

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-graduação em Odontologia

Carina Cristina Montalvany Alves

**A INFLUÊNCIA DOS ANTI-HIPERTENSIVOS INIBIDORES E
BLOQUEADORES DA ANGIOTENSINA II NA REMODELAÇÃO ÓSSEA
INDUZIDA POR FORÇA ORTODÔNTICA EM CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte

2013

Carina Cristina Montalvany Alves

**A INFLUÊNCIA DOS ANTI-HIPERTENSIVOS INIBIDORES E
BLOQUEADORES DA ANGIOTENSINA II NA REMODELAÇÃO ÓSSEA
INDUZIDA POR FORÇA ORTODÔNTICA EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação - Mestrado, da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia - Área de Concentração Ortodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ildeu Andrade Júnior

Coorientadora: Profa. Ms. Adriana Pedrosa Moura

Belo Horizonte

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

G873a Alves, Carina Cristina Montalvany
A influência dos anti-hipertensivos inibidores e bloqueadores da
angiotensina II na remodelação óssea induzida por força ortodôntica em
camundongos / Carina Cristina Montalvany Alves. Belo Horizonte, 2013.
64f.: il.

Orientador: Ildeu Andrade Júnior
Coorientadora: Adriana Pedrosa Moura
Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

1. Remodelação óssea. 2. Movimentação dentária. 3. Angiotensina. 4.
Hipertensão. I. Andrade Júnior, Ildeu. II. Moura, Adriana Pedrosa. III. Pontifícia
Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em
Odontologia. IV. Título.

SIB PUC MINAS

CDU: 616.314-089

Carina Cristina Montalvany Alves

**A INFLUÊNCIA DOS ANTI-HIPERTENSIVOS INIBIDORES E BLOQUEADORES
DA ANGIOTENSINA II NA REMODELAÇÃO ÓSSEA INDUZIDA POR FORÇA
ORTODÔNTICO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Ortodontia.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA:

- 1- Prof. Dr. Camilo de Aquino Melgaço – UNINCOR
- 2- Prof. Dr. Martinho Campolina Rebello Horta – PUC Minas
- 3- Prof. Dr. Ildeu Andrade Júnior – PUC Minas

DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 27 de novembro de 2013

A dissertação, nesta identificada, foi aprovada pela Banca Examinadora

Belo Horizonte, 21 de janeiro de 2014

Prof. Dr. Ildeu Andrade Júnior
Orientador

Prof. Dr. Martinho Campolina Rebello Horta
**Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Odontologia - Mestrado**

**À minha família,
pela dedicação, amor, companheirismo e exemplo.**

AGRADECIMENTOS

Á Deus por proporcionar todas as oportunidades na minha vida e abençoar toda a minha trajetória, colocando pessoas maravilhosas no meu caminho.

Aos meus pais Carlos e Magda pelo apoio incondicional, amor e dedicação em todos esses anos. Vocês são os meus maiores exemplos, a minha fortaleza. Á vocês dedico essa conquista.

Ao meu noivo Sérgio por todos os anos de companheirismo, carinho, apoio e compreensão. Sem você o caminho teria sido mais difícil. A minha vitória também é a sua.

A todos os meus familiares que mesmo de longe torciam e apoiavam os meus passos.

Aos amigos que sempre se fizeram presentes, caminhando junto sempre com palavras de incentivo em momentos difíceis.

Ao meu orientador Prof. Ildeu Andrade Jr, pela confiança desde o início do curso, orientação, palavras amigas e inúmeras oportunidades. A você serei eternamente grata.

Á minha coorientadora Dra. Adriana Pedrosa Moura, pela amizade, apoio e ensinamentos que levarei para toda a vida.

Á Profa. Tarcília Aparecida, que abriu as portas do seu laboratório para eu pudesse realizar minha pesquisa. Obrigada pela confiança e orientação.

Á toda equipe do laboratório da UFMG, em especial Marcel Abraão, Soraia Macari e Izabella Lucas pela amizade, acolhimento e ajuda em todos os momentos.

Ao Prof. Mauro Martins pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório e meios para realizar essa pesquisa.

Ao Prof. Dauro Douglas Oliveira pelas inúmeras oportunidades oferecidas durante o curso, pelas palavras de incentivo e pelo exemplo de docente e profissional.

Aos professores Tarcísio Junqueira e Flávio Almeida pelo incentivo desde o curso de Aperfeiçoamento e por todos os ensinamentos durante o Mestrado.

Aos professores Armando Lima, José Eymard, Heloísio Leite, José Maurício Vieira e Hélio Brito pelos conhecimentos transmitidos. Vocês foram fundamentais para minha formação.

Ao professor Bernardo Souki pelo exemplo de profissional e pela dedicação ao curso. Você foi essencial para todos nós.

Aos professores Paulo Alencar e Martinho Campolina por abrir as portas do laboratório de Patologia da PUC Minas.

Aos colegas das turmas XI, XII, XIV e XV pela amizade, cumplicidade e convivência ao longo desses anos.

Aos meus queridos amigos – irmãos turma XIII, Carolina Morsani, Débora Martins, Gabriela Godoy, Giselle Caballero, Maria Olívia Rocha e Thiago Motta. Sem vocês a caminhada seria mais árdua. Vocês fizeram dessa experiência a melhor e mais prazerosa possível. Agradeço a todos pela amizade e apoio. Vocês farão muita falta. “A amizade não se busca, não se sonha, não se deseja; ela exerce-se (é uma virtude).” *Simone Weil*.

Aos pacientes e funcionários da PUC Minas, em especial, Antônia, Maria Ângela, Ana Paula, Alcides, Diego, Vívian e Renata. Agradeço a dedicação de vocês que fazem desse curso ainda mais especial.

De tudo ficaram três coisas... A certeza de que estamos começando. A certeza de que é preciso continuar. A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar. Façamos da interrupção um novo caminho. Da queda um passo de dança, Do medo uma escada. Do sonho uma ponte. Da procura um encontro (SABINO, 2001).

RESUMO

Introdução: A Angiotensina II (ANG II) é um mediador cardiovascular que ativa uma série de cascatas de sinalização em diversos processos fisiológicos e patológicos do organismo. Seus receptores AT1 e AT2 são encontrados em diversos tipos celulares, incluindo osteoclastos e osteoblastos. O objetivo desse trabalho foi investigar se os bloqueadores ou inibidores da ANG II, amplamente utilizados no tratamento da hipertensão arterial, influenciam a movimentação dentária ortodôntica (MDO). **Métodos:** Uma mola ortodôntica foi colada em 45 camundongos C57/selvagem. Esses animais foram divididos aleatoriamente em três grupos: (VH) tratados com veículo (água potável); LOS, (Losartan, um bloqueador de receptor de ANG II) e CAP (Captopril, um inibidor da síntese de ANGII). A MDO e o número de osteoclastos foram determinados através de análise histopatológica. A pressão arterial foi aferida antes e durante o período experimental. A expressão de mediadores pró-inflamatórios foi avaliada através de PCR em tempo real. **Resultados:** A MDO e o número de células TRAP-positivas foram significativamente reduzidos nos grupos tratados com LOS e CAP quando comparados ao grupo controle VH. Os níveis de expressão de RANK e RANKL encontravam-se diminuídos para o grupo experimental, enquanto os níveis de OPG apresentaram-se aumentados para o mesmo grupo. **Conclusão:** Este estudo sugere que drogas anti-hipertensivas, que bloqueiam a ação ou inibem a síntese de ANG II, reduzem o número e a atividade dos osteoclastos. Assim sendo, a ANG II está diretamente relacionada com o recrutamento de osteoclastos, reabsorção óssea e, conseqüentemente, a MDO. No futuro, o bloqueio ou a inibição da ANG II pode ser usado para a modulação da MDO.

Palavras-chave: Remodelação óssea. Movimentação dentária. Angiotensina II, Hipertensão.

ABSTRACT

Introduction: Angiotensin II (ANG II) is a well - known systemic regulator of cardiovascular system and body fluid homeostasis. This mediator binds to two types of receptors: AT1 and AT2. These receptors can be found in many cell types including osteoclasts and osteoblasts. The aim of this study was to investigate whether ANG II inhibitors, widely used for hypertension treatment, influences orthodontic tooth movement (OTM). **Methods:** An orthodontic appliance was bonded in 45 wild type mice. The animals were randomly divided into 3 groups: VH (vehicle treated mice); LOS (losartan, ANG II receptors blockers) and CAP (Captopril, ANG II converting enzyme). The OTM and the number of TRAP-positive cells were determined by histopathological analysis. Blood pressure was measured before and during experimental period. The expression of mediators involved in bone remodeling was evaluated by real-time polymerase chain reaction. **Results:** OTM and TRAP-positive cells were significantly reduced in CAP and LOS animals when compared with VH mice. The expression of RANK and RANKL were lower in experimental mice than in control group, while the OPG levels were higher. **Conclusion:** ANG II inhibitors decrease osteoclast differentiation and activity leading to reduced tooth movement. The ANG pathway is positively associated with osteoclast recruitment, activity and OTM. The blockage of ANG II pathway might be used for future modulation of the extent of OTM.

Keywords: Bone Remodeling. Tooth movement. Angiotensin II. Hypertension.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA): Mecanismo de controle da pressão arterial.....	27
Figura 2: Fluxograma representativo da divisão de animais de forma aleatória em três grupos: VH, LOS e CAP.....	30
Figura 3: Anestesia dos animais e mesa cirúrgica desenhada para restrição dos movimentos do camundongo.....	31
Figura 4: Equipamentos utilizados no experimento.....	32
Figura 5: Posicionamento do animal para colagem da mola ortodôntica.....	33
Figura 6: Colagem da mola no primeiro molar superior direito.....	33
Figura 7: Calibração da força ótima utilizada para indução da MDO.....	34
Figura 8: Fluxograma representativo da divisão de animais quanto ao tempo para sacrifício e análise histopatológica.....	35
Figura 9: Desenho esquemático do preparo das peças para o processamento histológico.....	36
Figura 10: Mensuração da MDO através do programa Image J.....	38
Figura 11: Distribuição de animais para extração do mRNA e análise através de PCR em tempo real.....	39
Figura 12: Fluxograma representativo dos tempos utilizados para a mensuração da pressão arterial dos animais.....	40
Figura 13: Imagem do equipamento utilizado para aferir a pressão dos animais....	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVEATURAS

ANG II – Angiotensina II

SRA – Sistema renina-angiotensina

ECA- Enzima conversora de angiotensina

MDO – Movimentação dentária ortodôntica

ARBs – Bloqueadores dos receptores de angiotensina

AT1 – Receptor de angiotensina II tipo 1

AT2 – Receptor de angiotensina II tipo 2

TNF- α – Fator de necrose tumoral alpha

RANKL – Receptor ativador do fator nuclear Kappa-B ligante

OPG – Osteoprotegerina

RANK – Receptor ativador do fator nuclear Kappa-B

CCL2 – Quimiocina CC ligante 2, previamente conhecida como MCP-1 (proteína quimiotática de monócito-1)

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

HDL – Lipoproteína de alta densidade

AMPC – Adenosina de monofosfato cíclico

RUNX2 – Fator de transcrição relacionado ao RUNT 2

LOS – Losartan

CAP – Captopril

VH – Veículo

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa

TRAP – Fosfatase ácida resistente ao tartarato

EDTA – Ácido etileno diamino tetracético

PH – Potencial hidrogeniônico

g – grama

mg – miligramas

mm – milímetros

cm – centímetros

μ m – micrômetros

% – Porcentagem

PBS- Solução salina fosfato tampão

JAC – Junção amelo-cementária

PCR-TR – Reação em cadeia da polimerase pelo método quantitativo em tempo real

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Delineamento experimental.....	29
3.2 Protocolo experimental.....	29
3.2.1 <i>Administração do Veículo, Losartan e Captopril</i>	30
3.2.2 <i>Instalação do aparelho ortodôntico</i>	30
3.2.3 <i>Distribuição dos animais para análise histopatológica</i>	34
3.3 Processamento Histológico	35
3.4 Análise histomorfométrica	36
3.4.1 <i>Contagem de células TRAP-positivas</i>	36
3.4.2 <i>Mensuração da movimentação dentária</i>	37
3.5 Distribuição de animais para extração de mRNA e análise através de PCR em tempo real	38
3.5.1 <i>PCR em tempo real</i>	39
3.6 Mensuração da pressão sanguínea sistêmica.....	39
3.7 Análise estatística	41
4 ARTIGO	42
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXO A - Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG.....	64

1 INTRODUÇÃO

Anualmente, 16 milhões de pessoas são diagnosticadas como portadores de doenças cardiovasculares, que são a principal causa de morte em todo o mundo (ROSAMOND et al., 2008). Entre elas destaca-se a hipertensão arterial, que pode ser causada tanto por fatores genéticos quanto ambientais (SHIMIZU et al., 2008). De acordo com a Associação Americana de Cardiologia, mais de 74 milhões de Americanos possuem hipertensão arterial e cerca de 84% desses pacientes fazem uso de pelo menos uma droga anti-hipertensiva para controle da doença. No Brasil essa proporção é menor: 22,7% dos brasileiros são hipertensos e aproximadamente 60% faz uso de anti-hipertensivos de acordo com o Ministério da Saúde.

O tratamento da hipertensão deve começar com uma mudança do estilo de vida. Uma vez que essas mudanças não consigam promover o controle da pressão arterial, o uso de medicação se faz necessário. Existem cinco tipos de drogas que podem ser administradas isoladas ou concomitantemente, sendo elas: diuréticos, bloqueadores beta - adrenérgicos, bloqueadores de canais de cálcio, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), e inibidores do receptor de angiotensina II (ARBs) (AGÊNCIA DE PESQUISA E QUALIDADE EM CUIDADOS COM A SAÚDE, 2007 a 2009).

Vários mecanismos biológicos estão envolvidos na regulação da pressão sanguínea, sendo um dos mais importantes, o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA). O SRA é um dos principais reguladores da homeostase do organismo uma vez que promove o controle da pressão arterial garantindo um equilíbrio do volume de fluido corporal, balanço de sódio e tônus vascular (CLAYTON et al., 1998). Basicamente essa cascata enzimática é iniciada pela clivagem do angiotensinogênio, formado no fígado, pela renina para formar a angiotensina I (ANG I). A ANG I sofre ação da ECA para gerar a angiotensina II (ANG II), que é o principal hormônio efetivo do SRA (HUNYADY; CATT, 2006; NOUET; NAHMIAS, 2000) (Figura 1).

A ANG II pode se ligar a dois tipos de receptores: AT1 e AT2, os quais já foram encontrados em vários tipos celulares incluindo os osteoclastos e osteoblastos (PAUL; POYAN; KREUTZ, 2006; ABEDIN; TINTUT; DEMER, 2005; HUNYADY; CATT, 2006). Como os receptores AT1 e AT2 são expressos nas células ósseas, e

estas possuem a capacidade de sintetizar a ECA, nós hipotetizamos que a ANG II pode ter um papel importante na remodelação óssea induzida por força mecânica.

Quando um estímulo mecânico é aplicado sobre o dente e seu periodonto, uma reação inflamatória transitória é gerada, culminando com a liberação de mediadores pró-inflamatórios como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, hormônios e metabólitos do ácido araquidônico (GARLET, 2007). Áreas de pressão e tensão são criadas no ligamento periodontal, apresentando reabsorção óssea através da ativação de osteoclastos e formação óssea através de osteoblastos, respectivamente (KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006; HENNEMAN; VON DER HOFF; MALTHA, 2008).

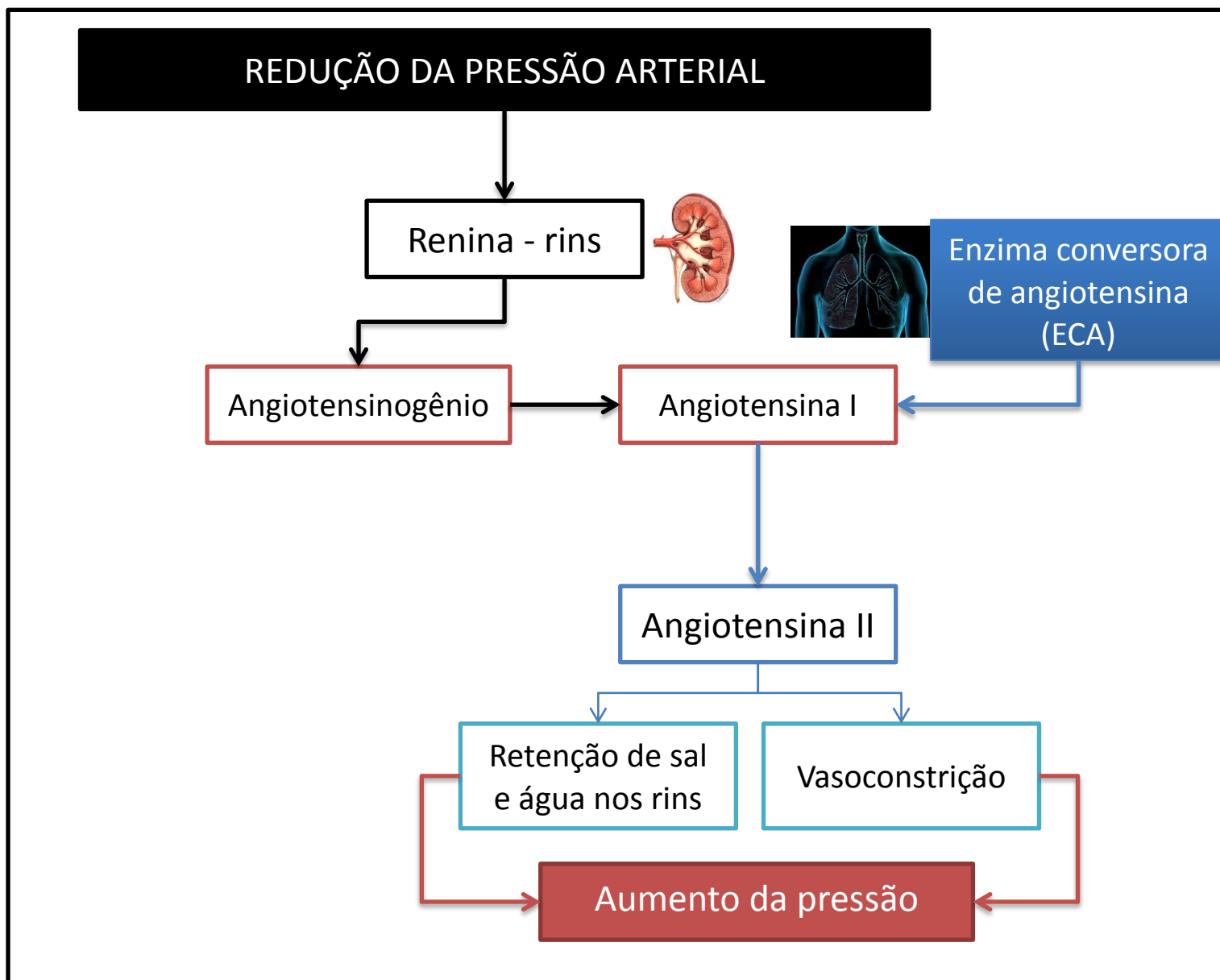
Várias citocinas tem demonstrado um papel importante na osteoclastogênese. Dentre elas destaca-se o receptor ativador do fator nuclear Kappa-B ligante (RANKL), cuja principal função é regular positivamente a atividade osteoclástica através da sua ligação ao receptor RANK expresso nos osteoclastos e seus progenitores celulares (BOYCE; XING, 2008). Este processo pode ser inibido pela osteoprotegerina (OPG), que regula negativamente a osteoclastogênese, impedindo a interação RANK-RANKL (BOYCE; XING, 2008; AOKI et al., 2010). Outro mediador chave para a diferenciação de osteoblastos e osteoclastos é o fator de transcrição relacionado ao RUNT 2 (RUNX2), que juntamente com o RANKL, são regulados pela adenosina de monofosfato cíclico (AMPc) (TEITELBAUM, 2000; TINTUT et al., 1999).

A ANG II associada a fatores que geralmente encontram-se alterados na hipertensão arterial e na osteoporose, como a lipoproteína de baixa densidade (LDL), a lipoproteína de alta densidade (HDL), o óxido nítrico e a homocisteína, pode reduzir a expressão de RUNX2. A alteração na expressão desse mediador gera uma redução do número de osteoblastos, o que pode culminar com a diminuição das taxas de aposição óssea (PARHAMI et al., 1997; GJESDAL et al., 2006; PARHAMI et al., 2002). Além disso, alguns estudos tem demonstrado que a ANG II pode se ligar aos osteoblastos fazendo com que essas células produzam uma maior quantidade de RANKL, ativando dessa forma, a osteoclastogênese (ASABA et al., 2009).

As drogas que promovem o bloqueio da cascata da ANG II são comumente utilizadas para controle de doenças cardíacas como a hipertensão arterial, porém existe um consenso na literatura de que essas medicações também podem estar relacionadas à ocorrência de doenças ósseas e inflamatórias (ZOU et al., 2011).

Como os estudos indicam que a ANG II é um importante mediador que atua no metabolismo ósseo, é importante saber se essa atuação é capaz de promover alterações na MDO, pois muitos pacientes adultos em tratamento ortodôntico fazem uso de drogas anti-hipertensivas.

Figura 1: Sistema renina-angiotensina - aldosterona (SRA): Mecanismo de ação para o controle da pressão.



Fonte: CLAYTON et al., 1998.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo desse estudo foi avaliar a influência da angiotensina II no recrutamento de osteoclastos, e conseqüentemente, na remodelação óssea induzida pela MDO.

2.2 Objetivos específicos

- a) avaliar a influência dos bloqueadores dos receptores de ANG II no recrutamento de osteoclastos e MDO;
- b) avaliar a influência das enzimas convertoras de angiotensina no recrutamento de osteoclastos e MDO;
- c) avaliar a influência da utilização dos ARBs na expressão dos níveis moleculares de mRNA dos mediadores pró-inflamatórios: RANK, RANKL e OPG, que estão intimamente relacionados ao processo de remodelação óssea.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em parceria com o Laboratório de Imunofarmacologia (Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB/UFMG). Os animais utilizados foram tratados sob as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP) sob o protocolo 55/2011 (ANEXO A).

3.1 Delineamento experimental

Neste experimento foram utilizados 45 camundongos machos C57BL6/J selvagens. Os animais foram divididos em três grupos: controle, que receberam a administração de água potável (VH), tratados com Losartan (LOS) 10mg/kg/dia e tratados com Captopril (CAP) 1mg/kg/dia. A quantidade de MDO e o número de osteoclastos foram avaliados histopatologicamente após 6 dias de indução de força mecânica para os grupos VH e LOS e 12 dias para os grupos VH, LOS e CAP. A expressão de mediadores pró- inflamatórios foi avaliada através da reação em cadeia da polimerase pelo método quantitativo em tempo real (PCR-TR) em dois tempos distintos: 0 e 12 horas para os grupos VH e LOS.

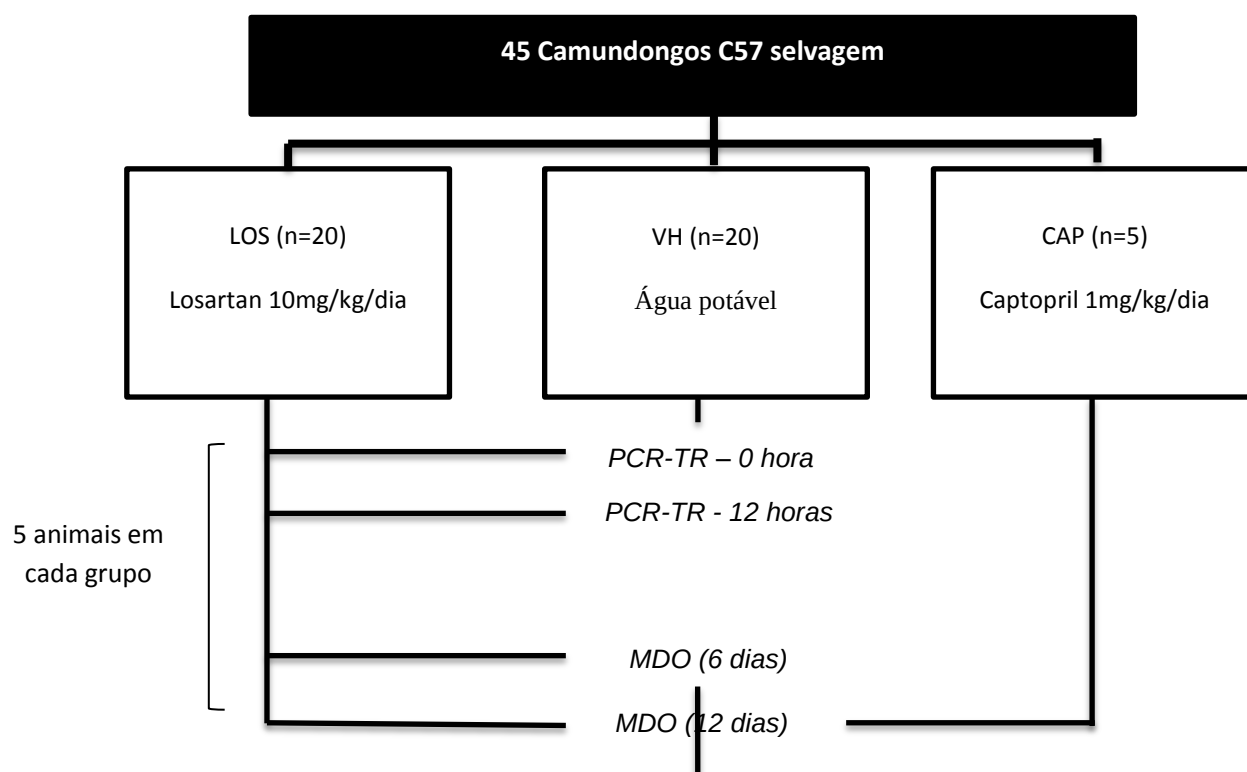
3.2 Protocolo experimental

Os camundongos utilizados no presente estudo foram obtidos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais). Os animais permaneceram acondicionados em gaiolas de plástico, sob o ciclo de 12 horas claro/escuro e receberam alimentação pastosa e água. Ao iniciar a pesquisa os animais possuíam aproximadamente 10 semanas de vida com peso médio de 25g. Nesta idade os animais já atingiram a maturidade sexual e peso máximo corporal. Como critérios de inclusão avaliamos: ausência de irritações ou inflamações na cavidade oral, permanência do aparelho nos elementos dentários até o final do experimento e perda de peso inferior a 20%%.

3.2.1 Administração do Veículo, Losartan e Captopril

Todos os animais receberam o tratamento através de gavagem na quantidade de 100µL/dia durante o tempo determinado para cada experimento (6 ou 12 dias para indução da MDO e contagem de células TRAP-positivas e 0 e 12 horas para PCR-TR). No grupo VH foi administrada água potável. Já no grupo LOS foi administrado 10mg/kg/dia associado a água potável. No grupo CAP foi utilizada 1mg/kg/dia associada a água potável (Figura 2).

Figura 2: Fluxograma representativo da divisão de animais de forma aleatória em três grupos: VH, LOS e CAP.



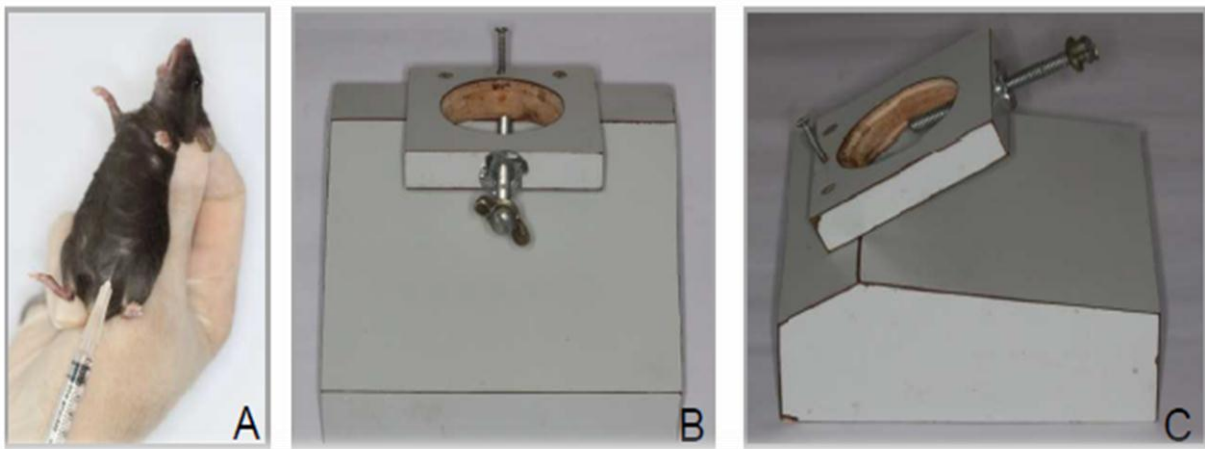
Fonte: Elaborado pela autora.

3.2.2 Instalação do aparelho ortodôntico

O protocolo referente à indução da movimentação ortodôntica foi baseado em estudo anterior (ANDRADE et al., 2007). Os camundongos foram anestesiados por injeção intraperitoneal de 0,2mL/25g de peso corporal, de uma solução contendo

xilazina ($0,02 \text{ mg mL}^{-1}$), ketamina (50 mg mL^{-1}) e uma solução salina na proporção de 1:0, 5:3 respectivamente (Figura 3A). Uma vez anestesiados os animais foram posicionados com a cabeça voltada para cima em uma mesa cirúrgica que foi desenvolvida para restringir os movimentos do animal (Figuras 3B e C). Para melhor visualização do campo o estereomicroscópio e a iluminação de fibra óptica foram utilizados (Figura 4).

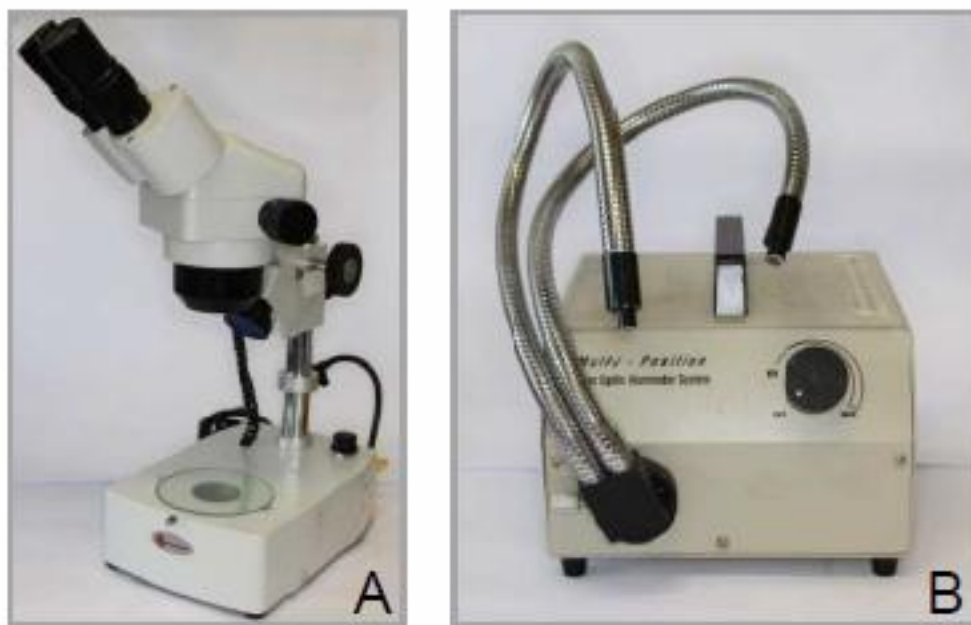
Figura 3: Anestesia e mesa cirúrgica



Legenda: **A:** Anestesia intraperitoneal. **B e C:** Mesa cirúrgica desenhada para restringir o movimento do animal bem como permitir um bom acesso intra oral.

Fonte: LIMA, 2011.

Figura 4: Equipamentos utilizados para a colagem da mola



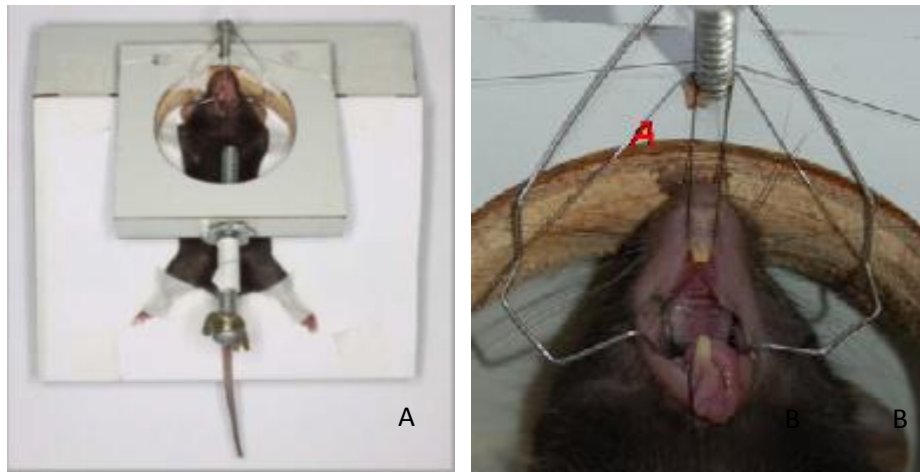
Legenda: **A:** Estereomicroscópio. **B:** Fibra óptica para iluminação.

Fonte: LIMA, 2011.

Uma vez que os animais estavam anestesiados um afastador de mucosa foi posicionado. Neste momento o animal foi transferido para o estereomicroscópio onde a colagem do aparelho pôde ser realizada (Figura 5). A superfície oclusal dos molares e incisivos foi limpa com acetona por fricção de 10 segundos e em seguida, um selante autoadesivo (self-etching primer, Unitek, 3M, Mineápolis, EUA) foi aplicado. Uma mola aberta de Níquel - Titânio de 0,25 X 0,76 mm (Lancer Orthodontics, San Marcos, CA, EUA) foi fixada com resina fotopolimerizável (Transbond, Unitek/3M, St. Paul, MN, EUA) e posicionada entre a superfície mesio-oclusal do primeiro molar direito até os incisivos.

A porção anterior/mesial da mola foi ativada no sentido mesial e fixada nos incisivos com resina. Os incisivos foram unidos com resina para prevenir a erupção dos mesmos e consequente perda de ancoragem. Não houve reativação da mola durante todo o período de experimento. A hemi maxila do lado esquerdo foi utilizada como controle da quantidade de movimentação ortodôntica (Figura 6).

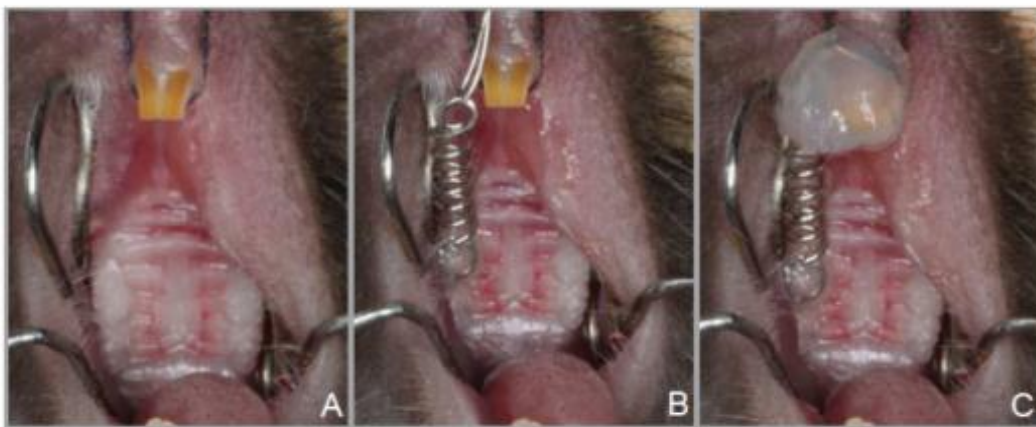
Figura 5: Posicionamento do animal para instalação da mola



Legenda: **A:** Animal posicionado em decúbito dorsal. **B:** Afastador de mucosa posicionado.
A: Afastador de mucosa.

Fonte: MOURA, 2010.

Figura 6: Colagem da mola de Níquel-Titânio no primeiro molar superior direito



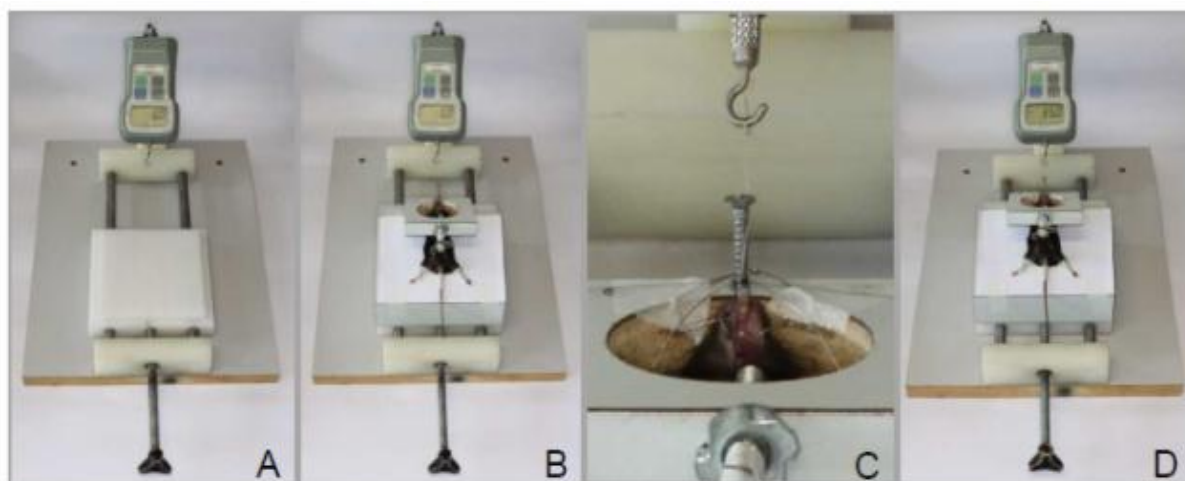
Legenda: **A:** Vista oclusal da maxila. **B)** Vista oclusal da maxila com a fixação da mola na superfície oclusal do primeiro molar do lado direito. **C)** Vista oclusal da maxila com a mola ativada e posicionada entre o primeiro molar direito e incisivos superiores.

Fonte: LIMA, 2011.

Em estudo anterior (TADDEI et al., 2012) a força de 0,35N foi padronizada como sendo a força ótima para indução da movimentação dentária ortodôntica em camundongos. Para a calibração dessa força foi utilizado um dinamômetro (Shimpo Corp., Tóquio, Japão) que estava fixado em uma plataforma. Esta plataforma é composta por um trilho na qual a mesa cirúrgica desliza. Desta forma é possível movimentar a mesa através do giro da sua manivela. A utilização desta plataforma

permite um maior controle do experimento por impedir interferências de fatores como vibração e calor transmitidos a partir do contato da mão do operador. Um fio 0,8mm 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. Para ativar a mola a manivela acoplada na plataforma foi girada, movimentando assim a mesa cirúrgica até registrar uma força equivalente a 0,35N (35g) no dinamômetro. Uma vez que a força almejada foi alcançada, a mola foi fixada nos incisivos. Como protocolo para impedir que o peso do animal interferisse na mensuração da força, o camundongo permaneceu totalmente imóvel durante a ativação da mola. Sendo assim, o dinamômetro somente foi ligado quando fio estava totalmente esticado sem apresentar deformações (Figura 7).

Figura 7: Calibração da força ótima para movimentação ortodôntica



Legenda: **A)** Plataforma utilizada para obtenção da força ótima através do dinamômetro fixado. **B)** Mesa cirúrgica posicionada na plataforma. **C)** Fio de aço posicionado entre a extremidade mesial- anterior da mola e o gancho de medição do dinamômetro. **D)** Dinamômetro marcando 35g de ativação da mola.

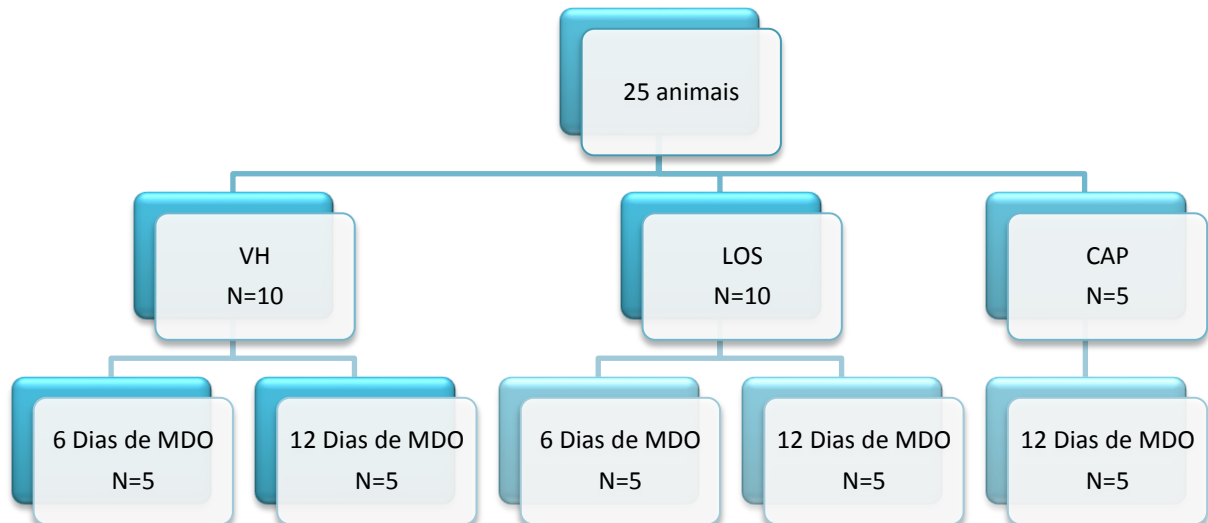
Fonte: LIMA, 2011.

3.2.3 Distribuição dos animais para análise histopatológica

Nos animais dos grupos VH e LOS a MDO foi induzida por 6 ou 12 dias. Já para o grupo CAP, o tempo utilizado para indução da MDO foi de 12 dias. O aparelho ortodôntico foi fixado na hemi-maxila direita, sendo esta considerada experimental. A hemi-maxila esquerda, por sua vez, foi considerada controle, pois não houve qualquer aplicação de força mecânica deste lado.

O controle do sacrifício dos animais seguiu o protocolo publicado em artigo prévio (ANDRADE et al., 2007). Neste estudo o autor observou que o número de osteoclastos atinge o seu pico máximo após 12 dias do início da aplicação da força (Figura 8).

Figura 8: Distribuição de animais para análise histopatológica



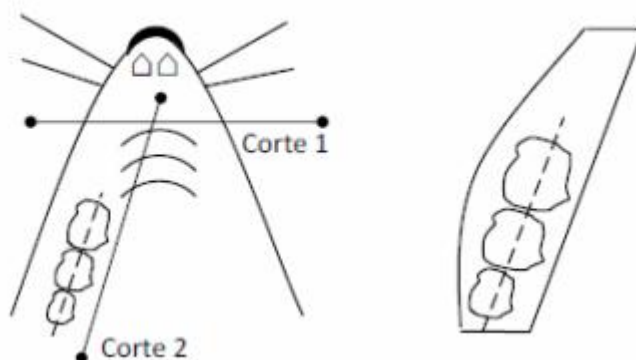
Fonte: Elaborado pela autora

3.3 Processamento Histológico

A maxila foi removida e imersa em solução de paraformaldeído a 4% em PBS 7,4 por 48 horas para a fixação. As amostras foram, posteriormente, lavadas em PBS. A desmineralização foi realizada em solução de EDTA 14% (pH 7,4) por 21 dias com trocas diárias da solução, o que permitiu a fácil remoção das molas. Em seguida foi feita uma lavagem em água corrente por 8 horas para iniciar o preparo histológico. A maxila foi dissecada com o auxílio de um estereomicroscópio (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, Brasil). Foram realizados dois cortes através de uma lâmina de aço, um na região dos incisivos, os quais foram descartados, e o outro a 1 mm da superfície palatina dos molares, paralelo a uma linha imaginária traçada sobre a superfície oclusal dos molares, de forma a permanecer um fragmento contendo os três molares e uma pequena parte do palato (Figura 9). Em sequência, o fragmento foi desidratado em séries crescentes de álcool a 70%, 80%, 90% e absoluto (3 banhos) por 30 minutos cada. Posteriormente as amostras foram clarificadas em xilol (20, 15, 10 minutos) e incluídas em parafina. A superfície

palatina ficou voltada para o lado da microtomia que foi realizada por um micrótomo rotatório (Jung, Histocut 820, Mussioch, 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. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina para seleção. As peças foram selecionadas de acordo com a visualização das regiões analisadas, e posteriormente foram coradas com fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP; Sigma- Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e contra corados com hematoxilina de acordo com as instruções dos fabricantes.

Figura 9: Desenho esquemático do preparo das peças para o processamento histológico



Legenda: Fragmento da maxila anterior, contendo incisivos que foi separado pelo corte 1. Em seguida, um bisturi posicionado a 1 mm da superfície palatina da coroa dos molares e paralelo a uma linha imaginária traçada sobre a oclusal dos molares, separou o fragmento de interesse, representado pelo corte 2.

Fonte: ANDRADE JR., 2007.

3.4 Análise histomorfométrica

3.4.1 Contagem de células TRAP-positivas

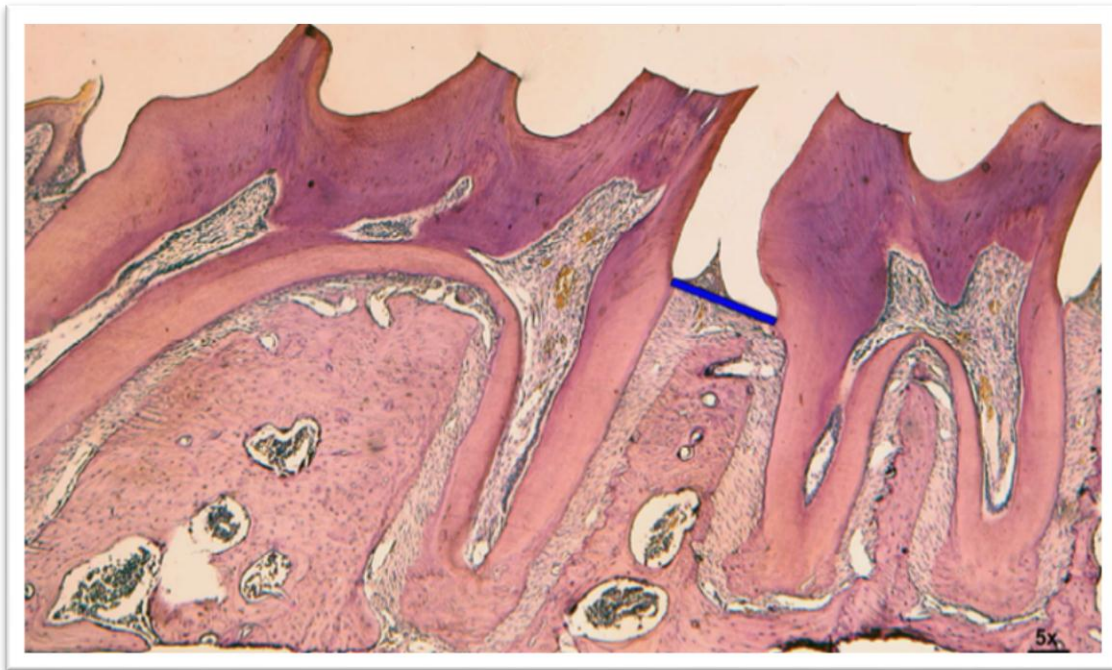
Para a análise histomorfométrica cinco sessões representativas por animal, em três campos microscópicos consecutivos por sessão foram corados com TRAP.

As contagens foram realizadas na superfície da lâmina dura do osso alveolar na face voltada para o ligamento periodontal na região mesial da raiz distovestibular do primeiro molar usando um microscópio de luz Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). O número total de osteoclastos presentes nas lacunas ósseas adjacentes a raiz distovestibular foram identificadas como células TRAP positivas. Para a validação da análise, foram utilizados dois examinadores devidamente calibrados.

3.4.2 Mensuração da movimentação dentária

O protocolo para mensuração da movimentação dentária foi baseado em estudo prévio (TADDEI et al., 2012). A quantidade de movimentação induzida foi determinada pela mensuração da distância amelocementária (JAC), entre os primeiros e segundos molares. As medidas foram determinadas com a utilização de um microscópio Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) adaptado a uma câmera digital (PowerShot A620, Canon, Tóquio, Japão). A quantificação da movimentação dentária foi realizada com o programa Image J (Instituto Nacional de Saúde- EUA). Essa mensuração foi realizada em cinco sessões por animal por um único examinador três vezes para cada grupo (Figura 10).

Figura 10: Mensuração da MDO através do Image J



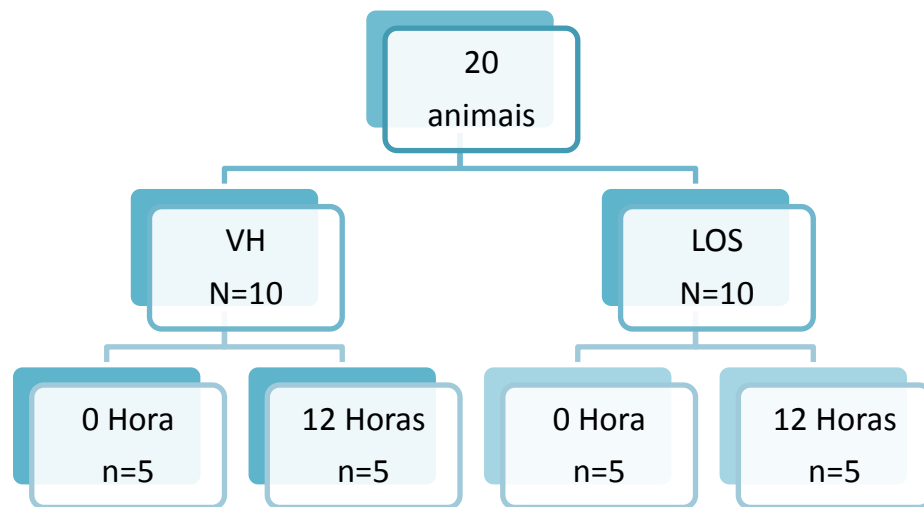
Legenda: A linha azul representa a distância entre a JAC dos primeiros e segundos molares.

Fonte: TADDEI, 2012.

3.5 Distribuição de animais para extração de mRNA e análise através de PCR em tempo real

Os animais pertencentes aos grupos VH e LOS foram divididos de acordo com o tempo para sacrifício (0 ou 12 horas). O controle do tempo de sacrifício para análise da expressão dos mediadores inflamatórios dos animais seguiu o protocolo previamente publicado na literatura (ANDRADE et al., 2007). Neste estudo o autor observou que o pico para expressão de mediadores diretamente envolvidos no processo de remodelação óssea induzida por MDO ocorria em 12 horas retornando aos níveis basais em 72 horas (Figura 11).

Figura 11: Distribuição dos animais para extração de mRNA e PCR em tempo real



Fonte: Elaborado pela autora

3.5.1 PCR em tempo real

O tecido periodontal e o osso alveolar circundante à superfície distal e mesial da raiz disto vestibular dos primeiros molares maxilares (lado de tensão e pressão respectivamente) foram removidos com auxílio de um estereomicroscópio. Todo o tecido gengival, mucosa oral e dentes foram descartados. O periodonto foi macerado e seu RNA extraído através do reagente TRIZOL (Invitrogen, Carlsband, CA, EUA). DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando 2µg de RNA através da reação de transcrição reversa (Superscript II, Invitrogen). A análise foi realizada utilizando PCR em tempo real no Mini Opticon (BioRad, Hercules, CA, EUA) utilizando um sistema de quantificação através do método de fluorescência SYBR-green (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As condições iniciais do PCR foram: 95°C (10 minutos), seguidos por 40 ciclos de 94°C (1minuto), 58° (1 minuto) e 72°C (1 minuto). Esses ciclos foram seguidos por uma curva de desnaturação.

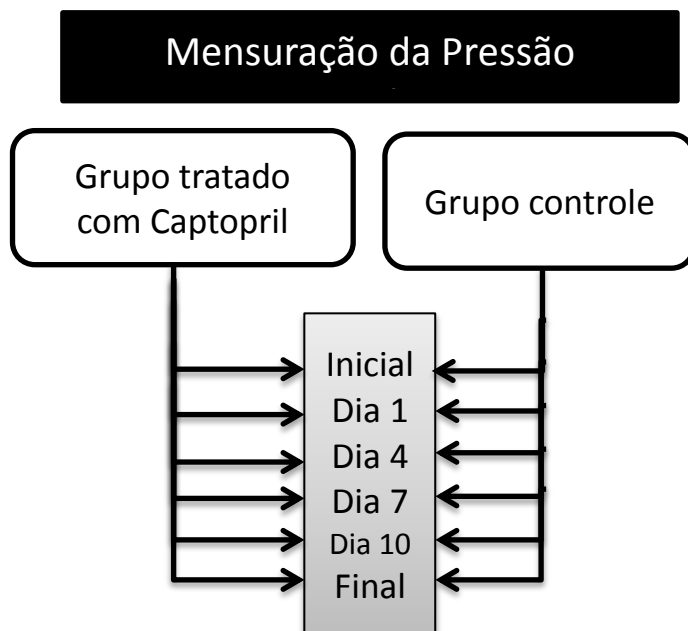
3.6 Mensuração da pressão sanguínea sistêmica

Alguns pesquisadores utilizam uma dosagem de anti-hipertensivos que promove a redução de aproximadamente 27% da pressão sanguínea (INADA et al., 1999; BROULIKI et al., 2001). No nosso trabalho, optamos por utilizar uma droga

que mantivesse a pressão estável, para que dessa forma pudéssemos eliminar uma variável. A mensuração da pressão arterial foi avaliada através do método da cauda, que consiste em um método computadorizado não invasivo para medir a pressão sanguínea (Kent scientific corporation, Torrington, CT, EUA). Para medir a pressão os animais são previamente aclimatados ao método um dia antes do experimento. A plataforma utilizada permaneceu com uma temperatura média de 32°C a 34°C. Para cada sessão o animal foi colocado em uma caixa de acrílico sendo que a cauda do animal permaneceu inserida em uma cânula de compressão utilizada para quantificar a pressão sanguínea. Foi feita a mensuração 15 vezes por animal e a média das apurações foi calculada (Figuras 12 e 13).

Optamos por fazer a mensuração apenas para os grupos CAP e VH, uma vez que não havia na literatura a padronização de uma dosagem de Captopril para estudos em camundongos.

Figura 12: Fluxograma indicando os tempos utilizados para realizar a mensuração da pressão arterial



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 13: Mensuração da pressão sanguínea



Legenda: A: Plataforma de posicionamento e estabilização do animal e mensuração da pressão sanguínea

Fonte: Elaborado pela autora

3.7 Análise estatística

Pressupostos de normalidade e homocedasticidade atendidos, foi realizada a análise de variância one way ANOVA seguida pelo pós - teste de Newman-Keuls para múltiplas análises. Nível de significância igual a 5%.

4 ARTIGO

The role of angiotensin II in bone remodeling induced by mechanical loading in mice

Artigo formatado para envio ao American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics (Qualis A1).

As normas para submissão de artigos podem ser visualizadas no endereço eletrônico: <http://www.ajodo.org/authorinfo>.

The role of angiotensin II in bone remodeling induced by mechanical loading in mice

Moura, AP³, Montalvany-Alves, CC¹ Queiroz-Junior, CM³; Andrade Jr. I¹; Silva, TA² and Teixeira, MM³

¹Departament of Orthodontics, School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

²Departament of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

³Laboratory of Immunopharmacology, Departament of Biochemistry and Immunology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding author: Ildeu Andrade Jr., DDS,MSD,PHD

Address: Av. Dom José Gaspar, 500, CEP: 30.535-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Phone: 55-31-3319-4414

Email: ildeuandrade@pucminas.br

ABSTRACT

Introduction: Angiotensin II (ANG II) is a well-known systemic regulator of cardiovascular system and body fluid homeostasis. This mediator binds to two types of receptors: AT1 and AT2. These receptors can be found in many type of cells including osteoclasts and osteoblasts. The aim of this study was to investigate whether ANG II inhibitors, widely used for hypertension treatment, influences orthodontic tooth movement (OTM). **Methods:** An orthodontic appliance was bonded in 45 wild type mice. The animals were randomly divided into 3 groups: VH (vehicle treated mice); LOS (losartan, ANG II receptors blockers) and CAP (Captopril, ANG II converting enzyme). The OTM and the number of TRAP-positive cells were determined by histopathological analysis. The expression of mediators involved in bone remodeling was evaluated by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Blood pressure was proceed before and during experimental period. **Results:** OTM and TRAP-positive cells were significantly reduced in CAP and LOS animals when compared with VH mice. The expression of RANK and RANKL were lower in experimental mice than in control group, while OPG levels were higher. **Conclusion:** ANG II inhibitors decrease osteoclast differentiation and activity leading to reduced tooth movement. The ANG pathway is positively associated with osteoclast recruitment, activity and OTM. The blockage of ANG II pathway might be used for future modulation of the extent of OTM.

Keywords: Tooth movement. Bone remodeling. Angiotensin II. Hypertension.

INTRODUCTION

The worldwide burdens of cardiovascular disease is growing and are the leading cause of mortality in the world, affecting more than 16 million people each year¹. In addition to lifestyle changes, pharmacologic agents that can modify cardiovascular disease processes have the potential to reduce cardiovascular events. Antihypertensive agents, such as the angiotensin II receptor blockers (ARBs) and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors, are widely used to reduce the risk of cardiovascular events^{2,3}.

The angiotensin II (ANG II) is a cardiovascular mediator produced by renin-angiotensin system (RAS) which is responsible for the regulation of cardiovascular system and body fluid homeostasis⁴. There is also increasing evidence that ANG II can work as a local growth factor, stimulating both proliferation and cell hypertrophy^{4,5}. ANG II binds to two different kinds of receptors, AT1 and AT2, which are expressed in many cell types, including osteoclasts and osteoblasts. AT1 is also involved in osteocyte activity, which is related to stimulation of bone formation⁶. Moreover, previous animal studies showed that excessive activation of RAS causes osteoporosis, mainly through an elevation of osteoclastic bone resorption^{7,8}. Along with other factors, ANG II can upregulate RANKL expression and downregulate the expression of RUNX2. These key mediators are responsible for controlling osteoblast and osteoclast differentiation, regulating bone cells activity, leading to reduce bone formation and enhancing bone reabsorption⁹.

As these bone cells also produce ACE (angiotensin converting enzyme), we postulated that ANG II might play an important role on bone remodeling induced by mechanical loading, such as in orthodontic tooth movement (OTM). OTM is achieved by the transduction of a mechanical loading into a biological process, resulting in bone remodeling. This process is mainly mediated by, chemokines, growth factors, hormones and arachidonic acid metabolites^{7,8,10}.

While ANG II appears to be an important mediator in bone metabolism, we have to better understand whether this mediator is able to promote significant changes in OTM, since many of the adult orthodontic patients are constantly taking antihypertensive drugs. The aim of this study was to investigate the role of ANG II on osteoclast recruitment and activity, using a well-established mouse model of OTM.

MATERIAL AND METHODS

Experimental animals

Forty-five (C57BL6/J) wild-type male mice (ten week-old) were used in this experiment. They were randomly divided into 3 groups: (1) treated with mineral water (VH); (2) treated with 10mg/kg/day of Losartan (Sigma- Aldrich, Saint Louis, MO)(LOS); (3) treated with 1mg/kg-day of Captopril (Sigma- Aldrich, Saint Louis, MO) (CAP). No significant weight lost was observed. All treatments followed the ethical regulations of the Institutional Ethics Committee.

Experimental protocol

Tooth movement was induced as previously described¹¹. Briefly, mice were anesthetized with 0.2mL of a xylazine (0.02mg/mL) and ketamine (50mg/mL) solution. An orthodontic appliance consisting of a nickel-titanium 0.25 X 0.76 mm coil spring (Lancer Orthodontics, San Marcos, Calif) was bonded by light-cured resin (Transbond; 3M Unitek, Monrovia, Calif) between the maxillary right first molar and both upper incisors (Fig. 1). The magnitude of force was calibrated by a tension gauge (Shimpo Instruments, Itasca, Ill) in order to exert a force of 35 g in the mesial direction. No reactivation was performed during the entire experimental period. The left side of the maxilla (without an orthodontic appliance) was used as a control (Fig. 1). The experiment was divided into two parts: (1) to evaluate the influence of the angiotensin II receptor blockers (Losartan) and angiotensin converting enzyme inhibitor (Captopril) on OTM; (2) to determine whether the administration of these antihypertensives influences the molecular levels of proinflammatory mediators.

The mice were sacrificed after 6 or 12 days for histopathological analysis and after 0 or 12 hours (for molecular analysis). For each set of experiments, 5 animals were used at each time-point. Daily gavage of either 10mg/kg/day of Losartan and 1 mg/kg/day of Captopril or vehicle (mineral water) were administered to the LOS,CAP and VH groups respectively. The drugs were administered for 6 or 12 days for histopathologic assay and for 0 or 12 hours for molecular analysis (Fig. 2).

Histopathological analysis

As was previously described¹² the right and the left maxillae halves were fixed in 10% buffered formalin (pH 7.4), decalcified in 14% ethylenediaminetetraacetic acid (pH7.4) for 20

days and embedded in paraffin. Samples were cut into sagittal sections of 5µm thickness. The sections were stained with tartrate resistant acidphosphatase (TRAP; Sigma-Aldrich, SaintLouis, MO, USA), counterstained with hematoxylin and used for the histological examinations. The mesial periodontal site of the disto – buccal root of the first molar was used for osteoclasts counts, on five sections per animal. Osteoclasts were identified as TRAP-positive, multinucleated cells on the bone surface.

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; the variability was below 5%.

RNA extraction and Real-Time PCR

The periodontal ligament and the surrounding alveolar bone were extracted from the maxillary first molars using a stereomicroscope. All of the gingival tissues, oral mucosa and tooth were discarded. These tissues were then subjected to RNA extractions and real-time PCR to evaluate the expression of molecules known to regulate osteoclast functions such as: RANK (receptor activator of nuclear factor kappa-B), RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) and OPG (osteoprotegerin). RNA was extracted by using TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, Calif). Complementary DNA was synthesized using 2µg of RNA through a reverse transcription reaction (Superscript II, Invitrogen). Real-time PCR analysis was performed in a Mini Opticon (BioRad, Hercules, Calif) by using a SYBR-green fluorescence quantification system (Applied Biosystem, Foster City, Calif). The standard PCR conditions were 95°C (1 minute), 58°C (1 minute), and 72°C (2 minutes), followed by the standard denaturations curve. The primer sequences are described in Appendix 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula.

Systemic blood pressure measurement

Some researchers used a dosage of antihypertensive drugs that promote a reduction of blood pressure in 27%^{13,14}. In our study we chose to use a dose to maintain the blood pressure stable in order to eliminate bias. The mean arterial pressure measurement was evaluated by the tail-cuff method, which is a noninvasive computerized system for measuring the blood pressure (Kent scientific corporation, Torrington, CT). This tail-cuff blood pressure system utilizes volume-pressure recording technology to measure the mice's tail blood pressure. The animal was acclimated to the restraint and tail-cuff inflation for 1 day before the beginning of the experiments. The restraint platform was maintained at approximately 32°C to 34°C. For each section the mice was placed in an acrylic box restraint, and the tail was inserted into a compression cuff that measure the blood pressure 15 times. The average of these values was calculated.

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. $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

There were no significant changes in blood pressure for Vehicle and Captopril treated mice

Blood pressure in VH group remained stable throughout the role experiment period (Fig. 3A). In the CAP treated mice we could observe a significant drop in blood pressure mainly expressed from the first to the seventh day of treatment. At the end of the experimental period blood pressure returned to initial parameters, and no statistical difference from initial values could be seen (Fig. 3B).

The amount of OTM was reduced in Losartan and Captopril treated mice

Following 6 days of OTM, no significant changes between LOS and VH treated animals could be observed. On the other hand, the amount of OTM was significantly diminished in LOS and CAP animals when compared with VH mice after 12 days of mechanical loading (Fig. 4A).

TRAP activity and osteoclast number were decreased in Losartan and Captopril animals

The histopathological analysis revealed that TRAP activity was found on the distal side of the alveolar bone surface, and no activity was observed in the mesial region of the periodontium in the control group (without mechanical loading) (4.C). After 6 days of force, TRAP activity appeared to increase on the mesial periodontium of the distobuccal root, the side of pressure after mechanical loading, and to decrease on the distal side of this root in VH mice (Fig. 4D, F, H). In LOS mice, there appeared to be a similar decrease in the distal side, but a smaller increase of TRAP activity on the mesial side (Fig. 4B). After 12 days of mechanical loading, TRAP activity appeared to increase more extensively in VH mice, which presented a greater alveolar bone resorption area than did LOS and CAP mice (Fig. 4D). Furthermore, the number of osteoclasts was significantly reduced in LOS and CAP treated group when compared with VH mice (Fig. 4B, E, G, I). Overall, there was a good correlation between the intensity of TRAP activity, as evaluated qualitatively, and the number of TRAP-positive osteoclasts. Indeed, the quantification of TRAP-positive cells had a steady increase until day 12 in VH mice subjected to orthodontic .The increased number of osteoclasts was greater in VH than LOS and CAP mice (Fig. 4B).

Expression of RANKL and RANK were significantly reduced in compression sites of Losartan treated animals

The expression of RANK, RANKL and OPG for both VH and LOS animals were significant elevated after mechanical loading comparing with control groups. (Fig. 5A, B, C). A reduced mRNA level of RANK and RANKL was observed in the compression site (CS) for Losartan treated animals when compared with VH animals after 12 hours of MDO. However, in the tension site (TS) there was no statistical difference (Fig. 5A, B).

Levels of OPG, negative osteoclast regulator, increased in compression sites of Losartan treated animals

OPG expression was augmented for both LOS and VH mice in the CS compared with control animals (Fig. 5C). Moreover, significant increase in the expression of OPG could be noticed in CS for Losartan treated group (Fig. 5C).

DISCUSSION

Angiotensin converting enzyme inhibitors or AT1/AT2 receptor antagonists are common used for treating hypertension^{2,3}. The ARB (LOS) and the ACE inhibitor (CAP) have been widely studied for hemodynamic and hypertensive activity, but there is little information about the role of those agents on bone remodeling and no data are available whether they affect OTM.

Our data revealed that the inhibition of ANG II by CAP or blocking angiotensin action on AT1/AT2 receptors by LOS, significantly diminished the number of osteoclasts and, consequently, the OTM after 12 days of mechanical loading. The Real-time PCR analysis showed that mRNA levels of the osteoclast activity markers RANK-RANKL were significantly reduced in experimental mice.

Osteoclastogenesis and bone resorption activity are upregulated by RANKL, produced by osteoblast/stroma cells, through their binding to their receptor RANK expressed in osteoclast progenitor cells¹⁵. This process can be inhibited by the decoy receptor OPG, a negative regulator of bone resorption, which prevents RANK-RANKL engagement^{15,16}. To understand the molecular basis of the impaired osteoclast differentiation and activity with the use of ANG II inhibitors, these osteoclast regulators were analyzed. The expression of both RANKL and RANK was decreased in the LOS treated mice when compared to the control group. In parallel, it was observed that the levels of OPG were increased in ANG II inhibited mice.

In accordance, previous studies have showed that ANG II is capable to increase intracellular cAMP, which can upregulate RANKL expression and downregulate the expression of RUNX2^{9,15}. The results of our study suggest that ACE and ARBs inhibitors can reverse this process, stimulating osteoblast formation and reducing osteoclast differentiation and activity.

As OTM creates both tension and compression sites in the periodontium, protein expression, osteoclast and osteoblast markers were analyzed separately. Our findings confirmed a differential expression of these markers, which allows the creation of a positive microenvironment for bone resorption in CS and bone formation in TS. Higher expression levels of RANK and RANKL were observed in CS compared with TS at the examined time-point. In agreement to this, previous reports described elevated levels of TNF- α and RANKL in CS following mechanical loading^{17,18,19}. Given that, RANK/RANKL axis and TNF- α , participates in osteoclastogenesis by increasing osteoclast activity in CS.

Another important aspect is the evaluation of expression levels of OPG in CS and TS. There was a higher expression of OPG in TS compared to CS after 12 hours of mechanical loading. Therefore, TS exhibit a differential expression pattern of anti-resorptive mediators that are known to be involved in bone formation. According to this, another study describes that high OPG levels are related to reduce osteoclastogenesis via RANKL inhibition during mechanical stress²⁰.

ANG II can also increase the expression of TNF- α which is an important cytokine for osteoclast activation through two different pathways^{7,8,10}: directly by inducing the sequential expression of NF- κ B, c-Fos and NFATc1, important mediators for osteoclast differentiation, on osteoclast progenitor cells ; and indirectly by inducing the expression of RANKL on osteoblasts¹⁶. However, further studies are necessary to evaluate TNF- α function in this model.

Taken all together, our results suggest that the observed reduction in the number of osteoclasts led to less bone resorption and, consequently, to less OTM in the ANG II inhibited mice. This findings might be related to downregulation of RANKL/RANK gene expression. Further research is necessary to confirm the role of ANG II inhibitors in the differentiation and activity of osteoblasts.

CONCLUSION

- a) ANG II inhibitors decrease osteoclast chemoattraction and activity, leading to reduced tooth movement. This was the first demonstration that angiotensin II plays an important role in bone remodeling during OTM;
- b) The blockage of ANG II pathway might be used for future therapeutic interventions, limiting inflammatory bone loss diseases, such as osteoporosis, rheumatoid arthritis, or modulating the extent of OTM.

REFERENCES

1. Rosamond W, Flegar K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K et al. Heart disease and stroke statistics. 2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2007;115:69-171.
2. So WY, Ma RC, Ozaki R, Tong PC, Ng MC, Ho CS et al. Angiotensin - converting enzyme (ACE) inhibition in type 2, diabetic patients – interactions with ACE insertion/deletion polymorphism. *Kidney Int* 2006;69:1438-43.
3. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 2001;345:861-9.
4. Peach MJ. Renin-angiotensin system: Biochemistry and mechanism of action. *Physiol* 1977;57:313-70.
5. Baker KM, Aceto JF. Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chickheart cells. *Am J Physiol* 1990;259:610-18.
6. Paszty C, Turner C, Martyn KR. Sclerostin: A gem from the genome leads to bone building antibodies. *J Bone Miner Res* 2010;25:1897-1904.
7. Asaba Y, Ito M, Funoto T, Watanabe K, Fukuhara R, Takeshita S et al. Activation of renin-angiotensin system induces osteoporosis independently of hypertension. *J Bone Miner Res* 2009;24:241-50.
8. Shimizu H, Nakagami H, Osako MK, Hanayama R, Kunugiza Y, Kizawa T et al. Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. *FASEB J* 2008;22:2465-75.
9. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000;289:1504-98.
10. Rejnmark L, Vestergaard P, Mosekilde L. Treatment with beta-blockers, ACE inhibitors, and calcium channel blockers is associated with a reduced fracture risk: A nationwide case-control study. *J Hypertension* 2006;24:581-5.
11. Andrade I, Silva TA, Silva GAB, Teixeira AL, Teixeira MM. The role of tumor necrosis factor receptor type I in orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 2007;86:1089-94.
12. Taddei SRA, Andrade Jr I, Queiroz-Jr CM, Garlet TP, Garlet GP, Cunha FQ et al. The role of CCR2 in Orthodontic Tooth Movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2012;in press:1-19.

13. Inada Y, Ojima M, Kanagawa R, Misumi Y, Nishikawa K, Naka T. Pharmacologic properties of candesartan cilexetil possible mechanisms of long-acting antihypertensive action. *J Hum Hypertension* 1999;13:57-80.
14. Broulik PD, Tesar V, Zima T, Jirsa M. Impact of Antihypertensive therapy on the skeleton: Effects of Enalapril and AT1 receptor antagonist Losartan in female rats. *Ohysiol Res* 2001;50:353-8.
15. Tintut Y. Inhibition of osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 by the cAMP pathway in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 1999;247:28875-9.
16. Boyce BF, Xing L. Bruton and Tec: new links in osteoimmunology. *Cell Metab* 2008;7:283-5.
17. Garlet TP. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *Eur J of Oral Sci* 2007;115:355-2.
18. Brooks PJ, Nilforoushan D, Manolson MF, Simmons CA, Gong SG. Molecular markers of early orthodontic tooth movement. *Angle Orthod* 2009;79:1108-13.
19. Nishijima Y, Yamaguchi M, Kojima T, Aihara N, Nakajima R, Kasai K. Levels of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement and effect of compression force on release from periodontal ligament cells in vitro. *Orthod Craniofac Res* 2006;9:63-70.
20. Kanzaki H, Chiba M, Takahashi I, Haruyama N, Nishimura M, Mitani H. Local OPG gene transfer to periodontal tissue inhibits orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 2004;83:920-5.

FIGURE AND TABLE LEGENDS



Fig 1. **A.** Occlusal view of maxillae before placing the orthodontic device. **B.** A nickel-titanium open-coil spring placed between the maxillary right first molar and incisor.

Daily Treatment (100 μ L) gavage of Losartan 10mg/kg, Captopril 1mg/kg or vehicle (6/ 12 days or 0/12 hours)

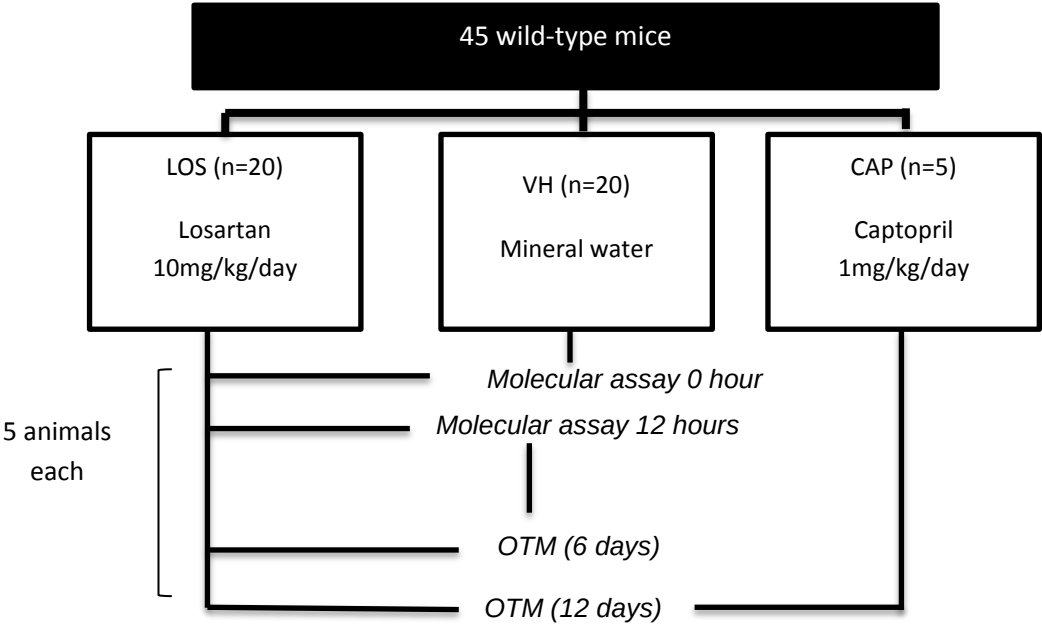


Fig 2. Flowchart of the experimental mode

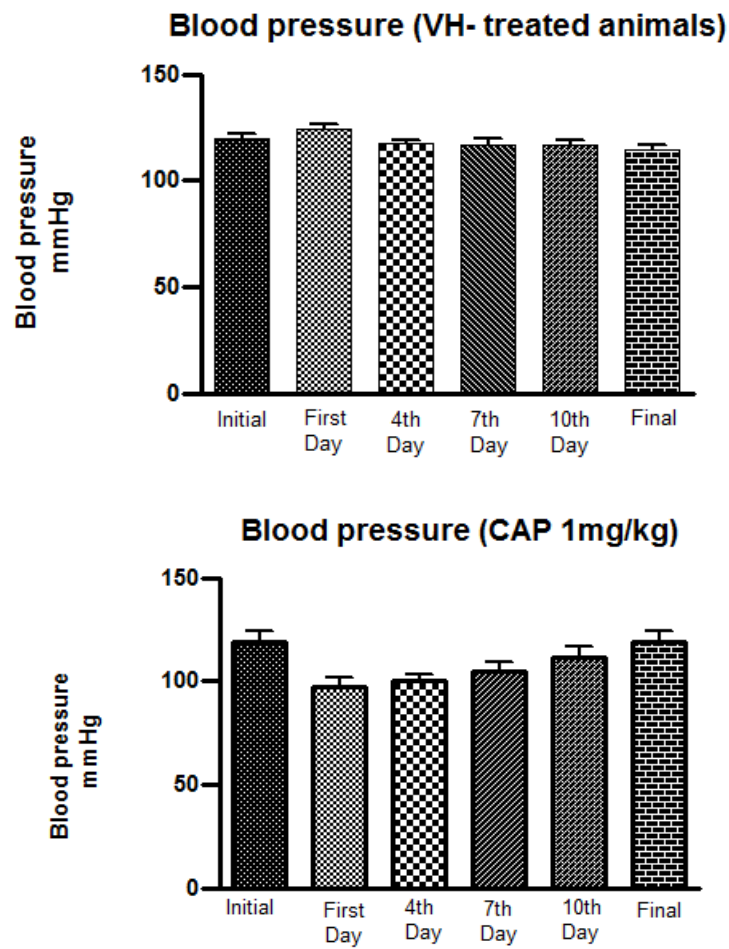


Fig 3. A. Measurement of blood pressure in vehicle treated animals. **B.** Measurement of blood pressure in CAP treated mice.

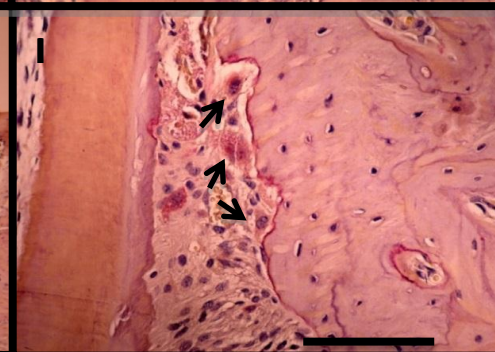
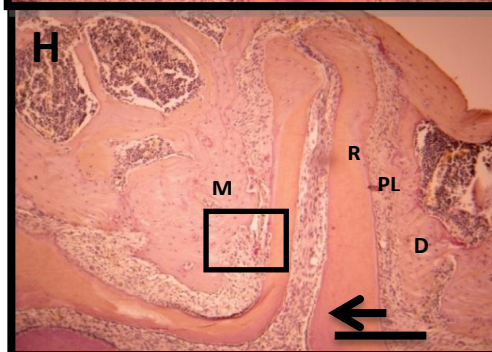
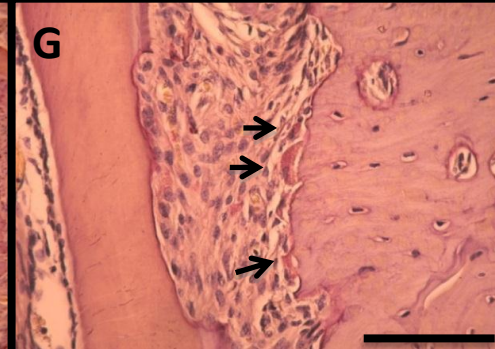
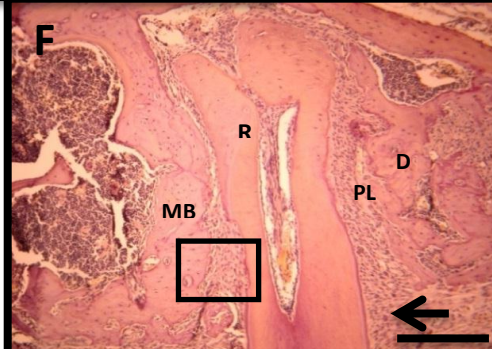
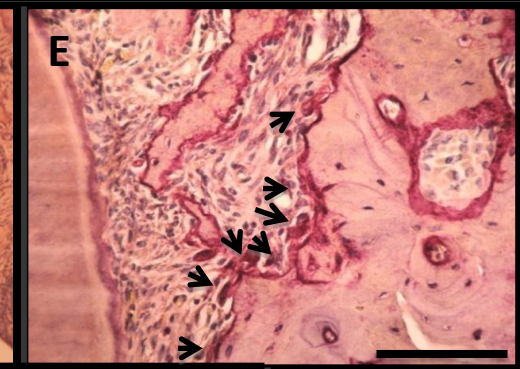
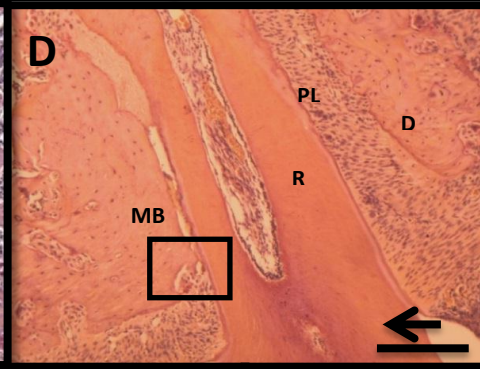
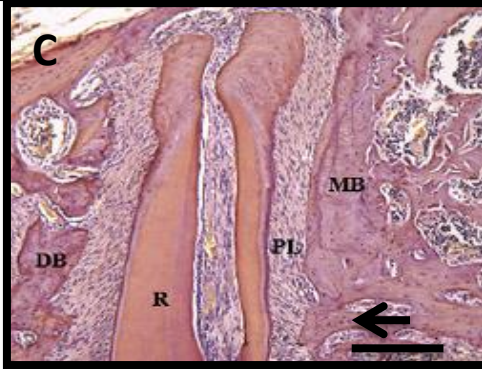
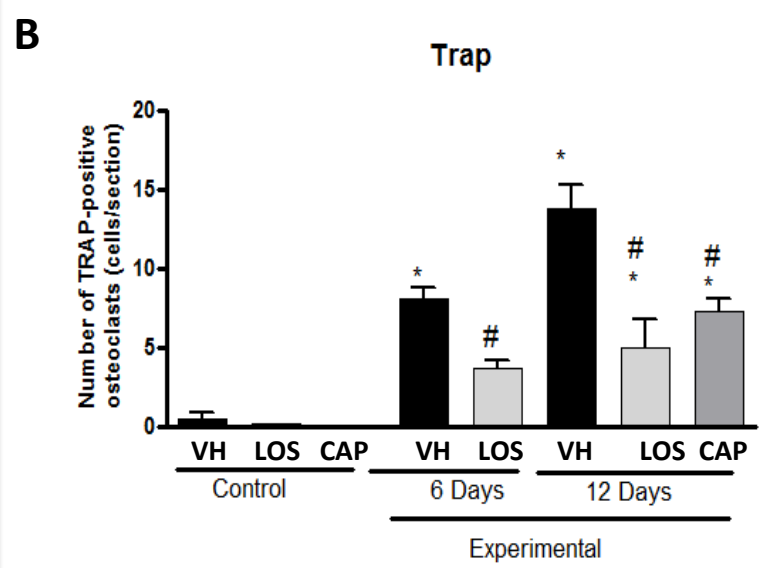
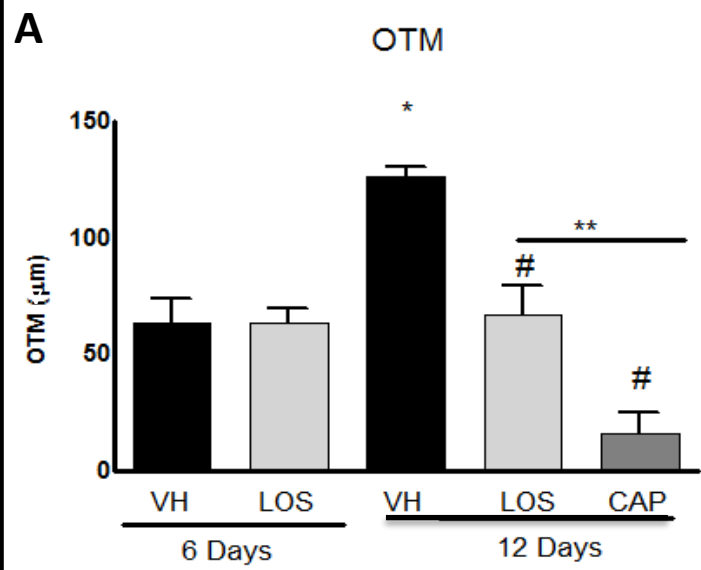


Fig 4. A. time course of changes in the amount of OTM between VH, LOS and CAP animals. **B.** number of TRAP-positive osteoclast. **C- I:** histologic changes related to OTM, with sections of periodontium around the distobuccal root of the first molar stained with TRAP. **C.** control group (without mechanical loading) **D.F.H.** wild-type, losartan and captopril experimental groups (12 days of mechanical loading) respectively. **E.G.I.** higher views of the identified areas in C;E;G. Small arrows indicate TRAP-positive osteoclasts; MB, mesial alveolar bone; DB, distal alveolar bone; PL, periodontal ligament; R, root; Large arrows indicate the direction of tooth movement. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM. * $p\leq 0,05$ comparing the control group with the respective experimental group. # $p\leq 0,05$ comparing the VH, LOS and CAP experimental groups (1 way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test). Bar=100 μ m.

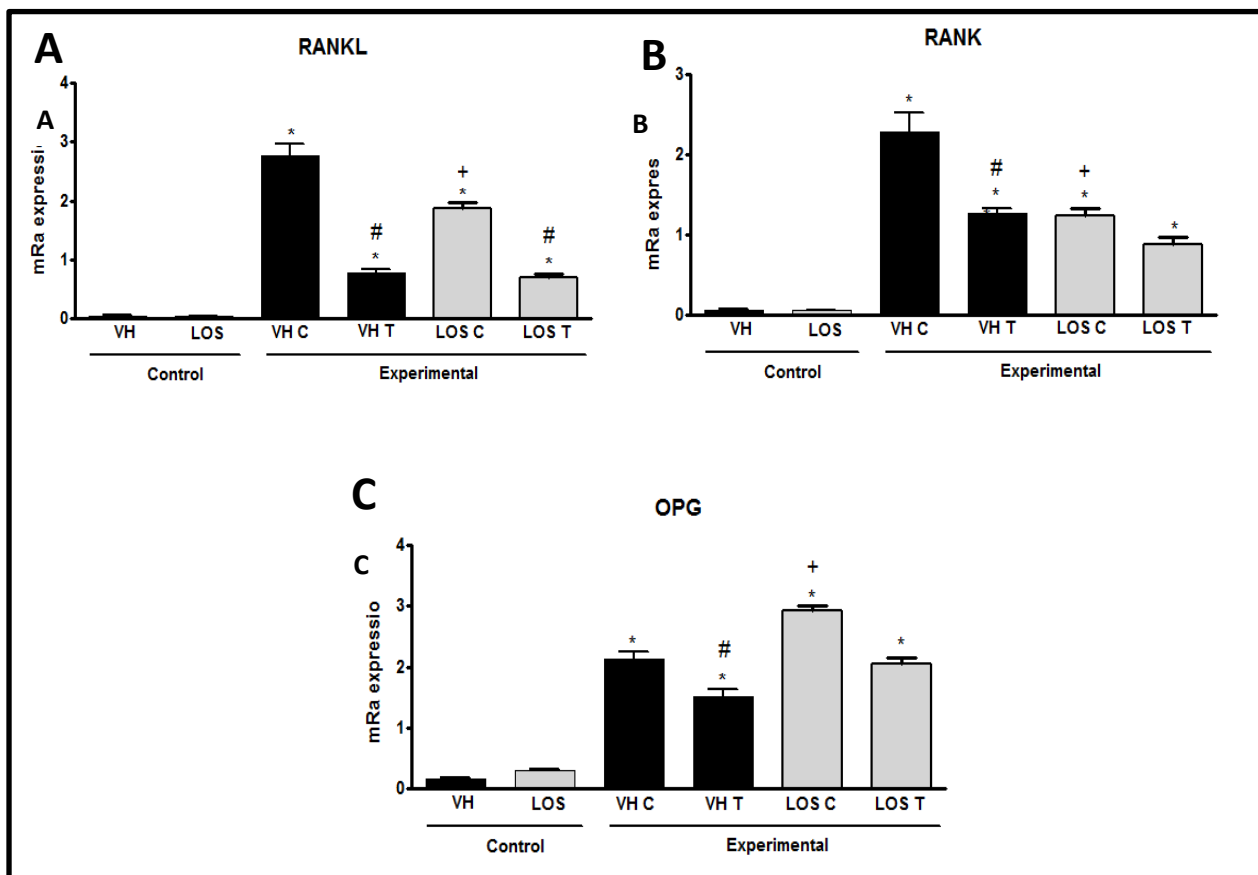


Fig 5. mRNA expression of osteoclast differentiation and activity markers: **A.** RANKL; **B.** RANK; and **C.** OPG in VH and LOS treated animals. Data are expressed as mean $\pm$ SEM. * $p \leq 0,05$ comparing the control with the respective experimental group. # $p \leq 0,05$ comparing CS and TS of the same group. + $p \leq 0,05$ comparing the vehicle and the experimental group (1 way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test).

Appendix Table I

Table 1 - Primer sequences and reaction properties

Target/GI	Forward and reverse sequences	At (°C)	Mt (°C)	Bp
RANK	(F) 5'-CAAACCTTGGACCAACTGCAC-3'	60	84	76
GI:110350008	(R) 5'-GCAGACCACATCTGATTCCGT-3'			
OPG	(F) 5'-GGAACCCCAGAGCGAAATACA-3'	57	77	225
GI:2072182	(R) 5'-CCTGAAGAATGCCTCCTCACA-3'			
RANKL	(F) 5'- CAGAAGATGGCACTCACTGCA-3'	65	73	203
GI:114842414	(R) 5'- CACCATCGCTTTCTCTGCTCT-3'			

At, Annealing temperature; Mt, melting temperature; Bp, base pairs of amplification size; GI, GenInfo Identifier; F, forward; R, reverse.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Essa pesquisa foi realizada através de uma parceria com a Universidade Federal de Minas Gerais e pertence a uma linha que estuda os fatores biológicos que influenciam a movimentação dentária ortodôntica. Essa linha teve início no doutorado do Dr. Ildeu Andrade Jr, orientador desse trabalho e visa esclarecer o papel dos mediadores inflamatórios que estão presentes no recrutamento, diferenciação e ativação de osteoclastos durante a movimentação dentária ortodôntica. Seguindo esse propósito, o presente estudo analisa o papel da angiotensina II na movimentação dentária ortodôntica, uma vez que o número de pacientes adultos e hipertensos cresce a cada ano nos consultórios odontológicos.

Os resultados dessa pesquisa nos permite concluir que:

- a) a quantidade de MDO pode ser modulada pela inibição da via da ANG II;
- b) a quantidade de MDO é reduzida com a administração de drogas inibidoras da ECA e bloqueadoras dos receptores de ANG II;
- c) mediadores inflamatórios como RANK e RANKL, envolvidos diretamente na osteoclastogênese, encontram-se diminuídos após a inibição da ANGII;
- d) níveis de expressão de OPG encontram-se elevados após a inibição da ANG II;
- e) redução do número de osteoclastos nos grupos tratados com Losartan e Captopril.

Nossos resultados sugerem que a inibição da cascata da angiotensina II altera o processo de remodelação óssea, reduzindo o recrutamento de mediadores responsáveis pelo aumento da reabsorção óssea e consequentemente diminuindo a quantidade de MDO.

Esses achados são pioneiros e abrem perspectiva para que futuros estudos possam desenvolver mecanismos capazes de modular a cascata da ANG II e assim regular doenças inflamatórias como a artrite reumatoide e a osteoporose, além de modular a MDO.

REFERÊNCIAS

- ABEDIN, M.; TINTUT, Y.; DEMER, L.L. Vascular calcification: mechanism and clinical ramifications. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.24, n.4, p. 1161-1170, July 2005.
- AGÊNCIA DE PESQUISA E QUALIDADE EM CUIDADOS COM A SAÚDE. Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América, 2007 a 2009. Disponível em: <<http://www.ahrq.gov>> Acesso em: Nov. 2013
- ANDRADE, I. et al. The role of tumor necrosis factor receptor type I in orthodontic tooth movement. **Journal of Dental Research**, v.86, n.11, p. 1089-1094, 2007.
- AOKI, S. et al. Function of OPG as a traffic regulator for RANKL is crucial for controlled osteoclastogenesis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.25, n.9, p. 1907-1921, SepT. 2010.
- ASABA, Y. et al. Activation of renin-angiotensin system induces osteoporosis independently of hypertension. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.24, n.2, p. 241-250, Feb. 2009.
- BOYCE, B.F.; XING, L. Bruton and Tec: new links in osteoimmunology. **Cell Metabolism**, v.7, n.4, p. 283-285, Apr. 2008.
- BROULIK, P.D. et al. Impact of antihypertensive therapy on the skeleton: effects of enalapril and AT1 receptor antagonist losartan in female rats. **Physiological Research**, v.50, n.4, p. 353-358, Jan. 2001.
- CLAYTON, J.S. et al. Effects of prostaglandins and nitric oxide on the renal effects of angiotensin II in the anaesthetized rat. **British Journal of Pharmacology**, v.124, n.7, p. 1467-1474, Aug. 1998.
- FRANCESCHI, R.T. The developmental control of osteoblast-specific gene expression role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists**, v.10, n.1, p. 40-57, 1999.
- GARLET, T.P. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. **European Journal of Oral Science**, v.115, n.5, p. 355-362, Oct. 2007.
- GJESDAL, C.G. et al. Plasma total homocysteine level and bone mineral density: the Hordaland homocysteine study. **Formerly Archives Internal Medicine**, v.166, n.1, p. 88-94, Jan. 2006.
- HAGIWARA, H. Deceleration by angiotensin II of the differentiation and bone formation of rat calvarial osteoblastic cells. **The Journal of Endocrinology**, v.156, n.3, p. 543-550, Mar. 1999.

HENNEMAN, S.; VON DEN HOFF, J.W.; MALTHA, J.C. Mechanobiology of tooth movement. **European Journal of Orthodontics**, v.30, n.3, p. 299-306, June 2008.

HUNYADY, L.; CATT, K.J. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. **Molecular Endocrinology**, v.20, n.5, p. 953-970, May 2006.

INADA, Y. et al. Pharmacologic properties of candesartan cilexetil-possible mechanisms of long-acting antihypertensive action. **Journal of Human Hypertension**, v.13, n.1, p. 75-80, Jan. 1999.

IZU, Y. et al. Angiotensin II type 2 receptor blockade increases bone mass. **The Journal of Biological Chemistry**, v.284, n.31, p. 4857-4864, July 2009.

KRISHNAN, V.; DAVIDOVITCH, Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v.129, n.4, p. 1-32, 2006.

NOUET, S.; NAHMIAS, C. Signal transduction from the angiotensin II AT2 receptor. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.11, n.1, p. 1-6, Jan. 2000.

PARHAMI, F. et al. Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v.17, n.4, p. 680-687, Apr. 1997.

PARHAMI, F. et al. High-density lipoprotein regulates calcification of vascular cells. **Circulation Research**, v.91, n.7, p. 570-576, Oct. 2002.

PAUL, M.; POYAN, A.M.; KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiological Reviews**, v.86, n.3, p. 747-803, July 2006.

REJNMARK, L.; VESTERGARD, P.; MOSEKILDE, L. Treatment with beta-blockers, ACE inhibitors, and calcium-channel blockers is associated with a reduced fracture risk: a nationwide case-control study. **Journal of Hypertension**, v.24, n.3, p. 581-589, Mar. 2006.

ROSAMOND, W. et al. Heart disease and stroke statistics-2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**, v.117, n.4, p. 25-146, Jan. 2008.

SHIMIZU, H. et al. Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. **FASEB Journal: Federation of American Societies for Experimental Biology**, v.22, n.7, p. 2465-2475, July 2008.

TADDEI, S.R. et al. Role of CCR2 in orthodontic tooth movement. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v.141, n.2, p. 153-160, Feb. 2012.

TEITELBAUM, S.L. Bone resorption by osteoclasts. **Science**, v.289, n.5484, p. 1504-1508, Sept. 2000.

TINTUT, Y. et al. Inhibition of osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 by the cAMP pathway in osteoblastic cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.247, n.41, p. 28875-28879, Oct. 1999.

ZOU, T. et al. TRB3 mediates homocysteine-induced inhibition of endothelial cell proliferation. **Journal of Cellular Physiology**, v.226, n.11, p. 2782-2789, Nov. 2011.

ANEXO A - Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG**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.

Profª. 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