Dental Research* 83, 920–925.
- Krishnan, V., Davidovitch, Z., 2006. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *American Journal of Orthodontics Dentofacial Orthopedics* 129, 469.e1–469.e32.
- Masella, R.S., Meister, M., 2006. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics Dentofacial Orthopedics* 129, 458–468.
- Nishijima, Y., Yamaguchi, M., Kojima, T., Aihara, N., Nakajima, R., Kasai, K., 2006. Levels of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement and effect of compression force on releases from periodontal ligament cells in vitro. *Orthodontics and Craniofacial Research* 9, 63–70.
- Park-Min, K.H., Ji, J.D., Antoniv, T., Reid, A.C., Silver, R.B., Humphrey, M.B., Nakamura, M., Ivashkiv, L.B., 2009. IL-10 suppresses calcium-mediated costimulation of receptor activator NF-kappa B signaling during human osteoclast differentiation by inhibiting TREM-2 expression. *Journal of Immunology* 183, 2444–2455.
- Pavlin, D., Goldman, S., Gluhak-Heinrich, J., Magness, M., Zadro, R., 2000. Orthodontically stressed periodontium of transgenic mouse as a model for studying mechanical response in bone: the effect on the number of osteoblasts. *Clinical Orthodontics and Research* 3, 55–66.
- Ren, Y., Hazemeijer, H., de Haan, B., Qu, N., de Vos, P., 2007. Cytokine profiles in crevicular fluid during orthodontic tooth movement of short and long durations. *Journal of Periodontology* 78, 453–458.
- Riancho, J.A., Delgado-Calle, J., 2011. Osteoblast-osteoclast interaction mechanisms. *Reumatología Clínica*. (Suppl. 2), S1–S4.
- Suda, T., Kobayashi, K., Jimi, E., Udagawa, N., Takahashi, N., 2001. The molecular basis of osteoclast differentiation and activation. *Novartis Foundation symposium* 232, 235–247.
- Taddei, S.R., Andrade Jr, I., Queiroz-Junior, C.M., Garlet, T.P., Garlet, G.P., Cunha, Q., Teixeira, M.M., da Silva, T.A., 2012. Role of CCR2 in orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics Dentofacial Orthopedics* 141, 153–160.
- Tanaka, Y., Nakayama, S., Okada, Y., 2005. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Current Drug Targets Inflammation and Allergy* 4, 325–328.
- Troen, B.R., 2004. The role of cathepsin K in normal bone resorption. *Drug News and Perspectives* 17, 19–28.
- Verna, C., Dalstra, M., Lee, T.C., Cattaneo, P.M., Melsen, B., 2004. Microcracks in the alveolar bone following orthodontic tooth movement: a morphological and morphometric study. *European Journal of Orthodontics* 26, 459–467.
- Yamashita, T., Yao, Z., Li, F., Zhang, Q., Badell, I.R., Schwarz, E.M., Takeshita, S., Wagner, E.F., Noda, M., Matsuo, K., Xing, L., Boyce, B.F., 2007. NF-kappaB p50 and p52 regulate receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) and tumor necrosis factor-induced osteoclast precursor differentiation by activating c-Fos and NFATc1. *Journal of Biological Chemistry* 282, 18245–18253.
- Yano, S., Mentaverri, R., Kanuparthi, D., Bandyopadhyay, S., Rivera, A., Brown, E.M., Chattopadhyay, N., 2005. Functional expression of β -chemokine receptors in osteoblasts: role of regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in osteoblasts and regulation of its secretion by osteoblasts and osteoclasts. *Endocrinology* 146, 2324–2335.
- Yoshimatsu, M., Shibata, Y., Kitaura, H., Chang, X., Moriishi, T., Hashimoto, F., Yoshida, N., Yamaguchi, A., 2006. Experimental model of tooth movement by orthodontic force in mice and its application to tumor necrosis factor receptor-deficient mice. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 24, 20–27.

6.2 Artigo científico II

Leukotrienes affect mechanical loading-induced bone remodeling by stimulating
osteoclast differentiation

A.P. Moura^{1,2*}, S.R.A. Taddei^{1*}, C.M. Queiroz-Junior^{2,3}, M.F.M Madeira^{2,3},
G.P., Garlet⁴, L.F.D Rodrigues², D.G.Souza³, F.S Machado¹, I. Andrade Jr.⁵, M.M. Teixeira¹,
T.A. Silva².

1. Department of Biochemistry and Immunology, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil;

2. Department of Oral Pathology and Surgery, Faculty of Dentistry, Universidade
Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil;

3. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade
Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil;

4. Department of Biological Sciences, School of Dentistry of Bauru, Universidade de
São Paulo, São Paulo, Brazil

5. Department of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais,
Minas Gerais, Brazil;

Key words: orthodontic tooth movement –osteoclast- 5-LO- leukotriene-
montelukast-zileuton

ABSTRACT

5-lipoxygenase (5-LO) metabolites, derived from arachidonic acid, are important pro-inflammatory lipid mediators. However, much still remains to be understood about the role of such mediators in bone remodeling. This study aimed to investigate the role of 5-LO metabolites, LTB₄ and CysLTs, in a model of mechanical-induced bone remodeling. A coil spring was placed on occlusal surface of maxillary first molar and attached to incisors teeth in wild-type (WT), 5-LO deficient mice (5-LO^{-/-}) and mice treated with inhibitor of 5-LO (zileuton-ZN) or with antagonist of the receptor CysLTs (montelukast-MT). The amount of orthodontic tooth movement (OTM) and the number of osteoclasts were determined morphometrically. The levels of inflammatory and bone remodeling markers in periodontium were analyzed by quantitative polymerase chain reaction. Osteoclast differentiation and TNF- α production were evaluated *in vitro* using RAW 264.7 cells treated with LTB₄ and LTD₄. OTM and TRAP⁺ cells were significantly diminished in 5-LO^{-/-}, ZN- and MT-treated mice. The expression of cytokines and bone remodeling markers (TNF- α , IL-10, RUNX2 and RANK) were diminished after 72 hours of OTM in 5-LO^{-/-} and MT-treated mice. For ZN-treated group, a reduced expression of TNF- α , IL-10 and RUNX2 was observed when compared to vehicle. Accordingly, LTB₄, in association with RANKL promoted osteoclast differentiation and both LTB₄ and LTD₄ increased TNF- α release *in vitro*. These data demonstrate that the absence of 5-LO metabolites, LTB₄ and CysLTs, reduce osteoclast recruitment and differentiation, consequently diminishing bone resorption induced by mechanical loading. Thus, 5-LO might be a potential target for controlling bone resorption in physiological and pathological conditions.

1 INTRODUCTION

Bone is a dynamic tissue that can adjust its structure to cope with mechanical challenges [1]. Therefore, bone strain induced by mechanical loading can trigger bone formation or resorption [2]. While significant progress have been made in this field recently, much still remains to be understood about the mechanisms of mechanical transduction into biological response.

One of the mechanisms of mechanical force-induced bone remodeling involves the release of inflammatory mediators. The mechanical loading triggers a cascade of events resulting in cytokines, growth factors and arachidonic acid (AA) release [3]. The AA is released from cell membrane and can be further metabolized to generate eicosanoids, lipid mediators such as prostaglandins, leukotrienes (LTs), lipoxins and thromboxanes, through different pathways [4,5]. The AA lipoxygenase pathway has 5-lipoxygenase (5-LO) as a key enzyme and generates leukotriene B₄ (LTB₄) and cysteinyl LTs (CysLTs) (LTC₄, LTD₄ and LTE₄) mainly in inflammatory cells such as leukocytes and mast cells [5]. LTB₄ is a potent neutrophil chemoattractant in inflammatory disorders while CysLTs promote plasma leakage in post capillaries vessels and increase mucus secretion in asthma [5, 6]. Additionally, some studies have already established a relationship between increased levels of LTs, especially LTB₄, and bone resorption in inflammatory diseases including rheumatoid arthritis [7] and periodontal disease [8]. The relevance of LTs in bone remodeling was further addressed using *in vitro* assays that reported that LTB₄ and LTD₄ stimulated osteoclasts to form resorption lacunae and enhance tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) activity [9,10]. The connection between 5-LO pathway and bone resorption became stronger with the demonstration of receptor BLT₁ in osteoclasts and also that osteoclasts and osteoblasts are able to produce LTs [5,11,12,13].

Even though it has been demonstrated that 5-LO metabolites play a role in inflammatory diseases and in osteoclastogenesis, only a few antileukotriene drugs are commercially available, due to severe side effects or lack of suitable oral bioavailability [6-14,15,16]. For instance, only zileuton (Zyflo[®]) and montelukast (Singulair[®]), inhibitor of 5-LO and antagonist of CysLTs receptor, respectively, are prescribed for asthma symptoms control but have not been tested in models of bone remodeling.

The purpose of this study was to investigate the role of 5-LO metabolites during mechanical force-induced bone remodeling. Also, the effect of LTs on osteoclast differentiation was assessed *in vitro*.

2 MATERIALS & METHODS

2.1 Experimental Animals

Experimental mice were divided into the following groups: Wild Type SV129 BL/6 or C57BL/6 (WT), 5-LO^{-/-}, zileuton-treated, a 5-LO inhibitor drug (Zyflo[®], Cornerstone Therapeutics Inc, Cary, NC, USA), (ZN), montelukast-treated, a CysLTs receptor antagonist (Singulair[®], Merck Sharp and Dohme, Cramlington, Northumberland, UK) (MT) and vehicle-treated (VH). WT mice were obtained from Animal Care Facilities of UFMG and 5-LO^{-/-} were purchased at The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). The ZN-treated mice group received with 30 mg/kg/day of the drug dissolved in its corresponding vehicle, carboxymethylcellulose 0.5% by oral gavage and MT-treated mice group received 2mg/kg/day of the drug dissolved in tap water, by oral gavage.

All mice were treated under the ethical regulations for animal experiments, with free access to commercial chow and water, defined by the Institutional Ethics Committee (protocol number 055/11).

2.2 Experimental Protocol

Induction of tooth movement was performed as previously described [17]. Briefly, a Ni-Ti coil spring (Lancer Orthodontics, San Marcos, CA, USA) was bonded between maxillary right first molar and the incisors delivering the force of 0.35 N. There was no reactivation during the experimental period. For histopathological analysis mice were euthanized after 6 and 12 days and the left side of the maxilla was used as control. For qPCR analysis, mice without orthodontic appliance were considered control and experimental mice were euthanized after 72 hours. For every set of experiments, at least 5 animals were used for each time-point.

2.3 Histopathological Analysis

The right and the left maxillae halves were dissected, fixed in 10% buffered formalin and decalcified in 14% EDTA (pH 7.4) for 21 days. Samples embedded in paraffin were cut into longitudinal sections of 5 μm thickness. Sections were stained for TRAP (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), counterstained with hematoxylin (Sigma-Aldrich), and used for histological examination. Osteoclasts were counted in 5 sections in the mesial bone of the distal-buccal root of the upper first molar. The amount of tooth movement was performed as previously described [17]. Briefly, tooth movement was obtained through the difference between the distance of the cementum-enamel-junction's (CEJ's) of the first molar to the second molar of the experimental side (right hemi-maxila) in relation to the distance obtained from the control side (left hemi-maxila) of the same animal. Five sagittal sections per animal were evaluated under a microscope Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Niedersachsen, Germany) adapted to a digital camera (PowerShot A620, Canon, Tokyo, Honshu, Japan) and measurements performed by Image J software (Research Service Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MA USA).

2.4 RNA Extraction and quantitative polymerase chain reaction

Using a stereomicroscope, the periodontal ligament and surrounding alveolar bone were extracted from the upper first molars region. Periodontal tissues and alveolar bone extracted from the mesial area of the distal buccal root of the first maxillary molar were considered compression sites.

The tissues were submitted to RNA extraction using TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and complementary DNA (cDNA) was synthesized using 2 μg of RNA through a reverse transcription reaction (Superscript II, Invitrogen). qPCR analysis was performed in Mini Opticon (BioRad, Hercules, CA, USA) using SYBR-green fluorescence quantification system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Standard PCR conditions

were 95 °C (10 min), and then 40 cycles of 94 °C (1 min), 58 °C (1 min) and 72 °C (2 min), followed by the standard denaturation curve. Primer sequences are described in Table I. The mean Ct values from duplicate measurements were used to calculate expression of the target gene, with normalization to an internal control (β -actin) using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formula.

2.5 Osteoclasts culture

The murine monocyte/macrophage cell line RAW 264.7 was purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO, Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), penicillin (40 U/ml), and gentamicin (40 U/ml). All cells were grown in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. For osteoclastic differentiation, RAW 264.7 cells were suspended in DMEM containing 10% FBS and then seeded at 1×10^4 cells/well in 24-well culture plates over 13 mm glass coverslips. Cells were stimulated with 50 ng/ml de RANKL (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) for 48 hours. Then, LTB₄ 10^{-7} M or LTD₄ 10^{-7} M (Sigma-Aldrich) were added for 30 minutes before stimulation with new medium containing RANKL. Cells were stained for TRAP after 10 days of the first stimulus. TRAP⁺ cells were counted in ten non-consecutive fields. Experiments were done in triplicate. Results were expressed as number of positive cells per field.

2.6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The levels of TNF- α in supernatants were determined by ELISA using commercially available kits (Duo-Set, R&D Systems, Minneapolis MN, USA) according to manufacturer instructions. The kit detection limit was 31.2 – 2,000 pg/mL. Twenty four hours after second RANKL stimuli, 100uL of supernatant from cell culture were collected and stored at -20°C. The supernatant was diluted 1:3 in cytokine extraction solution. Results were expressed as picograms/mL.

2.7 Statistical Analysis

The evaluation of each group was expressed as the mean \pm SEM. Comparison among the groups was statistically analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls multiple comparison test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3 RESULTS

5-LO metabolites, CysLTs and LTB₄, modulate bone remodeling and osteoclast recruitment

In order to understand the role of 5-LO metabolites during bone remodeling, 5-LO^{-/-} mice was submitted to OTM, a standardized model of strain-induced bone remodeling [17]. The amount of OTM in 5-LO^{-/-} mice after 12 days of mechanical loading was significantly diminished when compared to WT (Fig. 1A). To further understand the phenotype observed, TRAP activity and osteoclast recruitment were analyzed. Osteoclast recruitment increased significantly in all experimental groups when compared to respective controls in both 5-LO^{-/-} and WT groups (Fig. 1B) However, the number of TRAP⁺ osteoclasts were significantly diminished in 5-LO^{-/-}, after 12 days, compared to WT mice(Fig. 1B). In control mice, TRAP activity was found on the bone adjacent to distal buccal root, and no activity was observed in the mesial region, probably due to physiological distal tooth movement. A different staining pattern was observed on experimental mice being TRAP staining increased on the mesial region of the distal buccal root, the compression side, and decreased on the distal bone of this root (Fig. 1C and D).

Next, a 5-LO inhibitor (ZN) was used and the results confirmed a smaller amount of OTM compared to vehicle on day 12 (Fig. 2A). In order to assess whether CysLTs are also involved, a CysLTs receptor antagonist, MT was used. MT-treated mice presented a similar pattern of diminished OTM on day 12 (Fig. 2B), thus showing the contributing role of CysLTs in OTM. As expected, osteoclast recruitment was diminished in ZN and MT-treated mice after 12 days of mechanical loading however only MT was different from control at day 6 (Fig 2C and D).

Overall, OTM of 5-LO^{-/-} group presented 79.4% of reduction comparing to WT while ZN presented 34.5% and MT 41% of OTM reduction, comparing to its respective vehicle, all

after 12 days. Moreover, while 5-LO^{-/-} mice had 40% reduction of TRAP⁺ cells, a decrease of 37% and 30% was verified respectively in groups ZN and MT.

Cytokine and bone remodeling markers expression is modulated by 5-LO metabolites.

In an attempt to understand the mechanisms behind the phenotype of lower bone resorption in 5-LO^{-/-} mice, our next step was to analyze the expression of bone resorption and deposition markers in those mice. After 72 hours of mechanical loading, the WT and 5-LO^{-/-} groups showed a significant expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Fig. 3A), Interleukin (IL-10) (Fig. 3B), runt-related transcription factor 2 (RUNX2) (Fig. 3C), the ratio of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin (RANKL/OPG) (Fig. 3D) and the receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) (Fig. 3E) in comparison to respective control group. However, 5-LO^{-/-} mice expressed lower levels of all analyzed cytokines and bone markers at the same time-point, when compared to WT mice.

In order to confirm the hypothesis that metabolites in 5-LO pathway influences cytokines and bone resorption markers release, the levels of those molecules were also analyzed in mice treated with ZN and MT. In accordance with previous findings in 5-LO^{-/-} mice, all the molecules, except for RANK in ZN-treated mice and RANKL/OPG ratio, were diminished after treatment either with MT or ZN (Fig. 4).

LTB₄ induce osteoclast differentiation and TNF- α release *in vitro* in presence of RANKL.

Once it was demonstrated that LTs could interfere with osteoclasts recruitment, *in vitro* experiments were performed in order to verify the role of LTB₄ and LTD₄ in osteoclast differentiation. Neither LTB₄ nor LTD₄ alone induced the differentiation of RAW 264.7 cells into TRAP⁺ osteoclasts (*data not shown*). However, when associated with RANKL, LTB₄

increased the number of TRAP⁺ cells, more than RANKL solely (Fig. 6A). Considering the importance of TNF- α in osteoclastogenesis, we next evaluated if LTB₄ and LTD₄ stimulated TNF- α release. The results demonstrated significant higher levels of TNF- α in cultures treated with LTB₄ and LTD₄ plus RANKL (Fig. 6B) in comparison with stimulation with RANKL alone (Fig. 6B).

4 DISCUSSION

The current study presents new data concerning the role of 5-LO and its derived metabolites in bone remodeling obtained from *in vivo* and *in vitro* experiments. The results showed diminished bone remodelling when 5-LO was absent (5-LO^{-/-} mice), inhibited (ZN-treated mice) or when the receptor of CysLTs was antagonized (MT-treatment). Moreover, the lack of 5-LO or treatment with ZN or MT was associated with reduced expression of bone resorption and formation markers (RANK, RANKL/OPG, RUNX2), inflammatory (TNF- α ,) and anti-inflammatory cytokines (IL-10). *In vitro*, LTB₄ augmented RANKL-induced osteoclast differentiation and both LTB₄ and LTD₄ increased TNF- α release.

The bone phenotype (lower OTM and osteoclasts counts) observed in 5-LO^{-/-}, ZN- and MT-treated mice account for the role of 5-LO in osteoclast recruitment and function. In agreement, osteoclast numbers, bone resorption and eroded surfaces were increased after LTB₄ local administration in mice calvariae [18]. LTB₄ is produced by many cells including neutrophils and macrophages [5]. During bone remodeling it can also be released by osteoclasts thus acting in an autocrine and/or paracrine way by binding to the receptor BLT₁ expressed by the same cell [19,5]. Furthermore, LTB₄ and LTD₄ stimulated the increase of TRAP content and the formation of resorption lacunae by avian osteoclasts in calcified matrices and sperm whale dentine, respectively. *In vitro*, we observed that LTB₄ alone failed to induce osteoclast formation; however an increase of TRAP⁺ cells was induced by stimulation with LTB₄ plus RANKL.

The effect of different 5-LO inhibitors (BWA4C, IC230487 and AA861) in osteoclastogenesis have also been evaluated previously. The data showed a decreased quantity of mononucleated TRAP⁺ cells and differentiated osteoclasts [20], reduced particulate induced bone resorption [21] and a reduced amount of tooth movement in rats [22], respectively. Even though effective in murine experimental models and in *in vitro* assays those drugs are not

commercially available due to severe side effects [20,21,22,15]. In contrast both drugs tested in the present study, zileuton and montelukast, are worldwide prescribed for asthma treatment [6,15].

We hypothesized whether the mechanisms of LT action in bone were related to inflammation and, consequently, cytokine release. Indeed, lower levels of TNF- α , a pro inflammatory cytokine, were found when 5-LO was absent, inhibited or when CysLTs receptor was antagonized. Since this cytokine has been previously reported as direct inductor of osteoclastogenesis its reduced expression might, to some extent, lead to lower osteoclast differentiation and activity observed in this model [23]. It has been already described in literature that TNF- α activate phospholipase A2 thus triggering the cascade of AA release and consequently LTs [24]. Interestingly, our *in vitro* experiments have shown that when LTB₄ and LTD₄ with RANKL are added to cell culture there is an increase in TNF- α release. In culture of synovial fibroblasts, collected from patients with rheumatoid arthritis, there is an augment of TNF- α expression after LTB₄ stimulation [25]. Thus, showing that not only TNF- α triggers LTs release, but also LTs can stimulate TNF- α release *in vitro*.

Next, the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 was analyzed. Previous studies demonstrated the influence of IL-10 in RANK-RANKL/OPG system inhibiting osteoclastogenesis [26,27]. However in our experiment in spite of lower IL-10 expression, osteoclast numbers and OTM were diminished. Montelukast treatment increases IL-10 expression in asthma patients while in a model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis such expression is decreased [28,29]. The different phenotypes observed among studies may vary in view of the distinct immune responses triggered by the different stimuli [30].

The discovery of RANK/RANKL-OPG system explained a major mechanism by which preosteoblasts cells regulate osteoclasts development [30-33]. The coupling of osteoclast and osteoblast development is further reinforced by the fact that RUNX2, an

osteoblast transcription factor, is necessary for RANKL expression on the surface of those and stromal cells [33]. The RANKL and RUNX2 expression were decreased in 5-LO^{-/-}, ZN and MT-treated mice. Given the RUNX2 importance in RANKL expression, the lower levels of RUNX2 could indirectly result in lower osteoclast numbers due to decrease in RANKL and, consequently, interference in RANK/RANKL system.

In conclusion, the current study suggests that 5-LO-derived metabolites modulate cytokine release and positively affects osteoclast differentiation, thus enhancing bone resorption and strain-induced tooth movement. It points out to new perspectives for therapeutic intervention in bone remodeling in physiological and inflammatory conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Fundação de Amparo a Pesquisas do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) for financial support.

REFERENCES

- [1] L. You, S. Temiyasathit, P. Lee, C.H. Kim, P. Tummala, W. Yao, W. Kingery, A.M. Malone, R.Y. Kwon, C.R. Jacobs, Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading, *Bone*. 42 (2008) 172-9.
- [2] A. Liedert, D. Kaspar, P. Augat, A. Ignatius, L. Claes, *Mechanobiology of Bone Tissue and Bone Cells*, in: A. Kamkin, I. Kiseleva (Eds.), *Mechanosensitivity in Cells and Tissues*, Academia Publishing House, Moscow 2005, available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7494/>.
- [3] V. Krishnan, Z. Davidovitch, Cellular, molecular and tissue-level reactions to orthodontic force, *Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop.* 129 (2006) 1-32.
- [4] H. Harizi, J. Corcuff, N. Gualde, Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology, *Trends. Mol. Med.* 14 (2008) 1471-1491.
- [5] C.D. Funk, Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology, *Nature*. 294 (2001) 1871-1875.
- [6] Z. Diamant, E. Mantzouranis, L. Bjermer, Antiinflammatory mechanisms of leukotriene modulators, *Clin. Exp. Allergy*. 29 (1999) 1449-53.
- [7] T. Gursel, S. Firat, Z. Ercan, Increased serum leukotriene B4 level in the active stage of rheumatoid arthritis in children, *Prostaglandins, Leukot. and Essent. Fatty Acids*. 56 (1997) 205-207.
- [8] R. Pradeep, S. Manjunath, P. Swati, C. Shikha, P. Sujatha, Gingival crevicular fluid levels of leukotriene B4 in periodontal health and disease, *J. Periodontol.* 78 (2007) 2325-2330.
- [9] M.A. Flynn, M. Qiao, C. Garcia, M. Dallas, L.F. Bonewald, Avian osteoclast cells are stimulated to resorb calcified matrices by and possess receptors for leukotriene B4, *Calcif. Tissue. Int.* 64 (1999) 154-159.
- [10] C. Garcia, M. Qiao, D. Chen, M. Klrchen, W. Gallwitz, G.R. Mundy, L.R. Bonewald, Effects of synthetic peptido-leukotrienes on bone resorption *in vitro*, *J. Bone Miner. Res.* 11 (1996) 527-529.
- [11] A.R. Collet, A.G. Stewart, Eicosanoids: Physiology update and orthodontic implications, *Aust. Orthod. J.* 12 (1991) 116-123.
- [12] Y. Paredes, F. Massicotte, J.P. Pelletier, J. Martel-Pelletier, S. Laufer, D. Lajeunesse, Study of the role of leukotriene B4 in abnormal function of human subchondral osteoarthritis osteoblasts: Effects of cyclooxygenase and/or 5-lipoxygenase inhibition, *Arthritis and rheumatism*. 46 (2002) 1804–1812.

- [13] H. Hikiji, T. Takato, T. Shimizo, S. Ishii, The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease, *Prog. Lipid Res.* 47 (2008) 107-126.
- [14] L. Garcia-Marcos, A. Schuster, New perspectives for asthma treatment: Anti-leukotriene drugs, *Pediatr. Allergy Immunol. Pulmonol.* 10 (1999) 77-78.
- [15] O. Werz, D. Steinhilber, Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors, *Pharmacol. Ther.* 112 (2006) 701-18.
- [16] A.W. Ford-Hutchinson, M. Gresser, R.N. Young, 5-Lipoxygenase, *Annu. Rev. Biochem.* 63 (1994) 383-417.
- [17] S.R. Taddei, A.P. Moura, I.Jr. Andrade, G.P. Garlet, T.P. Garlet, M.M. Teixeira, T.A. da Silva, Experimental model of tooth movement in mice: a standardized protocol for studying bone remodeling under compression and tensile strains, *J. Biomech.* 45 (2012) 2729-2735.
- [18] C. Garcia, B.F. Boyce, J. Gilles, M. Dallas, M. Qiao, G.R. Mundy, L.F. Bonewald, Leukotriene B₄ stimulates osteoclastic bone resorption both *in vivo* and *in vitro*, *J. Bone Miner. Res.* 11 (1996) 1619-1627.
- [19] H. Hikiji, S. Yokomizo, T. Takato, T. Shimizu, A distinctive role of the leukotriene B₄ receptor BLT1 in osteoclastic activity during bone loss, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 21294-2129.
- [20] C. Franchi-Miller, L. Saffar, The 5-lipoxygenase inhibitor BWA4C impairs osteoclastic resorption in synchronized model of bone remodeling, *Bone.* 17 (1993) 185-191.
- [21] G.I. Anderson, R. MacQuarrie, C. Osinga, Y.F. Chen, M. Langman, R. Gilbert, Inhibition of leukotriene function can modulate particulate-induced changes in bone cell differentiation and activity, *J. Biomed. Mater. Res.* 58 (2001) 406-414.
- [22] A.H. Mohammed, D.N. Ttakis, R. Dziak, Leukotrienes in orthodontic tooth movement, *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 95 (1989) 231-237.
- [23] Y. Azuma, K. Kaji, R. Katogi, S. Takeshita, A. Kudo, Tumor necrosis factor- α induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 4858-4864.
- [24] W.G. Hoeck, C.S. Ramesha, D.J. Chang, N. Fan, R.A. Heller, Cytoplasmic phospholipase A₂ activity and gene expression are stimulated by tumor necrosis factor: dexamethasone blocks the induced synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 4475-9.
- [25] S. Xu, L. Houshan, L. Jianhao, C Zhankunc, D. Jiang, Regulation of TNF- α and IL- β in rheumatoid arthritis synovial fibroblast by LTB₄. 30 (2012) 1183-1189.
- [26] S. Mohamed, E. Sugiyama, K. Shinoda, H. Taki, H. Hounoki, H. Osman, M. Maruyama, M. Kobayashi, H. Ogawa, T. Miyahara, Interleukin-10 inhibits RANKL-mediated expression

of NFATc1 in part via suppression of c-Fos and c-Jun in RAW264.7 cells and mouse bone marrow cells, *Bone*. 41 (2007) 592–602.

[27] M. Claudino, A.P.Trombone, C.R. Cardoso, S.B. Ferreira Jr, W. Jr. Martins, G.F. Assis, C.F.Santos, P.C.Trevilatto, A.P Campanelli, J.S.Silva, G.P.Garlet, The broad effects of the functional IL-10 promoter-592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3, and OPG expression and their association with periodontal disease outcome, *J. Leukoc. Biol.* 84 (2008) 1565-73.

[28] B.Yüksel, C. Aydemir C, G. Ustündag, N. Eldeş, E.Kutsal, M.Can, S. Demirtaş, N.Tomaç . The effect of treatment with montelukast on levels of serum interleukin-10, eosinophil cationic protein, blood eosinophil counts, and clinical parameters in children with asthma, *Turk J Pediatr.* 51(2009) 460-5.

[29] C. Shimbori, N. Shiota, H. Okunishi, Effects of montelukast, a cysteinyl-leukotriene type 1 receptor antagonist, on the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice, *Eur J Pharmacol.* 650 (2011) 424-30

[30] B. Boyce, L. Xing, Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling, *Arch. Biochem. Biophys.* 473 (2008) 139-146.

[31] H. Enomoto, S. Shiojiri, K. Hoshi, T. Furuichi, R. Fukuyama, C.A. Yoshida, N. Kanatani, R. Nakamura, A. Mizuno, A. Zanma, K. Yano, H. Yasuda, K. Higashio, K. Takada, T. Komori, Induction of Osteoclast Differentiation by Runx2 through Receptor Activator of Nuclear Factor- B Ligand (RANKL) and Osteoprotegerin Regulation and Partial Rescue of Osteoclastogenesis in Runx2, Mice by RANKL Transgene, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 23971–23977.

[32] S. Khosla, Minireview: The OPG/RANKL/RANK System, *Endocrinology.* 142 (2001) 5050-5055.

[33] Y. Gao, T. Shinki, Y. T. Yuasa, H. Enomoto, T. Komori, T. Suda e Y. Akira. Potential role of Cbfa1, an essential transcriptional factor for osteoblast differentiation, in osteoclastogenesis: regulation of mRNA expression. of osteoclast differentiation factor (ODF), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252 (1998) 697-702.

Table 1:

Table 1: Primers sequence

<i>Target</i>	<i>Sense and anti-sense sequences</i>	At (°C)	Mt (°C)	Bp
RANKL	CAGAAGATGGCACTCACTGCA CACCATCGCTTTCTCTGCTCT	65	73	203
RANK	CAAACCTTGGACCAACTGCAC GCAGACCACATCTGATTCCGT	60	84	76
RUNX2	AACCACAGAACCACAAGTGCG AAATGACTCGGTTGGTCTCGG	58	80	119
OPG	GGAACCCCAGAGCGAAATACA CCTGAAGAATGCCTCCTCACA	57	77	225
IL-10	AGATC TCCGAGATGC CTCA CCGTGGAGCAGGTGAAGAAT	58	85	307
TNF- α	AAGCCTGTAGCCCATGTTGT CAGATAGATGGGCTCATACC	59	79	330
B-actina	ATGTTTGAGACCTTCAACA CACGTCAGACTTCATGATGG	56	95	495

Figure 1

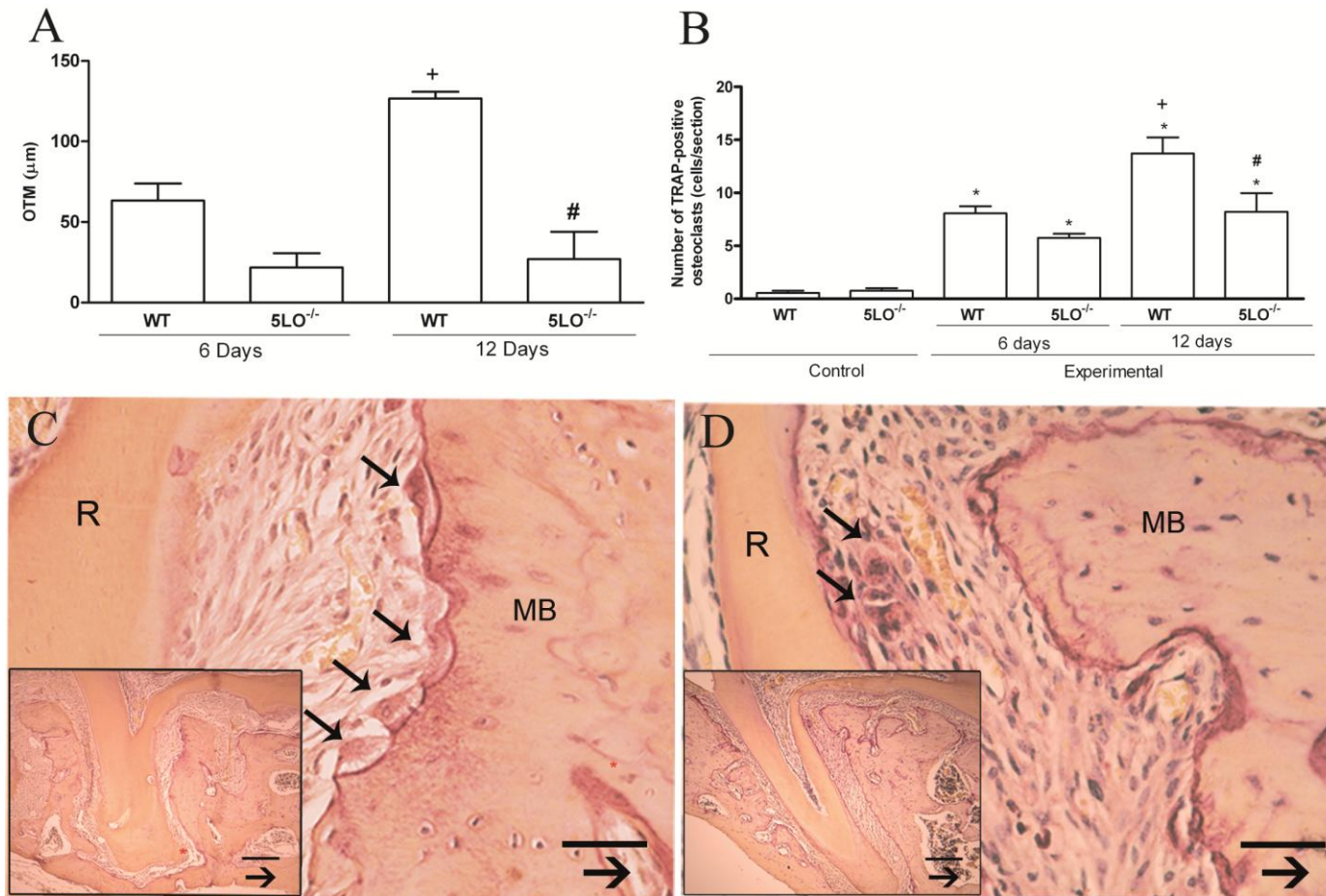


Figure 2

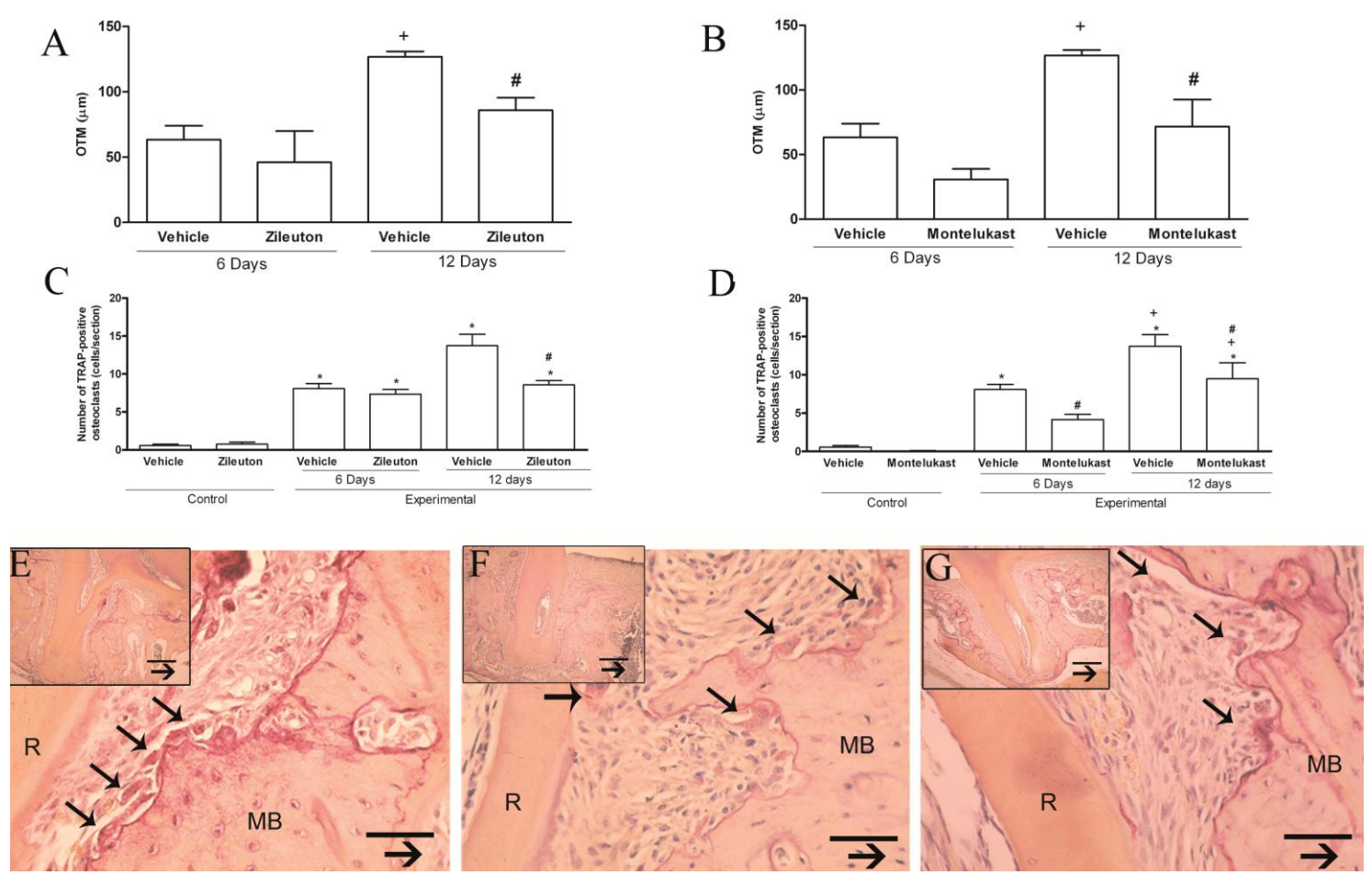


Figure 3

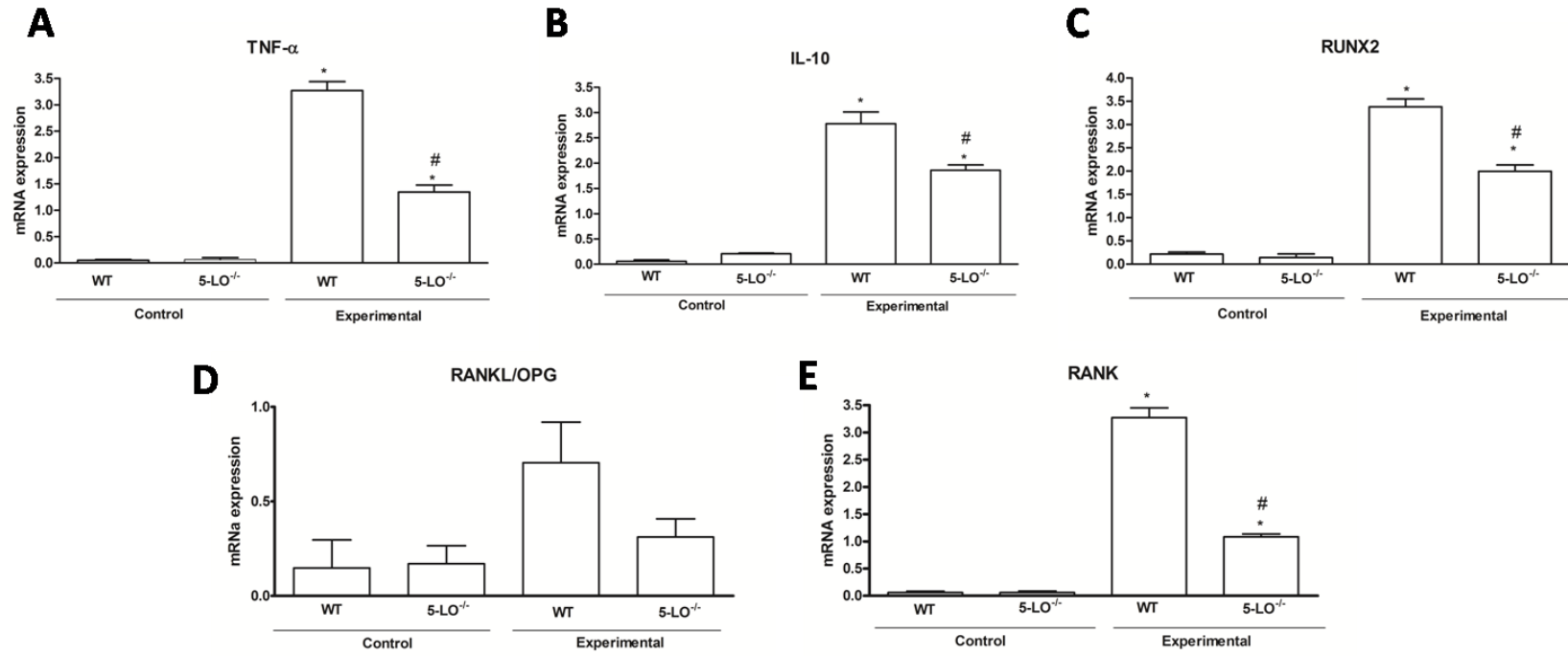


Figure 4

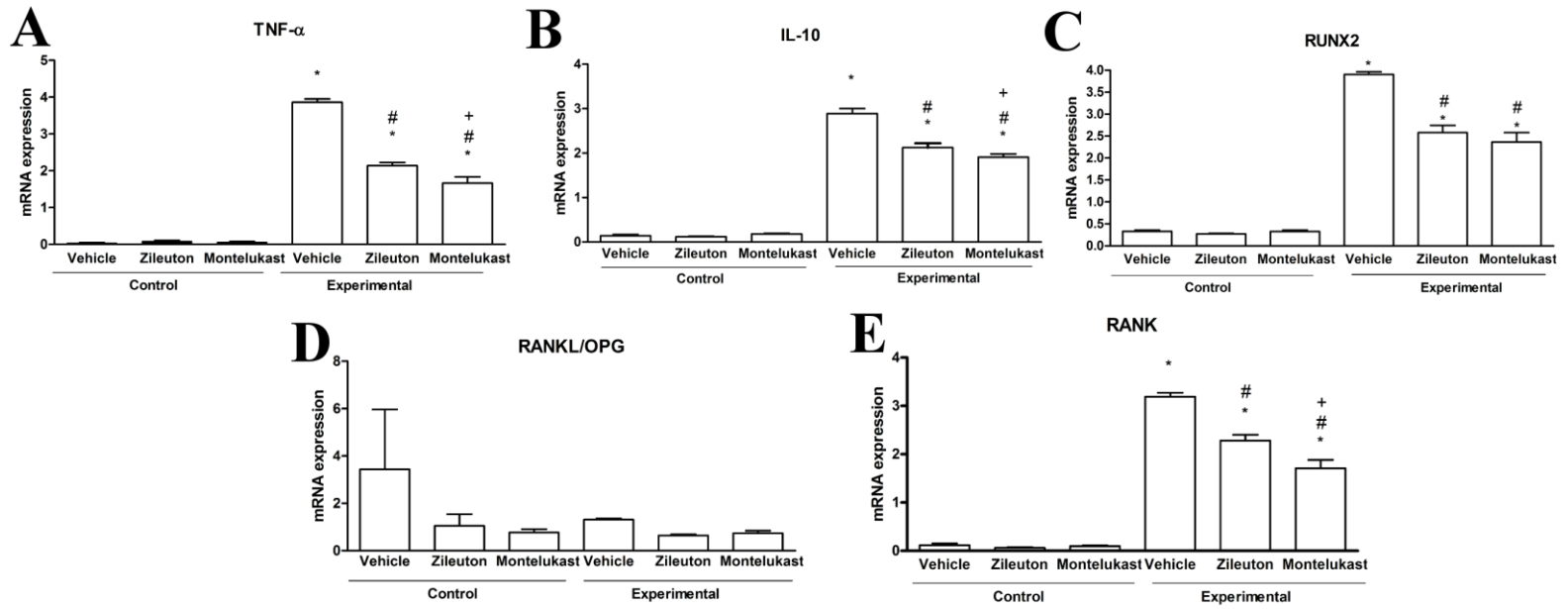


Figure 5

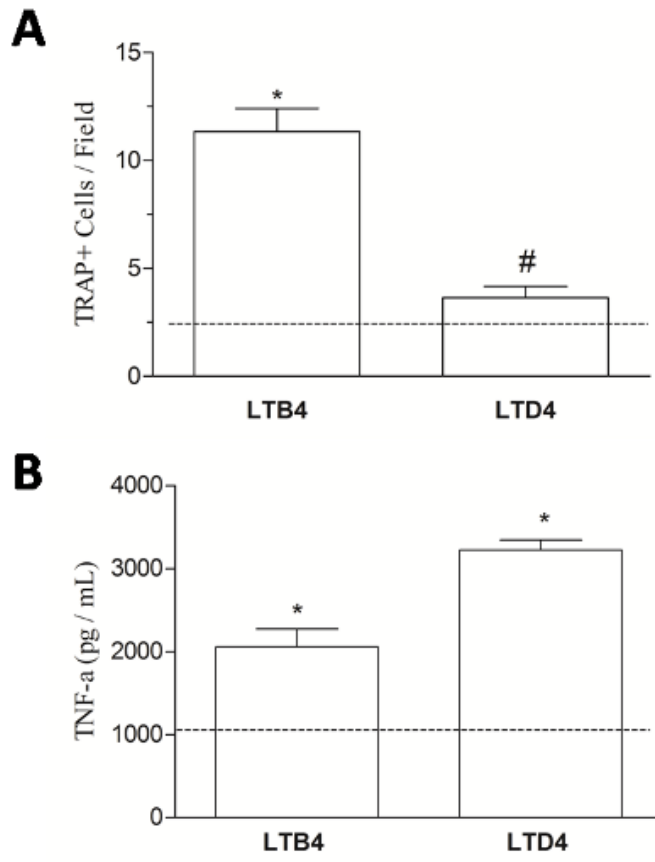


FIGURE LEGENDS

Figure 1. Mechanical loading-induced bone resorption and TRAP⁺ osteoclasts were decreased in 5-LO^{-/-}

(A) Amount of orthodontic tooth movement, and (B) Number of TRAP⁺ cells, in 5-LO^{-/-} and WT mice after 6 and 12 days of mechanical loading. (C) Histological changes related to OTM in WT and (D) 5-LO^{-/-} mice, both after 12 days of mechanical loading. Panels indicate a lower magnified view. Small arrows indicate TRAP⁺ osteoclasts. MB, mesial alveolar bone; DB, distal alveolar bone; R, root. Bar = 50 μ m in large panels and 200 μ m in small panels. Large arrows indicate the direction of orthodontic tooth movement. *p<0.05 *versus* control, # p<0.05 *versus* the respective WT group and + p<0.05 when comparing each group at different time points. One-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test.

Figure 2 Mechanical loading-induced bone resorption and TRAP⁺ osteoclasts were decreased in zileuton and montelukast-treated mice.

(A) Amount of orthodontic tooth movement in ZN, and (B) MT-treated mice. (C) Number of TRAP⁺ cells, in ZN and (D) MT-treated mice 6 and 12 days after mechanical loading. (E) Histological changes related to OTM in vehicle and (F) ZN and (G) MT-treated mice, both after 12 days of mechanical loading. Panels indicate a lower magnification view. Small arrows indicate TRAP⁺ osteoclasts. MB, mesial alveolar bone; DB, distal alveolar bone; R, root. Bar = 50 μ m in large panels and 200 μ m in small panels. Large arrows indicate the direction of orthodontic tooth movement. *p<0.05 *versus* control; # p<0.05 *versus* the respective vehicle group; + p<0.05 when comparing each group at different time points. One-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test.

Figure 3 Expression of Inflammatory cytokines and bone markers in 5-LO^{-/-} and WT mice after mechanical loading.

Mice were subjected to mechanical loading and 72h later, alveolar bone and periodontium samples were collected for real time qPCR. (A) mRNA expression of TNF- α ; (B) IL-10; (C) RUNX2; (D) RANKL/OPG; and (E) RANK in WT and 5-LO^{-/-} mice. *p<0.05 *versus* control; # p<0.05 *versus* the respective WT group; + p<0.05 when comparing each group at different time points. One-way ANOVA and Newman–Keuls multiple comparison test.

Figure 4 Expression of inflammatory cytokines and bone resorption and deposition markers were lower in zileuton and montelukast-treated mice, except RANK in zileuton-treated mice.

Mice were subjected to mechanical loading and 72h later, alveolar bone and periodontium samples were collected for real time qPCR. (A) mRNA expression of TNF- α ; (B) IL-10; (C) RUNX2; (D) RANKL/OPG; (E) RANK in ZN, MT and vehicle. *p<0.05 *versus* control; # p<0.05 *versus* the respective vehicle group; + p<0.05 when comparing each group at different time points. One-way ANOVA and Newman–Keuls multiple comparison test.

Figure 5 LTB₄ in the presence of RANKL induce osteoclast differentiation and LTB₄ and LTD₄ increase TNF- α release *in vitro*.

(A) Number of TRAP⁺ cells in culture of 264.7 RAW cells after stimulation with RANK+LTB₄ and RANKL+LTD₄ (B) TNF- α levels after 24 hours of leukotriene stimulus in RANKL+LTB₄ or RANKL+LTD₄ groups, quantified by ELISA. Dashed line represents the data of control group *p<0.05 *versus* control; comparing LTB₄ and LTD₄. Results were expressed as picograms of cytokine/mL.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

7.1 Desenvolvimento do modelo de remodelação óssea induzido por força ortodôntica

A remodelação óssea é um fenômeno fisiológico constante importante para a manutenção da integridade estrutural do tecido. Além disso, a remodelação óssea permite a adaptação tecidual frente a estímulos, como forças mecânicas e crescimento (ROBERTS; HUJA; ROBERTS, 2004; BOYCE; XING, 2008; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010; BOYCE *et al.*, 2012). Esse processo proporciona ainda a liberação de íons inorgânicos quando requisitados, o reparo de áreas lesadas e aumento da resistência tecidual à fadiga (RAGGATT; PARTRIDGE, 2010; BOYCE *et al.*, 2012). Contudo, quando não estritamente coordenado pode resultar em comprometimento da homeostase tecidual (BOYCE *et al.*, 2012).

A remodelação óssea é basicamente dependente de dois processos: reabsorção e deposição óssea (ROBERTS; HUJA; ROBERTS, 2004). O primeiro é realizado por osteoclastos, células da linhagem monocítica fagocítica e a segunda por osteoblastos de origem mesenquimal (BOYLE *et al.*, 2003; BOYCE; XING, 2008; BOYCE *et al.*, 2012). A falha na coordenação destes dois processos pode resultar em doenças ósseas (BOYCE *et al.*, 2012; LERNER, 2012).

A compreensão do mecanismo de recrutamento, diferenciação e ativação de osteoclastos é de suma importância para o desenvolvimento de estratégias de tratamento para doenças ósseas. E, portanto, enorme esforço tem sido empreendido para elucidar o papel tanto de fatores locais como sistêmicos na remodelação óssea (ALHASHIMI *et al.*, 2001; ENOMOTO *et al.*, 2003; BOYCE *et al.*, 2005).

Na literatura é possível observar vasta variabilidade de metodologias empregadas para indução da remodelação óssea. Alguns modelos já estabelecidos avaliam osteoclastos e sua capacidade de reabsorção *in vitro* e *in vivo* (FRANCHI-MILLER; SAFFAR, 1995; YOSHIMATSU *et al.*, 2006; ANDRADE JR *et al.*, 2007; BROOKS *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2009). Contudo, além de diferenças com relação ao modelo empregado outras diferenças metodológicas dificultam a comparação de resultados entre experimentos. Portanto, um dos objetivos do presente trabalho foi padronizar um modelo de remodelação óssea induzida por força mecânica que fosse reprodutível.

Além das diferenças metodológicas com relação à forma de indução da remodelação óssea, existe uma grande variabilidade quanto aos animais utilizados. Estudos, principalmente os mais antigos, utilizam macacos, contudo, também são empregados cachorros, ratos e camundongos (YAMASAKI; SHIBATA; FUKUTHARA, 1982; MOHAMMED *et al.*, 1989; YOSHIMATSU *et al.*, 2006; REN *et al.*, 2007). Tendo em vista a facilidade de manipulação e a ampla gama de linhagens *knockout* hoje disponíveis, optou-se neste trabalho por utilizar o camundongo como animal experimental.

O modelo de movimentação ortodôntica é eficiente para induzir remodelação do osso alveolar, adjacente à raiz dentária (MELSEN, 1999; PAVLIN *et al.*, 2000; YOSHIMATSU *et al.*, 2006; HENNEMAN; HOFF; MALTHA, 2008). Esse método apresenta uma opção para indução de remodelação óssea independente de fatores sistêmicos, não exigindo tempo de recuperação do animal após a colocação da mola ortodôntica. No entanto, a falta de controle no emprego da técnica pode resultar em necrose tecidual, resposta inflamatória aumentada e quantidade de movimentação dentária essencialmente diferente (KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006). Na literatura é possível encontrar magnitudes de força ortodôntica entre 0,10 a 0,35 N (YOSHIMATSU *et al.*, 2006; ANDRADE JR *et al.*, 2007; BROOKS *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2009). Nossos resultados apontaram a força de 0,35 N, como ideal. Os camundongos suportaram bem a utilização do aparelho durante o período experimental e não apresentaram alteração de peso ou inflamações e lesões intra-orais que justificassem sua exclusão no experimento. Além disso, a força de 0,35 N foi capaz de movimentar o primeiro molar superior sem promover a reabsorção radicular

A necessidade de controle e padronização da força empregada fica clara quando a cinética de movimentação ortodôntica é analisada. Tendo em vista que a movimentação dentária pode ser dividida basicamente três fases, a quantidade de força poderia alterar a duração de cada fase (KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006). A aplicação de forças pesadas pode estender a área de hialinização no ligamento periodontal e atrasar a movimentação dentária, pois a movimentação apenas ocorre após a remoção de todo tecido necrótico. Em contrapartida, forças leves poderiam ser insuficientes para promover movimentação dentária e remodelação óssea. No nosso experimento ao empregar forças de 0,1 N não houve aumento do recrutamento de osteoclastos em relação ao controle indicando que forças muito leves são incapazes de induzir remodelação óssea.

Além de padronizar a força empregada é importante padronizar a forma como ela é aplicada. Nesse estudo fabricamos uma mesa cirúrgica para imobilização do camundongo acoplada a uma torre de resina contendo um dinamômetro. Foi desenvolvido um aparato para

proporcionar abertura de boca adequada e acesso intra-oral. A realização desse procedimento é necessária para evitar a movimentação da cabeça do animal ou interferência da mão do operador na hora de aferição da força aplicada. A colagem de uma mola na oclusal dos primeiros molares é uma técnica vantajosa quando comparada a outras técnicas utilizadas para indução da remodelação óssea com modelo de movimentação ortodôntica. Essa técnica apresenta vantagens, pois a região é de mais fácil visualização e promove menor desconforto ao animal pelo menor volume do aparelho. Além disso, a região é de mais fácil limpeza, reduzindo o risco de infecção e inflamação comparando com modelos que utilizam fios próximos a gengiva. A utilização de aparelhos expansores em macacos é descrita na literatura para indução de uma movimentação lateral dos dentes posteriores (YAMASAKI; SHIBATA; FUKUTHARA, 1982). A utilização de tal aparelho fica inviabilizada em animais como ratos e camundongos pela dificuldade da técnica devido ao reduzido tamanho destes animais. Uma técnica amplamente utilizada é “laçar” o primeiro molar do camundongo com um fio conectado a uma mola fixada nos incisivos. Sendo assim, um fio é passado por toda a circunferência do dente na altura da junção amelocementária (YOSHIMATSU *et al.*, 2006; NILFOROUSHANA; MANOLSONB, 2009; BROOKS *et al.*, 2009). Contudo, o espaço interdentário e a altura da coroa dos molares de camundongos são um obstáculo para a utilização dessa técnica. A presença de um fio ortodôntico próximo a gengiva pode resultar em um pequeno processo inflamatório local. Essa inflamação local desencadeada pelo acúmulo de alimento no fio e colonização por microrganismos poderia alterar a expressão de mediadores inflamatórios que possivelmente teriam influência na remodelação óssea. Portanto, optamos por colar uma mola de NiTi sobre a oclusal dos primeiros molares superiores e tracioná-la até os incisivos. Os incisivos foram escolhidos como dentes para ancoragem por possuírem as raízes maiores que a dos molares fornecendo, portanto apoio necessário para a mesialização do primeiro molar.

A movimentação dentária dentro do alvéolo resulta na criação de áreas de compressão no sítio mesial e áreas de tensão no sítio distal (KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006). Contudo, a aplicação da força na oclusal do dente apresenta uma desvantagem, pois resulta em inclinação dentária e, conseqüentemente, o surgimento de áreas majoritariamente de compressão ou tensão. Nestes casos não existe uma área exclusivamente de tensão ou pressão. Neste trabalho também padronizamos um modelo para análise separada de sítios majoritariamente de tensão ou compressão do ligamento periodontal. Dessa forma, foi possível se estabelecer um paralelo entre o microambiente do periodonto e a resposta local de reabsorção e deposição em sítios específicos.

A expressão de moléculas nos sítios periodontais submetidos à força ortodôntica foi analisada em estudos prévios (ANDRADE JR *et al.*, 2007; GARLET *et al.*, 2007; BROOKS *et al.*, 2009; TADDEI *et al.*, 2013). Em concordância com estes trabalhos, observamos expressão diferenciada de citocinas e marcadores de remodelação óssea nos sítios de tensão e compressão (GARLET *et al.*, 2007; BROOKS *et al.*, 2009). Esses dados conjuntamente demonstram que embora interconectados pelo ligamento periodontal, essas áreas apresentam um microambiente distinto e propício para a reabsorção e/ou deposição óssea.

O microambiente positivo para a reabsorção óssea no sítio de compressão está relacionado com a expressão aumentada de TNF- α e RANKL. O sistema RANK-RANKL/OPG é amplamente reconhecido como um dos principais fatores desencadeadores do recrutamento e diferenciação de osteoclastos. Além disso, o TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que modula a osteoclastogênese (AZUMA *et al.*, 2000; ANDRADE JR *et al.*, 2007). O TNF- α pode induzir a osteoclastogênese tanto pelo aumento da expressão de RANKL quanto de forma independente e direta (HOFBAUER *et al.*, 1999; AZUMA *et al.*, 2000; LAM *et al.*, 2000; KOBAYASHI *et al.*, 2000). No sítio de compressão, o aumento da degradação da matriz óssea é demonstrada pela maior expressão de CATK e MMP13, enzimas proteolíticas liberadas por osteoclastos (DELAISSÉ *et al.*, 2000; LOGAR *et al.*, 2007).

De forma esperada, o sítio de tensão apresentou expressão maior de moléculas envolvidas na atividade de osteoblastos, como RUNX2 e osteocalcina. A primeira é um fator de transcrição essencial para a osteogênese enquanto que a segunda é expressa em osteoblastos maduros (THIRUNAVUKKARASU *et al.*, 2000; YAMAGUSHI *et al.*, 2000; NEVE; CORRADO; CANTATORE, 2012).

7.2 O papel dos metabólitos da via 5-LO na remodelação óssea

O segundo artigo da presente tese utilizou o modelo de remodelação óssea induzido por força ortodôntica para investigar o papel dos LTs nesse processo. A aplicação da força sobre a unidade dentária resulta em pequeno trauma local e alteração do fluxo sanguíneo que pode promover na liberação do AA da membrana de alguns tipos celulares como macrófagos, leucócitos, mastócitos e osteoclastos (FUNK, 2001; KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006). A subsequente metabolização do AA pela via 5-LO resulta na produção de LTs (COLLET; STEWART, 1991; FUNK; CHEN, 2000; FUNK, 2001; HIKIJI *et al.*, 2009).

Nossos experimentos *in vivo* e *in vitro* demonstraram a participação dos LTs, no recrutamento e diferenciação de osteoclastos. Foi possível observar uma menor movimentação ortodôntica nos animais *knockout* para 5-LO. Corroborando com tais achados, estudos subsequentes utilizando o zileuton, inibidor da 5-LO, e o antagonista do receptor dos CysLTs, montelucaste, demonstraram também menor movimentação dentária. Como esperado, também observamos uma menor quantidade de osteoclastos nesses grupos. Portanto, o menor recrutamento e atividade dessas células são responsáveis pelo fenótipo observado. Esses achados estão de acordo com estudos prévios realizados em modelo de movimentação ortodôntica em ratos. Nesse estudo, observou-se a menor movimentação ortodôntica no grupo tratado com AA861, inibidor da 5-LO, contudo não foi realizada avaliação do número de osteoclastos (MOHAMMED *et al.*, 1989).

Nossos experimentos *in vitro* demonstraram que o estímulo com LTB₄ promoveu a maior formação de células TRAP⁺ quando associado com RANKL. Estudos *in vitro*, utilizando diferentes tipos de cultura de células, verificaram que os metabólitos da via 5-LO, especialmente LTB₄, promovem a diferenciação de osteoclastos TRAP⁺ e a reabsorção de matrizes calcificadas (MEGHJI *et al.*, 1988; GALLAWITZ *et al.*, 1993; GARCIA *et al.*, 1996b; FLYNN *et al.*, 1999). Contudo, a diferenciação de osteoclastos estimulada por LTB₄ ocorreu de forma independente de RANKL em experimentos *in vitro* empregando-se monócitos CD14⁺ (JIANG *et al.*, 2005). Embora estudos *in vitro* sejam extremamente relevantes, apresentam algumas desvantagens por não reproduzirem a complexidade do microambiente ósseo durante a remodelação. Poucos estudos avaliaram até o momento a ação dos LTs sobre o tecido ósseo *in vivo* (MOHAMMED *et al.*, 1989; GARCIA *et al.*, 1996a; HIKIJI *et al.*, 2008; HIKIJI *et al.*, 2009).

Na literatura é possível encontrar ampla gama de fármacos inibidores da via 5-LO. Alguns destes, BWA4C, IC230487 e AA861 foram previamente testados em modelos de remodelação óssea, *in vivo* e *in vitro* (MOHAMMED *et al.*, 1989; FRANCHI-MILLER; SAFFAR, 1995; ANDERSON *et al.*, 2001). Esses fármacos foram capazes de diminuir a movimentação ortodôntica, reabsorção óssea ou o número de células TRAP⁺, respectivamente. Esses dados corroboram os observados neste estudo com o tratamento com zileuton e montelucaste. Importante destacar que o zileuton e o montelucaste são fármacos comercialmente disponíveis e prescritos para o controle da asma (WERZ; STEINHILBER, 2006). O zileuton, embora utilizado em muitos países não é vendido no Brasil mas o montelucaste é prescrito para controle da asma em pacientes de todas as idades. Ambos os medicamentos são bem tolerados possuindo poucos efeitos adversos

(DIAMANT;SAMPSON, 2009; LEE *et al.*, 2012; CORNERSTONE THERAPEUTIC inc, 2013; MERCK SHARP AND DOHME, 2012). Contudo, dentre os possíveis efeitos adversos descritos na bula destes medicamentos não há referência a alterações ósseas.

A asma é uma doença crônica que exige controle medicamentoso por longos períodos. Embora os estudos apresentados nessa tese não sejam definitivos e exijam aprofundamento, é relevante se considerar a ocorrência de alterações na remodelação óssea em pacientes sob tratamento de zileuton e montelukaste.

Além do papel na asma, alguns estudos indicam o possível papel dos leucotrienos, especialmente LTB₄, em doenças ósseas associadas a maior reabsorção (KLOSTERHALFEN *et al.*, 1996; GURSEL *et al.*, 1997; PRADEEP *et al.*, 2007). Contudo, o emprego de inibidores da via 5-LO e do receptor de CysLTs tem pouco efeito nessas doenças e, por isso, tem se restringido ao tratamento da asma (WEINBLATT, 1992; WERZ; STEINHILBER, 2005; WERZ; STEINHILBER, 2006). Tendo em vista que o zileuton e o montelukaste foram efetivos na diminuição de reabsorção óssea no modelo apresentado, acreditamos que seja relevante aprofundar os estudos sobre seu efeito em doenças ósseas reabsortivas.

As análises da região do ligamento periodontal e osso alveolar submetido a força ortodôntica foram realizadas por qPCR. Foi observada a menor expressão de TNF- α , IL-10, RUNX2 em camundongos 5-LO^{-/-} e MT enquanto no grupo ZN houve a expressão reduzida de TNF- α , IL-10 e RUNX2. A expressão diminuída de moléculas como TNF- α , por seu papel na osteoclastogênese, podem ser parcialmente responsáveis pelo fenótipo observado (AZUMA *et al.*, 2000; KHOSLA, 2001; YOSHIMATZO *et al.*, 2006). A menor expressão de RUNX2, importante fator de transcrição de osteoblastos, indica que existe uma menor quantidade dessas células em animais *knock out* ou tratados (THIRUNAVUKKARASU *et al.*, 2000; YAMAGUSHI *et al.*, 2000). Tendo em vista que os osteoblastos são importantes fontes de RANKL a menor quantidade dessas células pode indiretamente atuar na osteoclastogênese via controle da expressão desta molécula. A IL-10 também pode modular a atuação do sistema RANK-RANKL/OPG inibindo a osteoclastogênese (MOHAMED *et al.*, 2007). Contudo, diferente do esperado, observamos uma menor expressão de IL-10 e OPG (resultado não mostrado) e em camundongos com menor quantidade de células TRAP⁺. Sendo assim, mais estudos são necessários para compreender o papel da IL-10 nesse modelo.

Na literatura já foi descrito que o TNF- α pode induzir a formação de LTs, pois atua na liberação da fosfolipase A₂ (HOECK *et al.*, 1993). Contudo, nossos experimentos *in vitro* demonstraram que após o tratamento com LTB₄ e LTD₄ ocorre uma maior expressão de TNF- α , indicando um possível mecanismo de ação de LTs na osteoclastogênese. Em concordância,

LTB₄ também aumenta a expressão desta citocina em cultura de fibroblastos sinoviais retirados de pacientes com artrite reumatóide (HUBER *et al.*, 1988; XU *et al.*, 2010).

Sendo assim, os experimentos apresentados nessa tese demonstraram a participação de CysLTs e do LTB₄ na remodelação óssea induzida por força mecânica e na diferenciação de células *in vitro*. Os resultados com CysLTs nos permitiram entrar com um pedido de patente junto ao INPI. Nesse pedido de patente reivindicamos o uso do montelucaste em tratamentos associados à remodelação óssea.

Os estudos aqui apresentados demonstraram a participação de LTs na remodelação óssea. O uso de fármacos, comercialmente disponíveis, inibidores da via 5-LO e de receptores de CysLTs, demonstrou que esses possuem também efeito no tecido ósseo. Esse efeito, não descrito nas bulas dos medicamentos, indica uma possível utilização terapêutica para esses medicamentos. Portanto, são necessários outros estudos empregando-se diferentes modelos de doenças ósseas reabsortivas.

8 CONCLUSÕES

1. A força de 0,35 N é a que apresenta máxima movimentação dentária sem efeitos colaterais, para o modelo de remodelação óssea desenvolvido.

2. Existe uma expressão diferenciada de citocinas e mediadores de remodelação óssea em sítios de compressão e tensão, a qual possivelmente está relacionada à criação de um microambiente favorável para reabsorção e/ou deposição óssea.

3. Os metabólitos da via 5-LO, LTB₄ e CysLTs, são capazes de induzir o recrutamento e ativação de osteoclastos, atuando desta forma, na estimulação da reabsorção óssea.

9 PERSPECTIVAS

Neste estudo desenvolveu-se um modelo de remodelação óssea induzida por força mecânica que foi posteriormente utilizado para avaliação do papel dos metabólitos da via da 5-LO nesse processo. Contudo, cabe destacar algumas perspectivas futuras para aprofundamento dos resultados obtidos:

- Determinar o fenótipo ósseo (por meio de microtomografia computadorizada, avaliando-se os ossos maxilares e ossos longos) dos animais deficientes da enzima 5-LO e também de animais tratados com zileuton e montelukaste;
- Confirmar o papel do LTB₄ e LTD₄ na osteoclastogênese por meio da utilização de inibidores específicos destas moléculas;
- Avaliar se o efeito do LTB₄ e LTD₄ na osteoclastogênese é dependente da liberação de TNF- α .

Considerando-se que os fármacos empregados neste estudo são prescritos o controle da asma, é relevante avaliar se o uso constante desses medicamentos pode influenciar no remodelamento ósseo fisiológico e mesmo na taxa de movimentação dentária em pacientes sob tratamento ortodôntico.

Estudos como esse contribuem para a compreensão dos mecanismos envolvidos na remodelação óssea em processos fisiológicos e patológicos. Neste sentido, uma perspectiva importante é avaliar a influência dos metabólitos da via 5-LO em outros modelos experimentais como, por exemplo, doença periodontal, osteoporose e metástase óssea.

REFERÊNCIAS

ALHASHIMI, N. *et al.* Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *American Journal Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, v.119, p.307-12, 2001.

ANDRADE JR, I. *et al.* The role of tumor necrosis factor receptor type 1 in orthodontic tooth movement. *Journal of Dental Research*, v.86, p.1089-1094, 2007.

AZUMA, Y. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry*, v.275, p.4858-4864, 2000.

BANIWAL, S.K. *et al.* Runx2 promotes both osteoblastogenesis and novel osteoclastogenic signals in ST2 mesenchymal progenitor cells. *Osteoporosis International*, v. 23, p.1399–1413, 2012.

BONEWALD, L.F. *et al.* Mice lacking 5-LO have increased bone thickness. *Advances in Experimental Medical Biology*, v.433, p.299-302, 1997a.

BONEWALD, L.F. *et al.* Mice which lack the functional gene for 5-lipoxygenase lose significantly less bone after ovariectomy. *Journal of Bone and Mineral Research*, v.12, p.112, 1997b.

BORGEAT, P.; HAMBERG, M.; SAMUELSSON, B. Transformation of arachidonic acid and homo-gamma-linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Monohydroxy acids from novel lipoxygenases. *The Journal of Biological Chemistry*, v.251, p.7816-7820, 1976.

BORISH, L.; AARONS, A.; RUMBYRT, J.; CVIETUSA, P.; NEGRI, J.; WENZEL, S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.97, p.1288-96, 1996.

BOYCE, B.F.; ROSENBERG, E.; DE PAPP, A.E; DUONG, L.E.T. The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. *European Journal of Clinical Investigation*, v.42, p.1332-1341, 2012.

BOYCE, B.F. *et al.* The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. *European Journal of Clinical Investigation*, v.42, p.1332-41, 2012.

BOYCE, B.F.; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 473, p.139–146, 2008.

BOYLE, W.J.; SCOTT, W.; LACEY, D.L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, v.423, p. 337-342, 2003.

BRAUN, T.; SCHETT, G. Pathways for Bone Loss in Inflammatory Disease. *Current Osteoporosis Report*, v.10, p.101–108, 2012.

- BROOKS, P.J. *et al.* Molecular Markers of Early Orthodontic Tooth Movement. *Angle Orthodontist*, v.79, p.1108-1113, 2009.
- CANTATORE, F.P.; CORRADO, A.; GRANO, M.; QUARTA, L.; COLUCCI, S.; MELILLO, N. Osteocalcin synthesis by human osteoblasts from normal and osteoarthritic bone after vitamin D3 stimulation. *Clinical Rheumatology*, v.23, p.490-495, 2004.
- CLAUDINO, M. *et al.* Down-regulation of expression of osteoblast and osteocyte markers in periodontal tissues associated with the spontaneous alveolar bone loss of interleukin-10 knockout mice. *Eur J Oral Sci*, v. 118, p. 19-28, 2010.
- CATTANEO, P.M.; DALSTRA, M.; MELSEN, B. The finite element method: a tool to study orthodontic tooth movement. *Journal of Dental Research*, v.84, p.428-433, 2005.
- CHEN, C.S.; SHELTER, J.R.; JOHNSON, E. N.; FUNK, C.D. Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene. *Nature*, v.372, p.179-182, 1994.
- CHEN, M. *et al.* Neutrophil-derived leukotriene B4 is required for inflammatory arthritis. *The Journal of Experimental Medicine*, v.203, p. 837-842, 2006.
- CLAUDINO, M. *et al.* The broad effects of the functional IL-10 promoter-592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3, and OPG expression and their association with periodontal disease outcome. *J. Leukoc. Biol.*, v.84, p.1565-73, 2008.
- COLLET, A.R.; STEWART, A.G. Eicosanoids: Physiology update and orthodontic implications. *Australian Orthodontic Journal*, v.12, p.116-123, 1991.
- CORNERSTONE THERAPEUTICS, ZYFLO CR. Cornerstone Therapeutics. 2013. Disponível em: <http://www.crtx.com/products/zyflo_cr%C2%AE.html>. Acesso em 11 nov. 2013.
- CUZZOCREA, S. *et al.* 5-Lipoxygenase modulates colitis through the regulation of adhesion molecule expression and neutrophil migration. *Laboratory Investigation*, v.85, p.808-822, 2005.
- DAVIDOVITCH, Z. *et al.* Neurotransmitters, cytokines and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dental Clinics of North America*, v.32, p.411-435, 1988.
- DAVIDOVITCH, Z.; KRISHNAN, V. On a path to unfolding the biological mechanisms of orthodontic tooth movement. *Journal of Dental Research*, v.88, p.597-608, 2009.
- DELAISSE, J.M. *et al.* Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clinica Chimica Acta*, v. 291, p. 223-234, 2000.
- DELMAS, P.D.; CHRISTIANSEN, C.; MANN, K.G.; PRICE, P.A. Bone Gla protein (osteocalcin) assay standardization report. *Journal of Bone Mineral Research*, v.5, p.5-11, 1990.
- DIAMANT, Z.; MANTZOURANIS, E.; BJERMER, L. Montelukastin the treatment of asthma and beyond. *Expert Rev. Clin. Immunol.*, v.5, p.639-658, 2009.

- DIAMANT, Z.; SAMPSON, A.P. Anti-inflammatory mechanisms of leukotriene modulators. *Clinical and Experimental Allergy*, v.29, p.1449–1453, 1999.
- DRESNER-POLLAK, R.; GELB, N.; RACHMILEWITZ, D.; KARMELI, F. Interleukin 10-deficient mice develop osteopenia, decreased bone formation, and mechanical fragility of long bones. *Gastroenterology*, v.127, p. 792–801, 2004.
- ENOMOTO, H. *et al.* Induction of Osteoclast Differentiation by Runx2 through Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL) and Osteoprotegerin Regulation and Partial Rescue of Osteoclastogenesis in Runx2, Mice by RANKL Transgene. *The Journal of Biological Chemistry*, v.278, p.23971–23977, 2003.
- EVANS, K.; FOX, S.W. Interleukin-10 inhibits osteoclastogenesis by reducing NFATc1 expression and preventing its translocation to the nucleus. *BMC Cell Biology*, v.8, p.1-9, 2007.
- FLYNN, M.A. *et al.* Avian osteoclast cells are stimulated to resorb calcified matrices by and possess receptors for leukotriene B4. *Calcified Tissue International*, v.64, p.154-159, 1999.
- FORD-HUTCHINSON, A.W.; GRESSER, M.; YOUNG, R. N. 5-LIPOXYGENASE. *Annual Review of Biochemistry*, v.63, p.383-417, 1994.
- FRANCHI-MILLER, C.; SAFFAR, L. The 5-lipoxygenase inhibitor BWA4C impairs osteoclastic resorption in synchronized model of bone remodeling. *Bone*, v.17, p.185-191, 1995.
- FUNK, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosinoids therapy. *Science*, v.294, p.1871-1875, 2001.
- FUNK, C.D. The molecular biology of mammalian lipoxygenases and the quest for eicosanoid functions using lipoxygenase-deficient mice. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1304, p.65-84, 1996.
- FUNK, C.D.; CHEN, X. 5-Lipoxygenase and Leukotrienes Transgenic Mouse and Nuclear Targeting Studies. *Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v.161, p.S120-S124, 2000.
- GALLWITZ, W.E. *et al.* 5-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid stimulate isolated osteoclasts to resorb calcified matrices. *Journal of Biological Chemistry*, v.268, p.1087-1094, 1993.
- GARCIA, C. *et al.* Effects of synthetic peptido-leukotrienes on bone resorption *in vitro*. *Journal of Bone and Mineral Research*, v.11, p. 521-29, 1996a.
- GARCIA, C. *et al.* Leukotriene B4 stimulates osteoclastic bone resorption both *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Bone and Mineral Research*, v.11, p.1619-1627, 1996b.

GARCÍA-MARCOS L.; SCHUSTER A. New perspectives for asthma treatment: anti-leukotriene drugs. *Pediatric Allergy and Immunology*, v.10, p.77-88, 1999.

GATTI, D. *et al.* Allergy and the bone: unexpected relationships. *Annals of Allergy Asthma Immunology*, v.107, p.202–206, 2011.

GURSEL, T. ; FIRAT, S. ; ERCAN, Z. Increased serum leukotriene B4 level in the active stage of rheumatoid arthritis in children, *Prostaglandins, Leukot and Essent Fatty Acids*, v.56, p.205-207, 1997.

HAEGGSTRÖM, J. Z.; WETTERHOLM, A. Enzymes and receptors in the leukotriene cascade. *Cellular and Molecular. Life Sciences*, v.59, p. 742–753, 2002.

HENNEMAN, S.; VON DEN HOFF, J.W.; MALTHA, J.C. Mechanobiology of tooth movement. *European Journal of Orthodontics*, v.30, p.299–306, 2008.

HIKIJ, H. *et al.* The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. *Progress in Lipid Research*, v.47, p.107-126, 2008.

HOECK, W.G; RAMESHA, W.G; CHANG, D.J.; FAN, N.; HELLER, R.A. Cytoplasmic phospholipase A2 activity and gene expression are stimulated by tumor necrosis factor: dexamethasone blocks the induced synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v.90, p.4475-9, 1993.

HOFBAUER, L.C.; LACEY, D.L.; DUNSTAN, C.R.; SPELSBERG, T.C.; RIGGS, B.L.; KHOSLA, S. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone*, v.25 p.255-9, 1999.

HONG, M.; WILLIAMS, H.; JIN, C.; PIKE, W. The inhibitory effect of interleukin-10 on mouse osteoclast formation involves novel tyrosine- phosphorylated proteins. *Journal of Bone and Mineral Research*, v.15, p. 911-918, 2000.

HUBER, M.; BEUTLER, B.; KEPPLER, D. TNF- α stimulates leukotriene production in vivo. *European Journal of Immunology*, v.18, p.2085-2088, 1988.

JIANG, J. *et al.* LTB4 can directly stimulate human osteoclast formation from PBMC independent of RANKL. *Artificial Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnology*, v.33, n.4, p.391–403, 2005.

KANZAKI, H.; CHIBA, M.; SHIMIZU, Y.; MITANIL, H. *Journal of Dental Research*, v. 80, p.887-891, 2001.

KHOSLA, S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology*, v.142, p.5050–5055, 2001.

KLOSTERHALFEN, B. *et al.* Local and systemic inflammatory mediator release in patients with acute and chronic posttraumatic osteomyelitis. *Journal Trauma*, v.40, p.372-378, 1996.

KOBAYASHI, B.K. *et al.* Tumor Necrosis Factor α Stimulates Osteoclast Differentiation by a Mechanism Independent of the ODF/RANKL–RANK Interaction. *Journal of Experimental Medicine*, v.191, p.275–285, 2000.

KOMORI, T. *et al.* Targeted Disruption of *Cbfa1* Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, v. 89, p.755–764, 1997.

KRISHNAN, V.; DAVIDOVITCH, Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, v.129, p.1-32, 2006.

LACEY, D.L. *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, v. 93, p.165–176, 1998.

LAM, J. *et al.* TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *The Journal of Clinical Investigation*, v.106, p.1481-1488, 2000.

LASCELLES, B.D.; KING, S.; ROE S.; MARCELLIN-LITTLE, D.J.; JONES, S. Expression and activity of COX-1 and 2 and 5-LOX in joint tissues from dogs with naturally occurring coxofemoral joint osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*, v.27, p.1204-8, 2009.

LEE, J.M. *et al.* 5-Lipoxygenase mediates RANKL-induced osteoclast formation via the cysteinyl leukotriene receptor 1. *The Journal of Immunology*, v.189, p.5284-92, 2012.

LERNER, U. Osteoblasts, osteoclasts, and osteocytes: unveiling their intimate-associated responses to applied orthodontic forces. *Seminars of orthodontics*, v.18, p.237-248, 2012.

LIU, D.; YAO, S.; WISE, G.E. Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle. *European Journal of Oral Sciences*, v.114, p.42–49, 2006.

MASELLA, R.S.; MEISTER, M. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopaedics*, v.129, p.458-68, 2006.

MATHIS, S.P.; JALA, V.R.; LEE, D.M.; HARIBABU, B. Nonredundant roles for leukotriene B4 receptors BLT1 and BLT2 in inflammatory arthritis. *The Journal of Immunology*, v.185, p.3049-56, 2010.

MEGHJI, S. *et al.* Stimulation of bone resorption by lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. *Prostaglandins*, v.36, p.139-149, 1988.

MELSEN, B. Biological reaction of alveolar bone of orthodontic tooth movement. *The angle orthodontist*, v.69, p.155-157, 1999.

MERCK Sharp & Dohme Corp, SINGULAIR. Merck Sharp & Dohme Corp. 2013. Disponível em: <http://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/s/singulair/singulair_ppi.pdf>. Acesso em 16 nov 2013.

- MOHAMMED, A.H.; TTAKIS, D.N.; DZIAK, R. Leukotrienes in orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, v.95, p.231-237, 1989.
- MOHAMED, S. *et al.* Interleukin-10 inhibits RANKL-mediated expression of NFATc1 in part via suppression of c-Fos and c-Jun in RAW264.7 cells and mouse bone marrow cells. *Bone*, v. 41, p.592–602, 2007.
- NAKAMURA, K; SAHARA, N.; DEGUCHI, T. Temporal changes in the distribution and number of macrophage-lineage cells in the periodontal membrane of the rat molar in response to experimental tooth movement. *Archives of Oral Biology*, v.46, p. 593–607, 2001.
- NAKASHIMA, T.; TAKAYANAGI, H. New regulation mechanisms of osteoclast differentiation. *Annals of New York academy of sciences*, v.1240, p. E13–E18, 2012.
- NEVE, A.; CORRATO, A.; CANTATORE, F. Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects. *Journal of Cellular Physiology*, v.228, p.1149-53, 2012.
- PRADEEP, R. *et al.* Gingival crevicular fluid levels of leukotriene B4 in periodontal health and disease. *Journal of Periodontology*, v.78, p.2325-2330, 2007.
- RAGGATT, L.J.; PARTRIDGE, N.C. Cellular and molecular mechanism of bone remodeling. *The Journal of Biological Chemistry*, v.285, p. 25103-25108, 2010.
- ROBERTS, W.E.; HUJA, S.; ROBERTS, J.A. Bone modeling: biomechanics, molecular mechanisms, and clinical perspectives. *Seminars of Orthodontics*, v.10, p.123-161, 2004.
- SÁNCHEZ, G.A.; MIOZZA, V.A.; DELGADO, A.; BUSCH L.J. *Journal of Periodontal Research*, 2013 [Epub ahead of print].
- SIMONET, W.S. *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, v.89, p.309–319, 1997.
- SODEK, J.; MCKEE, M. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology*, v. 24, p. 99–126, 2000.
- SUDA, T.; TAKAHASHI, N.; UDAGAWA, N.; JIMI, E.; GILLESPIE, M.T.; MARTIN, T.J. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.*, v.20, p.345-57, 1999.
- TADDEI, S.R.; MOURA, A.P.; ANDRADE, I. JR.; GARLET, G.P.; GARLET T.P.; TEIXEIRA, M.M.; DA SILVA, .TA. Experimental model of tooth movement in mice: a standardized protocol for studying bone remodeling under compression and tensile strains. *Journal of Biomechanics*, v.45, p.2729-2735, 2012.

TADDEI, S.R. *et al.* The effect of CCL3 and CCR1 in bone remodeling induced by mechanical loading during orthodontic tooth movement in mice. *Bone*, v.52, p. 259-267.

TAKAHASHI, N.; AKATSU, T.; UDAGAWA, N.; SASAKI, T.; YAMAGUCHI, A.; MOSELEY, J.M.; MARTIN, T.J.; SUDA, T. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology*, v.123, p. 2600-2602, 1988.

THIRUNAVUKKARASU, K. The osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 contributes to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and Function. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 25163–25172, 2000.

WANG, D.; DUBOIS, R.N. Eicosanoids and cancer. *Naturals Reviews Cancer*, v.10, p.181-193, 2010.

WEINBLATT, M.E. *et al.* Zileuton, a 5-lipoxygenase inhibitor in rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, v.19, p.1537-1541, 1992.

WERZ, O.; STEINHILBER, D. Development of 5-lipoxygenase inhibitors-lessons from cellular enzyme regulation. *Biochemical Pharmacology*, v.70, p.327–333, 2005.

WERZ, O.; STEINHILBER, D. Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. *Pharmacology and Therapeutics*, v.112, p.701-18, 2006.

WOSZCZEK, G.; CHEN, L.Y.; NAGINENI, S.; SHELHAMER, J.H. IL-10 inhibits cysteinyl leukotriene induced activation of human monocytes and monocyte-derived dendritic cells. *The journal of Immunology*. v.180, p.7597–7603, 2008.

WU, Y.; ZHOU, C.; TAO, J.; LI, S. Montelukast prevents the decrease of interleukin-10 and inhibits NF-kappaB activation in inflammatory airway of asthmatic guinea pigs. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 84, p.531-7, 2006.

XIONG, J.; MELDA, O.; JILKA, R.; WEINSTEIN, R.; MANOLAGAS, S.; O'BRIEN, C. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nature Medicine*, v.17, p.1235-1241, 2011.

XU, L.X; KUKITA, T.; KUKITA, A.; OTSUKA, T.; YOSHIYUKI, N.; IIJIMA, T. Interleukin-10 selectively inhibits osteoclastogenesis by inhibiting differentiation of osteoclast progenitors into preosteoclast-like cells in rat bone marrow culture system. *Journal of cellular physiology*, v.165, p.624-629, 1995.

XU, S. Regulation of TNF α and IL1 β in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by leukotriene B4. *Rheumatology International*, v.30, p.1183–1189, 2010.

YAMAGUCHI, A.; KOMORI, T.; SUDA, T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocrine Reviews*, v.21, p.393–411, 2000.

YAMASHITA, T.; TAKAHASHI, N.; UDAGAWA, N. New roles of osteoblasts involved in osteoclast differentiation. *World Journal of Orthopaedics*, v.3, p.175-181, 2012.

YASUDA, H. *et al.* Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin(OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*, v.39, p.1329–1337, 1998.

YOSHIMATSU, M. *et al.* Experimental model of tooth movement by orthodontic force in mice and its application to tumor necrosis factor receptor-deficient mice. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, v.24, p.20–27, 2006.

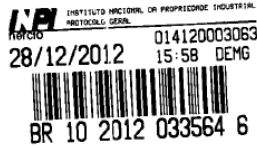
ANEXO A: Pedido de Patente

Os resultados obtidos com os experimentos utilizando o fármaco montelukaste, nos permitiram fazer o depósito da patente, abaixo descrita, intitulada “USO DE MONTELUCASTE EM TRATAMENTOS ENVOLVENDO REABSORÇÃO ÓSSEA” no INPI, Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

RESUMO

USO DE MONTELUCASTE EM TRATAMENTOS ENVOLVENDO REABSORÇÃO ÓSSEA

A presente invenção consiste no uso do montelukaste em tratamentos envolvendo reabsorção óssea ou doenças ósseas reabsortivas com ou sem inflamação. Os resultados demonstram que a movimentação dentária e o número de osteoclastos são reduzidos nos animais *knockout* para 5-lipoxigenase (5-LO^{-/-}) e nos tratados com montelukaste, se comparados, respectivamente, com os animais selvagens e aqueles tratados com veículo. Portanto, o fármaco, ao agir como antagonista do receptor de leucotrienos (LTs), um dos metabólitos derivados da via 5-lipoxigenase (5-LO), pode regular negativamente o recrutamento de osteoclastos e, conseqüentemente, reduzir a reabsorção óssea e também a movimentação dentária ortodôntica.



< Uso exclusivo do INPI >

Espaço reservado ao protocolo

Espaço para etiqueta

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: Universidade Federal de Minas Gerais
1.2 Qualificação: Instit. de Ensino e Pesquisa
1.3 CNPJ/CPF: 17217985000104
1.4 Endereço Completo: Av. Antonio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, Brasil
1.5 CEP: 31270-901 1.6 Telefone: (31) 3409-4774 1.7 Fax: (31) 3409-6430
1.8 E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

continua em folha anexa

2. Natureza: Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: PATENTE DE INVENÇÃO

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

USO DE MONTELUCASTE EM MEDICAMENTOS PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS ÓSSEAS REABSORATIVAS

continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido Nº Data de Depósito:

5. Prioridade: interna unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: TARCILIA APARECIDA SILVA 6.3 CPF: 864.431.786-53
6.2 Qualificação: PROFESSORA 6.4 Endereço completo: RUA DESEMB. PAULA MOTA, 1665, APTO. 901, BAIRRO OURO PRETO, BELO HORIZONTE, MG
6.5 CEP: 31.320-000 6.6 Telefone: 31 3409-4774 6.7 Fax: 31 3409-6430
6.8 E-Mail: patentes@ctit.ufmg.br

continua em folha anexa



7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

10. Listagem de seqüências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

- Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: n° de CDs ou DVDs (original e cópia).
 Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
 Listagem de seqüências em formato impresso: fls.
 Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o n° total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento	01 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	12 fls.
<input type="checkbox"/>	11.2 Procuração	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	01 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	03 fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	01 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) <i>meio de Depoimentos, Anexo de Inventores, Portaria</i>				04 fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 22 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Belo Horizonte, 28/12/12
Local e Data


Assinatura e Carimbo

Prof. Renato de Lima Santos
Pró-Reitor de Pesquisa / UFMG
Delegação de Competência
Portaria nº 042 / 2010

ANEXO DE DEPOSITANTES

**Título: USO DE MONTELUCASTE EM MEDICAMENTOS PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS
ÓSSEAS REABSORATIVAS**

Nome: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG

Qualificação: Fundação

CNPJ / CPF / Número INPI: 21949888000183

Endereço Completo: Rua Raul Pompéia, 101, 11º andar, Bairro São Pedro, Belo Horizonte - MG

CEP: 30.330-080

Telefone: (31) 3409-4774

FAX: 31 3409-6430

E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

Nome: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

Qualificação: Instituição de Ensino e Pesquisa

CNPJ / CPF / Número INPI: 17.178.195/001481

Endereço Completo: Rua Dom José Gaspar, 500 - Coração Eucarístico, Belo Horizonte - MG

CEP: 30535-610

Telefone: 31 3409-4774

FAX: 31 3409-6430

E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

ANEXO DE INVENTORES

Título: USO DE MONTELUCASTE EM MEDICAMENTOS PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS ÓSSEAS REABSORATIVAS

Nome: ADRIANA PEDROSA MOURA

Qualificação: PESQUISADORA

CPF: 008.191.795-31

Endereço Completo: RUA GONÇALVES DIAS, 2299, APTO. 703, BAIRRO LOURDES, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 30.140-052

Telefone: 31 3409-4774

FAX: 31 3409-6430

E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

Nome: MILA FERNANDES MOREIRA MADEIRA

Qualificação: PESQUISADORA

CPF: 000.725.816-03

Endereço Completo: RUA PAULISTA, 1090, APTO. 408, BAIRRO FERNÃO DIAS, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 31.910-340

Telefone: 31 3409-4774

FAX: 31 3409-6430

E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

Nome: DANIELLE DA GLÓRIA DE SOUZA

Qualificação: PROFESSORA

CPF: 033.633.746-90

Endereço Completo: RUA DESEMB. JOSÉ SATYRO, 531/303, BAIRRO CASTELO, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 30.840-490

Telefone: 31 3409-4774

FAX: 31 3409-6430

E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

Nome: CELSO MARTINS QUEIROZ JÚNIOR

Qualificação: PESQUISADOR

CPF: 065.081.796-67

Endereço Completo: RUA FRANÇA, 189, BAIRRO NAÇÕES UNIDAS, SABARÁ, MG

CEP: 34.590-110

Telefone: 31 3409-4774

FAX: 31 3409-6430

E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

Nome: SILVANA RODRIGUES DE ALBUQUERQUE TADDEI

Qualificação: PESQUISADORA

CPF: 931.166.245-34

Endereço Completo: RUA JARDIM ALTO DO ITAIGARA, 183, APTO. 1502, BAIRRO ITAIGARA, SALVADOR, BA

CEP: 41815-190

Telefone: 31 3409-4774

FAX: 31 3409-6430

E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

FUNDAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA - UFMG

ANEXO DE INVENTORES**Título: USO DE MONTELUCASTE EM MEDICAMENTOS PARA TRATAMENTO DE DOENÇAS
ÓSSEAS REABSORPTIVAS**

Nome: MAURO MARTINS TEIXEIRA

Qualificação: PROFESSOR

CPF: 695251886

Endereço Completo: RUA ROQUETE MENDONÇA, 417, BAIRRO SÃO LUIZ, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 31.275-030

Telefone: 31 3409-4774

FAX: 31 3409-6430

E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

Nome: ILDEU ANDRADE JUNIOR

Qualificação: PROFESSOR

CPF: 909.569.826-20

Endereço Completo: RUA ARTUR DE SÁ, 765, APTO 702, BAIRRO UNIÃO, BELO HORIZONTE, MG

CEP: 31.170-710

Telefone: 31 3409-4774

FAX: 31 3409-6430

E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

ANEXO B: Aprovação comitê de ética em experimentação animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 55/2011**, relativo ao projeto intitulado "***O papel dos metabólitos da via da 5-LO na movimentação dentária ortodôntica em camundongos***", que tem como responsável(is) **Tarcília Aparecida Silva**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **10/ 08/2011**.

Este certificado expira-se em **10/ 08/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 55/2011**, related to the project entitled "***The role of 5-LO metabolites in orthodontic tooth movement in mice***", under the supervisors of **Tarcília Aparecida Silva**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 10, 2011**.

This certificate expires in **August 10, 2016**.

Belo Horizonte, 12 de Agosto de 2011.

Prof^a. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)