

**Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais**

**Departamento de Odontologia**

**O PAPEL DA 5-LIPOXIGENASE NA MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA ORTODÔNTICA**

**ADRIANA PEDROSA MOURA**

**Belo Horizonte**

**2010**

Adriana Pedrosa Moura

**O PAPEL DA 5-LIPOXIGENASE NA MOVIMENTAÇÃO  
DENTÁRIA ORTODÔNTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Ortodontia.

Orientador: Dr. Ildeu Andrade Júnior

Co-orientador: Me. Silvana de Albuquerque Taddei

**Belo Horizonte**

**2010**

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

M929p Moura, Adriana Pedrosa  
O papel da 5-lipoxigenase na movimentação dentária ortodôntica / Adriana Pedrosa Moura. Belo Horizonte, 2010.  
51f. : il.

Orientador: Ildeu Andrade Júnior  
Co-orientadora: Silvana de Albuquerque Taddei  
Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

1. Osteoclastos. 2. Movimentação dentária. 3. Leucotrieno B4. 4. Araquidonato 5. Lipoxigenase. I. Andrade Júnior, Ildeu. II. Taddei, Silvana de Albuquerque. III. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDU: 616.314-089.843

## FICHA DE APROVAÇÃO

***À minha família pelo amor e apoio incondicionais***

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Ildeu Andrade, por ter confiado em mim o prosseguimento desta linha de pesquisa, por suas valiosas correções nesta dissertação e também por sua atenção a esta pesquisa.

À professora Tarcília, por ceder seu laboratório, por sua confiança e disponibilidade e por ter sempre demonstrado interesse e atenção a esta pesquisa. Além disso, por ter me incentivado a prosseguir na carreira acadêmica.

Ao professor Mauro, por ter cedido seu laboratório e os meios para a execução deste projeto. Sem este apoio a pesquisa não poderia ser realizada.

À Silvana, que além de co-orientadora foi amiga e companheira, estando sempre ao meu lado no laboratório. Seu suporte acadêmico e pessoal foi inestimável ao longo destes dois anos e meio.

Ao Celso, pois sem ele seria impossível conciliar as atividades na PUC com a pesquisa na UFMG. Seu apoio para esta pesquisa foi essencial.

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.

Ao corpo docente da PUC Minas: Dr. Ildeu Andrade, Dr. Armando Lima, Dr. José Maurício Vieira, Dr. Heloísio Leite, Dr. Flávio Almeida, Dr. José Eymard Bicalho, Dr. Ênio Mazzeiro, Dr. Dauro Oliveira, Dr. Júlio Brant, Dr. Hélio Brito, Dr. Bernardo Souzi e Dr. Tarcísio Junqueira, por ter me proporcionado dois anos e meio de muito aprendizado, que com certeza, serão um divisor de águas em minha vida.

Ao Professor Dauro Oliveira, por ser exemplo de profissional, pelo incentivo e por ter ajudado no meu crescimento profissional.

Ao Professor José Maurício, por ter aberto as portas de seu consultório e me proporcionado um aprendizado de grande inestimável

Aos funcionários da PUC Minas, pelo apoio e amizade. Em especial ao Diego, Alcides, Lorraine, Vivian, Andreza, Toninha, Mariângela e Ana Paula.

Aos meus amigos baianos, minha segunda família, por estarem sempre presentes em minha vida. Por me mostrarem que quando o sentimento é verdadeiro a distância física não existe.

Aos meus colegas de mestrado Cybelle, Flávia, Larissa, Lucas e Tatiana pela convivência e amizade.

Aos meus colegas do mestrado das turmas IIX, IX, XI, pela convivência nestes anos de COP, pelo companheirismo e amizade.

Aos meus amigos mineiros, especialmente a Tatita e Flavinha, por me acolherem. Foram 29 meses muito difíceis, mas teriam sido impossíveis sem a presença de vocês.

## RESUMO

O movimento dentário ortodôntico é resultado da transdução de uma força mecânica em remodelamento ósseo. Esse processo é regulado por uma inflamação asséptica e transitória do ligamento periodontal, caracterizada pela liberação de vários mediadores inflamatórios, como os leucotrienos (LTs), metabólitos do ácido araquidônico produzidos pela via 5-lipoxigenase (5-LO). Os LTs estão envolvidos na formação e diferenciação de osteoclastos, o que sugere que a 5-LO modula, de alguma forma, a movimentação dentária ortodôntica. O objetivo deste trabalho foi investigar o papel da 5-LO no recrutamento de osteoclastos durante a movimentação dentária ortodôntica. Uma mola ortodôntica de Ni-Ti foi colocada entre os incisivos e o primeiro molar superior direito de camundongos, divididos em 4 grupos: deficientes para 5-LO (5-LO<sup>-/-</sup>), selvagens (WT), tratados com veículo (Veículo) e tratados com Zileuton (Zileuton) droga inibidora da via da 5-LO. O lado esquerdo, sem mola ortodôntica foi considerado controle. Para análise histológica, os animais foram sacrificados após 6 e 12 dias de força mecânica. A distância entre a junção amelocementária entre o primeiro e o segundo molar foi medida para determinar a quantidade de movimentação ortodôntica. A contagem de osteoclastos TRAP-positivos foi realizada na superfície do osso mesial da raiz disto vestibular do primeiro molar superior. Observou-se que a movimentação dentária e o número de osteoclastos estavam diminuídos nos animais 5-LO<sup>-/-</sup> e nos tratados com Zileuton, em comparação com os WT e tratados com veículo, respectivamente. Os resultados sugerem que metabólitos derivados da via da 5-LO podem regular positivamente o recrutamento de osteoclastos e, conseqüentemente, a movimentação dentária ortodôntica.

**Palavras chave:** Osteoclasto. Movimentação ortodôntica. Leucotrieno. 5-lipoxigenase.

## ABSTRACT

Mechanoresponses and inflammation are both essential for achieving orthodontic tooth movement (OTM). This process is characterized by the release of several molecules, such as leukotrienes (LT) produced by 5-lipoxygenase (5-LO) via. LTs are involved in osteoclast formation and differentiation, which suggests that 5-LO modulates, at least in part, OTM. The present study aimed to investigate the role of 5-LO in osteoclast recruitment during OTM. An orthodontic appliance consisting of a Ni-Ti coil spring, was placed between incisors and first molar of 5-LO deficient mice (5-LO<sup>-/-</sup>), wild type mice (WT), mice treated with Zileuton (5-LO inhibitor) (Zileuton) and vehicle-treated mice (Vehicle). Animals were killed on days 6 and 12 for histological analysis. The CEJ distance between the first and the second molar was measured to determine the amount of tooth movement. TRAP positive osteoclasts were counted from the mesial bone of the distal-buccal root of the first molar. The number of osteoclasts and, consequently, the OTM were significantly diminished in 5-LO<sup>-/-</sup> and in Zileuton treated mice, when compared to WT and Vehicle mice, respectively. These findings suggest that 5-LO derived metabolites might be upregulators of osteoclasts recruitment and, consequently, of OTM.

**Keywords:** Osteoclasts. Orthodontic tooth movement. Leukotriene. 5-lipoxygenase.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**CEJ** - Cemento enamel junction – Junção amelo-cementária

**COX** - Cicloxigenase

**DB** - Distal bone – osso distal

**FIG** - Figura

**JAC** - Junção amelo-cementária

**LP** - Ligamento periodontal

**LT** - Leucotrieno

**LTB<sub>4</sub>** - Leucotrieno B<sub>4</sub>

**LTC<sub>4</sub>** - Leucotrieno C<sub>4</sub>

**LTD<sub>4</sub>** - Leucotrieno D<sub>4</sub>

**LTE<sub>4</sub>** - Leucotrieno E<sub>4</sub>

**MB** - Mesial bone – osso mesial

**M-CSF** – Macrophage colony-stimulating factor - Fator estimulador de colônias de macrófagos

**MDO** - Movimentação dentária ortodôntica

**Ni-Ti** - Níquel titânio

**OC** - Osteoclasto

**OTM** - Orthodontic tooth movement – movimentação dentária ortodôntica

**PGE<sub>2</sub>** - Prostaglandina E<sub>2</sub>

**TRAP** - Fosfatase ácida resistente ao tartarato

**5-LO** - 5-lipoxigenase

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 CONSIDERAÇÕES GERAIS</b>   | <b>10</b> |
| <b>2 INTRODUÇÃO</b>   | <b>11</b> |
| <b>3 OBJETIVOS</b>  | <b>14</b> |
| <b>3.1 Objetivo geral</b>   | <b>14</b> |
| <b>3.2 Objetivos específicos</b>  | <b>14</b> |
| <b>4. METODOLOGIA</b>   | <b>15</b> |
| <b>4.1 Delineamento experimental</b>  | <b>15</b> |
| <b>4.2 Protocolo experimental</b>   | <b>15</b> |
| <b><i>4.2.1 Instalação do aparelho ortodôntico</i></b>                        | <b>16</b> |
| <b><i>4.2.2 Distribuição dos animais para análises histomorfométricas</i></b> | <b>20</b> |
| <b><i>4.2.3 Protocolo de tratamento com veículo ou Zileuton</i></b>           | <b>21</b> |
| <b>4.3 Processamento histológico</b>  | <b>22</b> |
| <b>4.4 Análise histomorfométrica</b>  | <b>23</b> |
| <b><i>4.4.1 Contagem de células TRAP-positivas</i></b>                        | <b>23</b> |
| <b><i>4.4.2 Mensuração da movimentação dentária</i></b>                       | <b>24</b> |
| <b>4.5 Análise estatística</b>  | <b>25</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b>  | <b>26</b> |
| <b>APÊNDICE ARTIGO</b>  | <b>30</b> |

## 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Esta dissertação intitulada “O papel da 5-lipoxigenase na movimentação dentária ortodôntica” é parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ortodontia pela Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas).

Este trabalho segue a linha de pesquisa que estuda a biologia do movimento dentário e foi desenvolvida em associação com a Universidade Federal de Minas Gerais. Esta cooperação entre as universidades, bem como o desenvolvimento do modelo de movimentação dentária ortodôntica em camundongos, foi iniciada no doutorado do Dr Ildeu Andrade Jr., orientador desta dissertação. O intuito desta linha de pesquisa é elucidar o papel dos mediadores inflamatórios envolvidos no recrutamento, diferenciação e ativação de osteoclastos na movimentação dentária ortodôntica. Dando sequência, o presente trabalho analisa o papel da 5-lipoxigenase e de seus metabólitos no recrutamento de osteoclastos e na modulação da movimentação ortodôntica.

De acordo com as normas vigentes na PUC Minas esta dissertação gerou o artigo “The role of 5-lipoxygenase in orthodontic tooth movement”.

## 2 INTRODUÇÃO

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 (DAVIDOVITCH, 2009). A aplicação desta força mecânica desencadeia uma resposta inflamatória com a liberação de mediadores químicos, tais como fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e metabólitos do ácido araquidônico (KRISHNAN e DAVIDOVITCH, 2006; DAVIDOVITCH, 1988).

Dentre estes mediadores, cabe ressaltar o ácido araquidônico, um ácido graxo essencial presente na membrana celular (FUNK, 2001). Sua liberação decorre de estímulos como trauma mecânico, ação de citocinas específicas e fatores de crescimento, dentre outros estímulos dependentes do tipo celular (FUNK, 2001). Na movimentação ortodôntica, a alteração da vascularidade e do fluxo sanguíneo no ligamento periodontal promove também a liberação deste metabólito (KRISHNAN e DAVIDOVITCH, 2006). Uma vez liberado, o ácido araquidônico pode ser metabolizado por duas vias. A via da cicloxigenase, onde se destaca a ação da enzima cicloxigenase (COX), resulta na produção de prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina (WANG e DUBOIS, 2010). Outra via de metabolização deste ácido é a da lipoxigenase, tendo a 5-lipoxigenase (5-LO) como enzima chave deste processo, pois apresenta papel fundamental na catabolização dos estágios iniciais da formação de leucotrienos (LTs) (COLLET e STEWART, 1991).

Tanto as prostaglandinas quanto os LTs são mediadores lipídicos potentes presentes em diversas funções biológicas bem como na inflamação (FUNK, 2001). Vários estudos têm investigado, *in vivo* e *in vitro*, a ação das prostaglandinas sobre a remodelação óssea, em especial a PGE<sub>2</sub>. Sua aplicação local, com diversas concentrações, foi relacionada ao aumento na movimentação dentária ortodôntica (YAMASAKI et al., 1982; LEICKER et al., 1995). Sendo assim, a PGE<sub>2</sub> é considerada um dos mediadores locais mais importantes na regulação do metabolismo ósseo (HIKIJU et al., 2008). Apesar do papel determinante das prostaglandinas na remodelação óssea e, conseqüentemente na movimentação ortodôntica, pouco se

estudou sobre o papel dos leucotrienos na remodelação óssea (TRAINEDES et al., 1998).

Os LTs são resultado da ação direta da enzima 5-LO e são produzidos por diversos tipos celulares, predominantemente células inflamatórias, tais quais leucócitos polimorfonucleares, mastócitos e macrófagos (FUNK, 2001). A descoberta que células ósseas, osteoclastos e osteoblastos, possuem tal sistema enzimático e, portanto, produzem LTs suscitou interesse acerca do papel destes sobre a remodelação óssea (COLLET e STEWART, 1991).

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm ressaltado a influência dos LTs sob células ósseas. Um dos primeiros estudos sobre o papel deste metabólito demonstrou que os LTs estimulam a reabsorção óssea (MEGHJI et al., 1988). Estudos posteriores 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 da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) (FLYNN et al., 1999).

A ação dos LTs sobre osteoclastos pode ser mediada pelo receptor BLT1 expresso por estas células. Sendo assim, o leucotrieno B<sub>4</sub> produzido pelos próprios osteoclastos pode atuar de uma forma autócrina/parácrina através deste receptor (HIKIJI et al., 2009) e promover a sua diferenciação de uma forma independente de RANKL (HIKIJI et al., 2009; JIANG et al., 2005). A administração de LTB<sub>4</sub> na calvária de camundongos *in vivo* aumenta a reabsorção óssea devido ao aumento na formação de osteoclastos (GARCIA et al., 1996a). Os cisteinil LTs, tais como LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>, estimulam a formação de lacunas de reabsorção e o aumento na quantidade de células TRAP positivas (GARCIA et al., 1996b). Além disso, a influência dos LTs foi testada através da utilização de animais *knockout* para 5-LO. Foi demonstrado que estes animais possuem maior espessura da cortical óssea (BONEWALD et al., 1997) e menor perda óssea após ovariectomia quando comparado a animais selvagens (BONEWALD et al., 1997).

Os LTs têm sido relacionados a uma série de doenças inflamatórias como asma e doença de Bowel (CUZZOCREA et al., 2005). Além disso, os níveis de LTB<sub>4</sub> estão aumentados em doenças inflamatórias associadas à reabsorção óssea, periodontite (PRADEEP et al., 2007), osteomielite pós traumática (KLOSTERHALFEN et al., 1996) e artrite reumatóide (GURSEL et al., 1997). Sendo assim, medicamentos

para o tratamento destas doenças podem ter como alvo a enzima 5-lipoxigenase (WERZ e STEINHILBER, 2005), visto que seu bloqueio impede a formação tanto de LTB<sub>4</sub> quanto de cisteinil leucotrienos (WERZ e STEINHILBER, 2006).

Drogas que bloqueiam os receptores dos LTs, e outras que atuam sobre a enzima 5-LO, são amplamente utilizadas no tratamento de diversas doenças (WERZ e STEINHILBER, 2006). Desta forma, papel dos leucotrienos na remodelação óssea também foi testado através da utilização destes inibidores para 5-LO. Em um modelo de remodelação óssea em ratos, foi observada uma diminuição do número de osteoclastos e de células TRAP positivas após o tratamento com o inibidor BWA4C (FRANCHI-MILLER e SAFFAR 1995). A utilização de outro inibidor para 5-LO, AA861, se mostrou eficiente na redução de LTB<sub>4</sub> e promoveu uma menor movimentação ortodôntica (MOHAMMED et al., 1989). Dentre esta categoria de inibidores da 5-LO, cabe ressaltar o Zileuton, que é uma droga consagrada para o tratamento da asma, bloqueando a 5-LO de forma dose-dependente (ZWEIFEL, et al., 2008).

O presente estudo se propõe a investigar a importância da via 5-lipoxigenase no recrutamento de osteoclastos e na movimentação ortodôntica.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da via 5-LO no recrutamento de osteoclastos e, conseqüentemente, na movimentação dentária ortodôntica.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Avaliar o impacto da deleção da enzima 5-LO no recrutamento de osteoclastos e, conseqüentemente, na movimentação dentária ortodôntica.

Avaliar o impacto da inibição da 5-LO, através do uso da droga Zileuton, no recrutamento de osteoclastos e, conseqüentemente, na movimentação dentária ortodôntica.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Delineamento Experimental

Neste experimento foram utilizados 30 camundongos machos C57BL6/J selvagens e 10 animais deficientes para a enzima 5-LO (5-LO<sup>-/-</sup>). Os animais foram divididos em quatro grupos: Selvagens (WT), tratados com Zileuton (inibidor da 5-LO) (Zileuton), tratados com veículo (Veículo) e *knockout* para 5-LO (5-LO<sup>-/-</sup>). A quantidade de movimentação ortodôntica e o número de osteoclastos foram avaliados histopatologicamente após 6 ou 12 dias de aplicação de força mecânica.

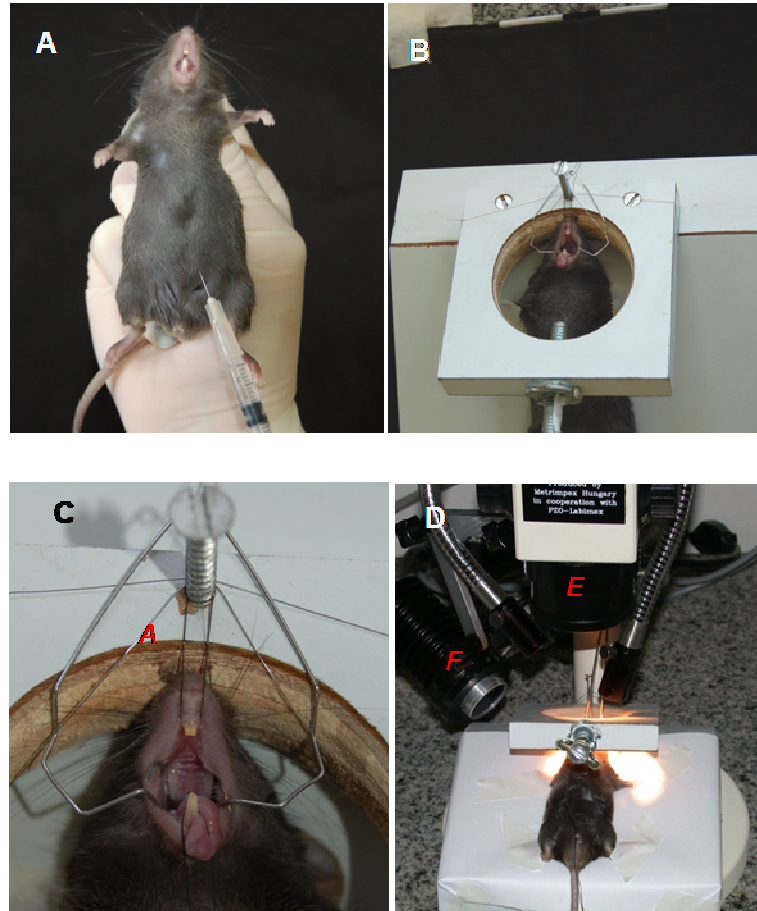
### 4.2 Protocolo experimental

Os animais do presente trabalho foram obtidos do biotério da UFMG e durante todo o período experimental foram mantidos em gaiolas plásticas com dieta pastosa e água sob o ciclo de 12 horas claro e escuro. Todos os animais foram tratados de acordo com o Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob o protocolo CETEA: 135/08. Os animais iniciaram a pesquisa com idade aproximada de 10 semanas e peso médio de 25g. Nesta idade os animais já tinham atingido a maturidade sexual e peso máximo corporal, monitorado por todo o período experimental. Como critério de exclusão avaliou-se: 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%.

#### **4.2.1 Instalação do aparelho ortodôntico**

O protocolo, referente à indução da movimentação ortodôntica, foi baseado na tese do Prof. Dr. Ildeu Andrade Jr. (2007).

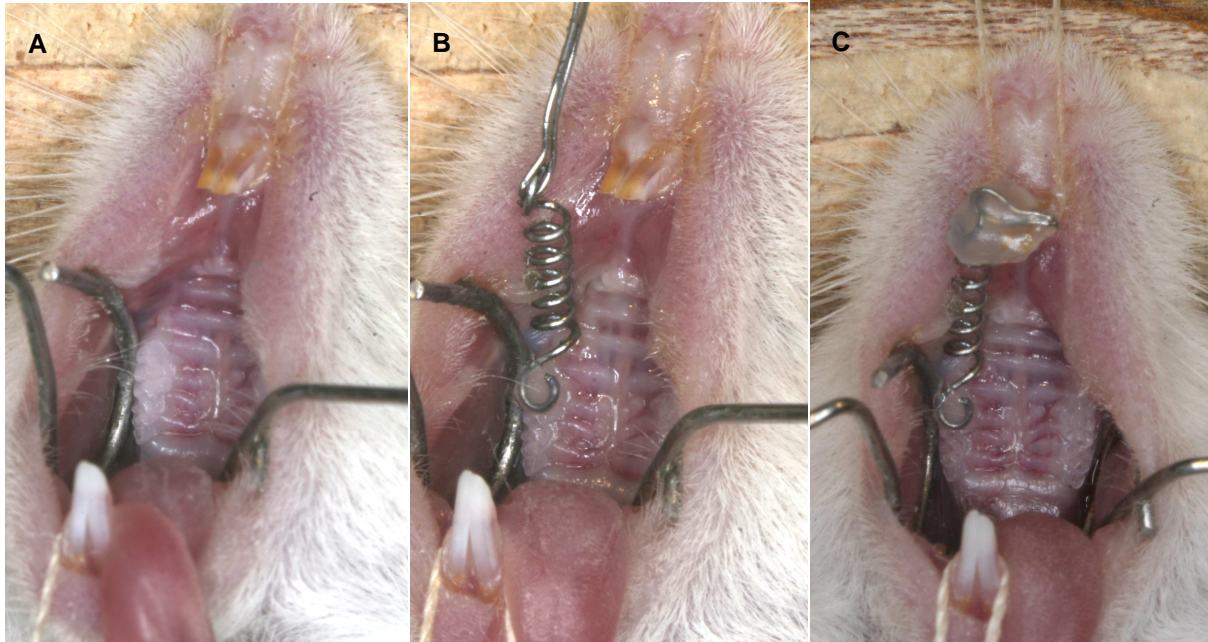
Os camundongos foram anestesiados por injeção intraperitoneal de 0,2 mL/25g de peso corporal, de uma solução contendo xilazina (0,02 mg/mL), ketamina (50 mg/mL) e solução salina em uma proporção de 1: 0,5: 3, respectivamente (FIG. 1A). Uma vez anestesiados, os animais foram colocados com o dorso sob a mesa cirúrgica, especialmente desenhada para restringir movimentos e permitir o acesso intra-oral (FIG. 1B). Foi utilizado também um afastador confeccionado com fio de aço para afastar a mucosa do camundongo (FIG. 1C), um estereomicroscópio (Quimis Aparelhos Cinéticos Ltda, Diadema, Brasil) e iluminação por fibra óptica (Multi-Position Fiber Optic Illuminator System, Cole-Parmer Instrument Company Ltda, London, England) (FIG. 1D), com o intuito de possibilitar melhor visualização dos molares superiores.



**Figura 1:** **A)** Anestesia intraperitoneal. **B)** Mesa cirúrgica com camundongo posicionado em decúbito dorsal, desenvolvida para restringir movimentos e permitir o acesso intra-oral. **C)** Afastador de lábios e bochecha posicionado na cavidade bucal do camundongo. **D)** Mesa cirúrgica posicionada sobre estereomicroscópio e fibra óptica para iluminação. **A**, afastador de lábios; **E** esteromicroscópio; **F**, fibra óptica. Fotos gentilmente cedidas por Silvana de Albuquerque Taddei.

Uma vez que o animal estava anestesiado, bem posicionado e o campo iluminado se iniciou a colagem do aparelho ortodôntico. A superfície oclusal do primeiro molar superior do lado direito e os incisivos foram limpos com acetona por 10 segundos e posteriormente um selante auto-adesivo (*self-etching primer*, Unitek, 3M, Mineapolis, USA) foi aplicado. 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, USA) foi posicionada na face oclusal do primeiro molar superior direito. A colagem da mola foi realizada com resina fotopolimerizável (Transbond, Unitek/3M, St. Paul, MN) (FIG. 2B). A porção anterior/mesial da mola foi ativada no sentido mesial e fixada com a mesma resina nos incisivos (FIG. 2C). Estes dentes foram unidos com resina seguindo o protocolo preconizado por Beertsen et al.

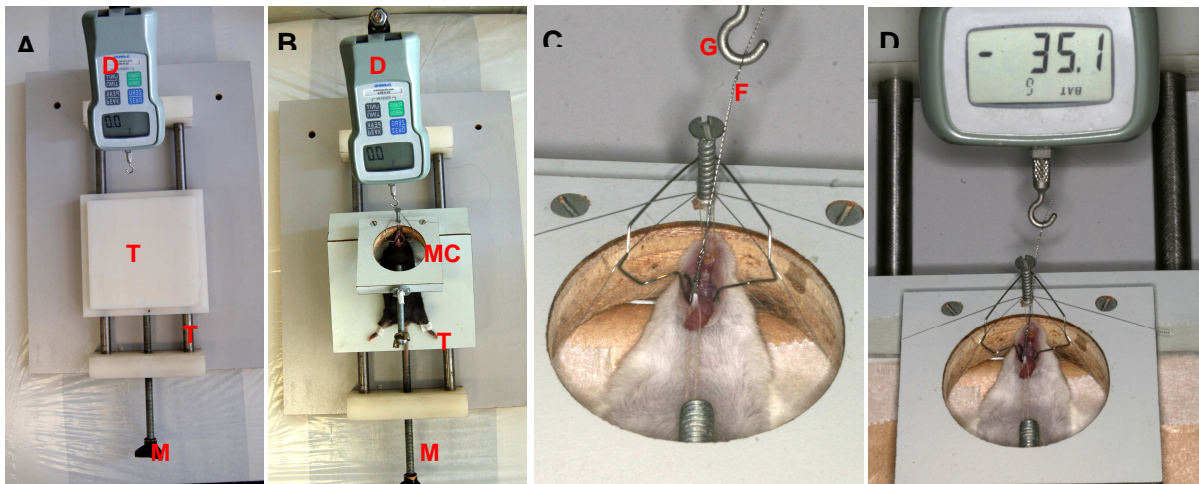
(1982), com objetivo de prevenir a erupção dos incisivos e a conseqüente perda de ancoragem. Não houve reativação da mola durante o período experimental.



**Figura 2:** **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. Fotos gentilmente cedidas por Silvana de Albuquerque Taddei.

Estudo piloto anterior, realizado na tese em andamento da coorientadora desta dissertação Silvana de Albuquerque Taddei preconizou o uso da força de 35g para a ativação da mola esta metodologia foi publicada no artigo CCR2 on osteoclastic activity in orthodontic tooth movement na Journal of Dental Research. Para a calibração desta força foi utilizado um dinamômetro (Shimpo Corp., Tokyo, Japan) (FIG. 3A), fixado sobre uma plataforma. Esta plataforma era composta de um trilho (FIG. 3A) sob o qual deslizava a mesa cirúrgica. Desta forma, era possível a movimentação da mesa através do giro de uma manivela (FIG. 3B). Na extremidade oposta à manivela estava disposta uma torre onde o dinamômetro foi fixado (FIG. 3B). A utilização desta plataforma permitiu um maior controle do experimento ao 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. 3C). Para a

ativação da mola, a manivela da plataforma foi girada movimentando assim a mesa cirúrgica para trás até registrar no dinamômetro a força ortodôntica de 0,35N (35g). Uma vez atingida a força, a mola foi fixada nos incisivos (FIG. 3D).



**Figura 3:** **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 35g de ativação da mola ortodôntica. D, dinamômetro; T, trilho; M, manivela; MC, mesa cirúrgica; G, gancho de medição do dinamômetro; F, fio de aço. Fotos gentilmente cedidas por Silvana de Albuquerque Taddei.

Como protocolo para impedir que o peso do animal interferisse na mensuração da força ortodôntica pelo dinamômetro, o camundongo permaneceu totalmente imobilizado durante a ativação da mola. Sendo assim, as patas e o rabo do animal foram fixados com fita adesiva (FIG. 1D), impossibilitando a movimentação do corpo do mesmo em direção ao dinamômetro durante a ativação da mola. Também com o intuito de impedir a movimentação da cabeça do animal, um afastador foi utilizado. Além disso, a influência do peso do fio de aço, que liga a mola ao gancho de ativação do dinamômetro, foi também eliminada, pois o dinamômetro foi ligado apenas quando o fio estava totalmente esticado sem apresentar deformação da mola.

#### 4.2.2 Distribuição dos animais em grupos para avaliação histomorfométricas

Os animais foram divididos em quatro grupos: Selvagem, *knockout* para 5-LO, tratamento com veículo e tratamento com Zileuton. Cada grupo era composto de 10 animais, sendo 5 sacrificados após 6 dias e os outros 5 após 12 dias de aplicação de força ortodôntica. 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.

A escolha do dia de sacrifício dos animais seguiu o protocolo da tese do Dr. Ildu Andrade Jr. No estudo realizado por este autor, foi observado que o número de osteoclastos atinge seu número máximo após 12 dias do início da força, contudo seu valor já era significativamente maior após 6 dias.



**Figura 4:** Desenho esquemático demonstrando a divisão dos animais para o desenvolvimento do modelo.

**Quadro 1** - Distribuição dos animais para avaliações histopatológicas. Os animais foram distribuídos para a avaliação microscópica (n = 5), sendo o lado direito experimental (MD) e o lado esquerdo controle (ME) do mesmo animal.

| <b>HISTOLOGIA</b> |             |            |                           |             |            |
|-------------------|-------------|------------|---------------------------|-------------|------------|
| <b>WT</b>         |             |            | <b>5-LO<sup>-/-</sup></b> |             |            |
|                   | <b>Cont</b> | <b>Exp</b> |                           | <b>Cont</b> | <b>Exp</b> |
| Dia 6             | <b>5ME</b>  | <b>5MD</b> | Dia 6                     | <b>5ME</b>  | <b>5MD</b> |
| Dia 12            | <b>5ME</b>  | <b>5MD</b> | Dia 12                    | <b>5ME</b>  | <b>5MD</b> |
| <b>Veículo</b>    |             |            | <b>Zileuton</b>           |             |            |
|                   | <b>Cont</b> | <b>Exp</b> |                           | <b>Cont</b> | <b>Exp</b> |
| Dia 6             | <b>5ME</b>  | <b>5MD</b> | Dia 6                     | <b>5ME</b>  | <b>5MD</b> |
| Dia 12            | <b>5ME</b>  | <b>5MD</b> | Dia 12                    | <b>5ME</b>  | <b>5MD</b> |

#### **4.2.3 Protocolo do tratamento com veículo ou Zileuton**

Os animais do grupo Zileuton receberam 30 mg/kg/dia da droga associada com o veículo carboxymetil a 0,5%. A droga foi administrada por via oral através de gavagem. Os animais receberam o tratamento com a droga por 6 ou 12 dias de acordo com o protocolo de sacrifício do grupo. Os animais do grupo tratado com veículo receberam apenas carboxymetil a 0,5%, também administrado por gavagem, por 6 ou 12 dias de acordo com o protocolo de sacrifício do grupo.

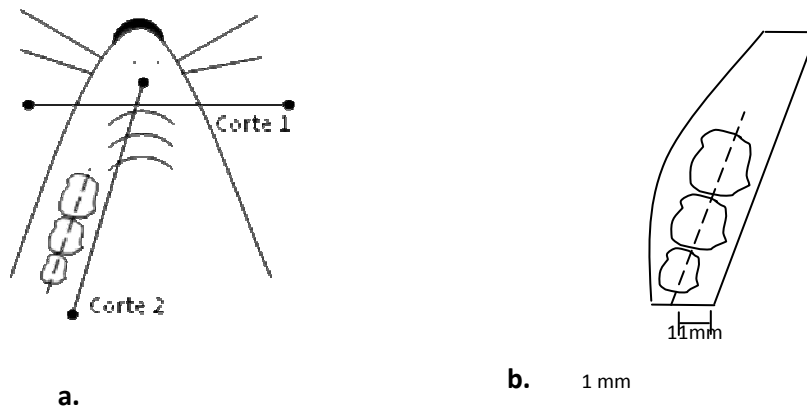
### 4.3 Processamento histológico

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 e ali permaneceu imerso por 48 horas para a fixação. Em seguida, foi iniciado o processo de desmineralização. As amostras foram, então, imersas em uma solução de EDTA 14% (pH 7.4) durante um período de 20 dias com trocas diárias da solução. Após esse período, as amostras foram lavadas por 4 horas com água corrente.

Para a obtenção de secções longitudinais padronizadas, 2 cortes foram realizados nas maxilas com auxílio de um bisturi e um estereomicroscópio (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, Brasil). Inicialmente foi feito um corte na região anterior para a liberação e descarte dos incisivos (FIG. 5). Em seguida, foi realizado um corte transversal na região do palato (FIG. 5). 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 (FIG. 5). Todas as amostras foram 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 em cada. A próxima etapa foi a clarificação utilizando-se xilol 20, 15 e 10 minutos (Processador de Tecido Mono 2000, Lupe Indústria e Comércio Ltda, São Carlos, 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  $\mu$ m utilizando-se 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. As lâminas foram coradas com fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) e contra coradas com hematoxilina.



**Figura 5:** Desenho esquemático Representando em a os cortes realizados na maxila. Primeiro para descarte dos incisivos e depois para a separação dos três molares superiores. O segundo corte realizado a 1 mm da superfície palatal da coroa dos molares e paralelo a linha imaginária passando pelo sulco central dos molares. Figura cedida pelo Dr Ildeu Andrade Jr (Tese de Doutorado- Departamento de Morfologia ICB-UFMG)

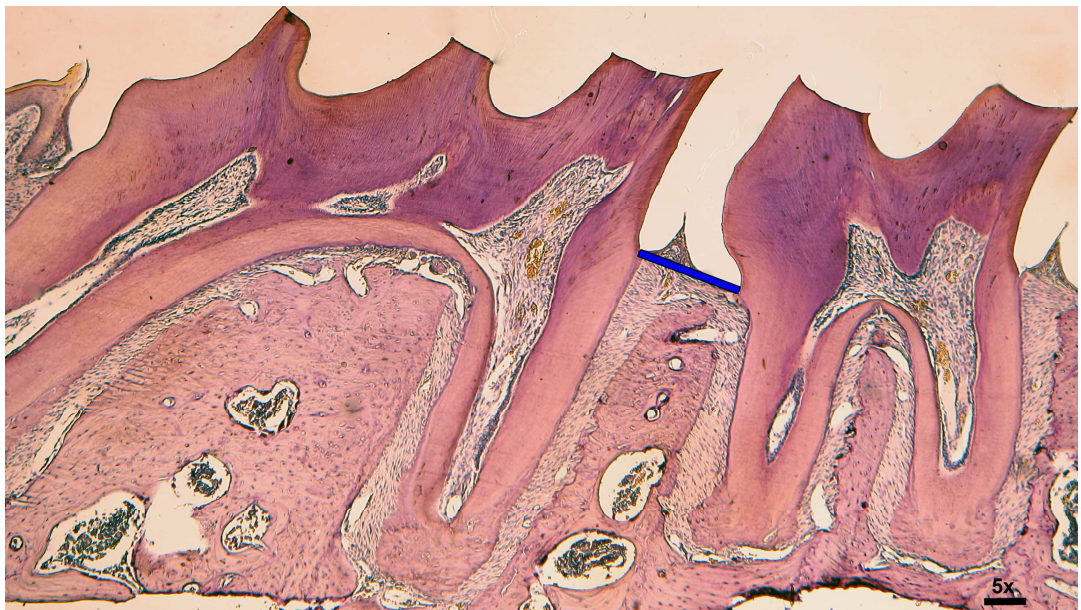
#### 4.4 Análise histomorfométrica

##### 4.4.1 Contagem do Número de Células TRAP- positivas

Os osteoclastos foram identificados como células multinucleadas TRAP-positivas. As lacunas ósseas do osso mesial da raiz distovestibular do primeiro molar foram analisadas utilizando-se um aumento de 40x no microscópio de luz Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). A contagem destas células foi realizada em cinco sessões representativas por animal, em três campos microscópicos consecutivos por sessão, por dois examinadores devidamente calibrados.

#### 4.4.2 Mensuração da movimentação dentária

Para a mensuração da movimentação dentária, as lâminas foram fotografadas utilizando-se um microscópio Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) conectado a uma câmera digital (PowerShot A620, Canon, Tokyo, Japan). A quantidade de movimentação dentária foi calculada a partir da diferença entre a menor distância da junção amelo-cementária (JAC) do primeiro e segundo molares (FIG. 6) do lado experimental (hemi-maxila direita) em relação ao lado controle (hemi-maxila esquerda) do mesmo animal através da utilização de um software Image J (National Institutes of Health – EUA). A mensuração foi realizada em 5 sessões por animal, por dois examinadores, três vezes cada, para cada grupo.



**Figura 6:** Avaliação morfométrica do movimento dentário após a aplicação de força ortodôntica. A linha azul representa a distância entre as junções amelo-cementárias do primeiro e segundo molar superior.

#### **4.5 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  EPM (erro-padrão da média). As comparações entre os grupos foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman-Keuls.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, I.JR.; SILVA, T.A.; SILVA, G.A.; TEIXEIRA, A.L.; TEIXEIRA, M. M. The role of tumor necrosis factor receptor type 1 in orthodontic tooth movement. **Journal of Dental Research**, v.86, n.11, p.1089-1094, 2007.

BEERTSEN, W.; EVERTS, V.; NIEHOF, A.; BRUINS, H. Loss of connective tissue attachment in the marginal periodontium of the mouse following blockage of eruption. **Journal of Periodontal Research**, v.17, n.6, p.640-656, 1982.

BONEWALD, L.F.; ROSSER, J.; DALLAS, M.; STOREY, B.; MUNDY, G.R.; BOYCE, B.F. Mice which lack the functional gene for 5-lipoxygenase loose significantly less bone after ovariectomy. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.12, p.112, 1997.

BONEWALD, L.F.; FLYNN, M.; QIAO, M.; DALLAS, M.R.; MUNDY, G.R.; BOYCE, B.F. Mice lacking 5-LO have increased bone thickness. **Advances in Experimental Medical Biology**, v.433, p.299-302, 1997.

COLLET, A.R.; STEWART, A.G. Eicosanoids: Physiology update and orthodontic implications. **Australian Orthodontic Journal**, v.12, n.2, p.116-123, 1991.

CUZZOCREA, S.; ROSSI, A.; MAZZON, E.; DI PAOLA, R.; GENOVESE, T.; MUIA, C.; CAPUTI, A.P.; SAUTEBIN, L. 5-Lipoxygenase modulates colitis through the regulation of adhesion molecule expression and neutrophil migration. **Laboratory Investigation**, v.85, n.6., p.808–822, 2005.

DAVIDOVITCH, Z.; NICOLAY, O.F.; NGAN, P.W.; SHANFELD, J.L. Neurotransmitters, cytokines and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. **Dental Clinics of North America**, v.32, n.3, 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, n.7, p.597-608, 2009.

FLYNN, M.A.; QIAO, M.; GARCIA, C.; DALLAS, M.; BONEWALD, L.F. Avian osteoclast cells are stimulated to resorb calcified matrices by and possess receptors for leukotriene B4. **Calcified Tissue International**, v.64, n.2, p.154-159, 1999.

FRANCHI-MILLER, C.; SAFFAR, L. The 5-lipoxygenase inhibitor BWA4C impairs osteoclastic resorption in synchronized model of bone remodeling. **Bone**, v.17, n.2, p.185-191, 1995.

FUNK, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosinoids therapy. **Science**, v.294, n.5548, p.1871-1875, 2001.

GALLWITZ, W.E.; MUNDY, G.E.; LEE, C.H.; QIAO, M.; ROODMAN, D.; RAFTERY, M.; GASKELL, S.J.; BONEWALD, L. 5-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid stimulate isolated osteoclasts to resorb calcified matrices. **Journal of Biological Chemistry**, v.268, n.14, p.1087-1094, 1993.

GARCIA, C.; QIAO, M.; CHEN, D.; KIRCHEN, M.; GALLWITZ, M.; MUNDY, G.R.; BONEWALD, L.R. Effects of synthetic peptido-leukotrienes on bone resorption in vitro. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.11, n. 4, p. 521-29, 1996.

GARCIA, C.; BOYCE, B.; GILLES, J.; DALLAS, M.; QIAO, M.; MUNDY, G.R.; BONEWALD, L.F. Leukotriene B4 stimulates osteoclastic bone resorption both *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.11, n.11, p.1619-1627, 1996.

GURSEL, T.; FIRAT, S.; ERCAN, Z.S. Increased serum leukotriene B4 level in the active stage of rheumatoid arthritis in children. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 56, n.3, p.205-207, 1997.

HIKIJ, H.; TAKATO, T.; SHIMIZO, T.; ISHII, S. The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. **Progress in Lipid Research**, v.47, n.2, p.107-126, 2008.

HIKIJ, H.; ISHIB, S.; YOKOMIZO, T.; TAKATO, T.; SHIMIZU, T. A distinctive role of the leukotriene B4 receptor BLT1 in osteoclastic activity during bone loss. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A**, v.106, n.50, p.21294-21299, 2009.

JIANG, J.; Lv., H.; LIN, J.; JIANG, D.; CHEN, Z. 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.

KLOSTERHALFEN, B.; PETERS, K. M.; TONS, C.; HAUPTMANN, S.; KLEIN, C. L.; KIRKPATRICK, C. J. Local and systemic inflammatory mediator release in patients with acute and chronic posttraumatic osteomyelitis. **Journal Trauma**, v.40, n.3, p.372-378, 1996.

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.

LEIKER, B.J.; NANDA, R.S.; CURRIER, G.F.; HOWES, R.I.; SINHA, P.K. The effects of exogenous prostaglandins on orthodontic tooth movement in rats. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v.108, n.4, p.380-388, 1995.

MEGHJI, S.; SANDY, J.R.; SCUTT, A.M.; HARVEY, W.; HARRIS, M. Stimulation of bone resorption by lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. **Prostaglandins**, v.36, n.2, p.139-149, 1988.

MOHAMMED, A.H.; TTAKIS, D.N.; DZIAK, R. Leukotrienes in orthodontic tooth movement. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v.95, n.3, p.231-237, 1989.

PRADEEP, R.; MANJUNATH, S.; SWATI, P.; SHIKHA, C.; SUJATHA, P. Gingival crevicular fluid levels of leukotriene B4 in periodontal health and disease. **Journal of Periodontology**, v.78, n.12, p.2325-2330, 2007.

TRAIANEDES, K.; DALLAS, M.R.; GARRETT, I.R.; MUNDY, G.R.; BONEWALD, L.F. 5-Lipoxygenase metabolites inhibit bone formation in vitro. **Endocrinology**, v.139, n.7, p.3178-3184, 1998.

YAMASAKI, K.; SHIBATA, Y.; FUKUTHARA, T. The Effect of Prostaglandins on experimental tooth movement in Monkeys (*Macaca fuscata*). **Journal of Dental Research**, v.61, n.12, p.1444-1446, 1982.

ZWEIFEL, B.S.; HARDY, M.M.; ANDERSON, G.D.; DUFIELD, D.R.; PUFAHL, R.A.; MASFERRER, J.L. A rat air pouch model for evaluating the efficacy and

selectivity of 5-lipoxygenase inhibitors. **European Journal of Pharmacology**, v.584, n.1, p.166-74, 2008.

WANG, D.; DUBOIS, R.N. Eicosanoids and cancer. **Nat Rev Cancer**, v.10, n.3, p.181-193, 2010.

WERZ, O.; STEINHILBER, D. Development of 5-lipoxygenase inhibitors-lessons from cellular enzyme regulation. **Biochem Pharmacol**, v.70, n.3, p.327-333, 2005.

WERZ, O.; STEINHILBER, D. Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. **Pharmacology and Therapeutics**, v.112, n.3, p.701–718, 2006.

## 6 ARTIGO

### The role of 5-Lipoxygenase in orthodontic tooth movement

A.P. Moura<sup>3</sup>, S.R.A. Taddei<sup>1,2</sup>, I. Andrade Junior<sup>3</sup>, C.M. Queiroz-Junior<sup>1,2</sup>,  
M.M. Teixeira<sup>1</sup>, T.A. Silva<sup>1,21\*</sup>.

1. Laboratory of Immunopharmacology, Department of Biochemistry and Immunology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais – Brazil

2. Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais – Brazil

3. Department of Orthodontics, Faculty of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-Minas), Belo Horizonte, Minas Gerais – Brazil

**1) Short title (running head):** 5-Lipoxygenase and Orthodontic Tooth Movement

**2) Key words:** orthodontic tooth movement –leukotriene – osteoclast- 5-LO

**3) The number of words in the abstract: 187**

**4) The number of words in the abstract and the text (excluding tables, figure, legends, acknowledgments, and cited references): 2047**

**5) The number of tables and figures: 03**

**6) The number of cited references: 32**

---

<sup>1</sup> \* Corresponding author: Adriana Pedrosa Moura Mailing address: Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Phone: 55 31 3409-2478 (voice); 55 31 3499-2430 (Fax). E-mail adrianamoura@hotmail.com

## ABSTRACT

**Introduction:** Mechanoresponses and inflammation are both essential for achieving orthodontic tooth movement (OTM). This process is characterized by the release of several inflammatory mediators, such as leukotrienes (LT), produced by 5-lipoxygenase (5-LO) via. LTs are involved in osteoclast formation and differentiation, which suggests that 5-LO modulates, at least in part, OTM. **Objectives:** The present study aimed to investigate the role of 5-LO in osteoclast recruitment during OTM. **Methods:** An orthodontic appliance, consisting of a Ni-Ti coil spring, was placed between incisors and first molar of 5-LO deficient mice (5-LO<sup>-/-</sup>), wild type mice (WT), mice treated with Zileuton (5-LO inhibitor) (Zileuton) and vehicle-treated mice (Vehicle). Animals were killed on days 6 and 12 for histological analysis. The CEJ distance between the first and the second molar was measured to determine the amount of tooth movement. TRAP positive osteoclasts were counted from the mesial bone of the distal-buccal root of the first molar. **Results:** Tooth movement and osteoclasts numbers were significantly diminished in 5-LO<sup>-/-</sup> and in Zileuton-treated mice. **Conclusion:** Our study suggests that 5-LO, via derived metabolites, might be an upregulator of osteoclasts recruitment and, consequently, of tooth movement.

## INTRODUCTION

Orthodontic tooth movement is achieved by transduction of a mechanical loading into a biological process, resulting in bone remodeling (Henneman *et al.*, 2008). This force application interferes with the equilibrium of dental complex and promotes an inflammatory response characterized by the release of several mediators such as cytokines, growth factors and arachidonic acid metabolites (Krishnan and Davidovitch, 2006; Davidovitch, 1988).

Arachidonic acid can be metabolized by two key enzymes: cyclooxygenase and 5-lipoxygenase (5-LO) (Funk, 2001). Cyclooxygenase is responsible for the release of prostaglandins and thromboxanes, while 5-LO initiates a cascade of enzymes for leukotriene (LT) production (Trainedes *et al.*, 1997; Werz and Steinhilber, 2005). Whereas prostaglandins have been recognized as important regulators of bone metabolism (Hikiji *et al.*, 2008), little is known about the role of LTs in bone remodeling (Trainedes *et al.*, 1997; Hikiji *et al.*, 2008).

LTs are mainly produced by inflammatory cells like leukocytes, macrophages and mast cells (Funk, 2001). In addition, previous studies have demonstrated that osteoclasts and osteoblasts are also able to synthesize these metabolites, specifically leukotriene B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) (Collet and Stewart, 1991; Paredes *et al.*, 2002). Thus, LTs seem to act in an autocrine/paracrine way, binding to receptor BLT1 expressed by osteoclasts (Hikiji *et al.*, 2008). *In vitro* assays reported that LTB<sub>4</sub> (Flynn *et al.*, 1999) and D<sub>4</sub> (Garcia *et al.*, 1996b) stimulates osteoclasts to form resorption lacunae and enhance TRAP activity. Also, LTB<sub>4</sub> stimulates osteoclast formation in a RANKL independent way in the presence of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in culture of CD14<sup>+</sup> monocyte fraction of peripheral blood

mononuclear cell (Jiang *et al.*, 2005). Likewise, *in vivo* local injection of LTB<sub>4</sub> in normal mice calvaria promotes bone resorption probably due to increased osteoclast formation (Garcia, 1996). Other reports affirmed that 5-LO knockout mice have augmented cortical bone thickness (Bonewald *et al.*, 1997).

Furthermore, LTs levels, specifically LTB<sub>4</sub>, are increased in bone resorptive inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis (Gursel *et al.*, 1997), periodontal disease (Pradeep *et al.*, 2007), posttraumatic osteomyelitis (Klosterhalfen *et al.*, 1996) and also in inflammatory diseases like Bowel disease (Cuzzocrea *et al.*, 2005). Therefore 5-lipoxygenase is a possible target for treatment of these diseases (Werz and Steinhilber, 2005) since its inhibition blocks not only LTB<sub>4</sub> but also other leukotrienes such as CysteinylLT (Werz and Steinhilber, 2006). Moreover, LTB<sub>4</sub> levels were significantly reduced after treatment with 5-LO inhibitor AA861 in an orthodontic tooth movement model in rats (Mohammed *et al.*, 1989) and after treatment with Zileuton, another 5-LO inhibitor common used in the treatment of asthma (Zweifel *et al.*, 2008).

The unraveling of the inflammatory process triggered by mechanical loading is crucial for improvements in orthodontic therapy. Thus the aim of this study was to investigate the role of 5-LO in osteoclast recruitment and activity during orthodontic tooth movement in a mice model.

## MATERIALS & METHODS

### Experimental Animals

Ten, ten-week-old, wild-type mice (WT) (C57BL6/J), 10 5-LO deficient mice (5-LO<sup>-/-</sup>), 10 vehicle (PBS) treated mice (Vehicle) and 10 Zileuton (a 5-LO inhibitor) treated mice (Zileuton) were used in this experiment. All animals were treated under the ethical regulations for animal experiments, defined by the Institutional Ethics Committee. Each animal's weight was recorded throughout the experimental period, and there was no significant loss of weight.

### Experimental Protocol

Induction of tooth movement was made as previously described (Andrade Jr. *et al.*, 2009). Briefly, mice were anesthetized i.p. with 0.2 mL of a solution containing xylazine (0.02 mg/mL) and ketamine (50 mg/mL). An orthodontic appliance consisting of a Ni-Ti 0.25 x 0.76 mm coil spring (Lancer Orthodontics, San Marcos, CA, USA) was bonded by a light cured resin (Transbond, Unitek/3M, Monrova, CA, USA) between maxillary right first molar and the incisors. The magnitude of force was calibrated by a tension gauge (Shimpo Instruments, Itasca, IL, USA) to exert a force of 35 g applied in the mesial direction. There was no reactivation during the experimental period. Animals were divided in 4 groups: WT, 5-LO<sup>-/-</sup>, vehicle and Zileuton (administration by gavage of 30 mg/kg/day during the entire experimental period). Vehicle used for this experiment was carboxymetil 0,5%. For histomorphometric analysis, the left side of maxilla was used as control. Mice were killed with an overdose of anesthetic at the following times: 6 and 12 days after

orthodontic appliance placement for histological measurements. For every set of experiments, 5 animals were used for each time-point.

### **Histopathological Analysis**

The right and the left maxillae halves, including first, second and third molars were dissected and fixed in 10% buffered formalin (pH 7.4). After fixation, each hemimaxillae were decalcified in 14% EDTA (pH 7.4) for 20 days and embedded in paraffin. Samples were cut into sagittal sections of 5  $\mu$ m thickness. Sections were stained for tartrate resistant acid phosphatase (TRAP; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), counterstained with hematoxylin, and used for histological examination. The first molar distal-buccal root, on its coronal two-thirds of the mesial periodontal site, was used for the osteoclasts counts, on 5 sections per animal. Osteoclasts were identified as TRAP-positive multinucleated cells sited on the bone surface. The slides were counted by two examiners, and the intraclass correlation coefficient showed average measures of 0.958, validating the measurement.

### **Measurement of Tooth Movement**

Image J software (National Institutes of Health) was used to quantify the amount of tooth movement, as previously described (Andrade Jr. *et al.*, 2009). Tooth movement was obtained through the difference between the distance of the cementum-enamel-junction's (CEJ's) of the first molar and the second molar (1st and 2nd molar distance) of the experimental side (right hemi-maxilla) in relation to the control side (left hemi-maxilla) of the same animal. Five vertical 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). Three measurements were conducted for each evaluation and the variability was below 5%.

### **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.

## RESULTS

### **The amount of tooth movement was reduced in 5-LO<sup>-/-</sup> and Zileuton mice**

The amount of tooth movement was significantly diminished in 5-LO<sup>-/-</sup> mice after 6 and 12 days of mechanical loading, when compared to WT (Fig. 1A). There was also a smaller amount of tooth movement in Zileuton groups, comparing to vehicle in day 12 (Fig. 1B). It also was observed the presence of hyalinized areas after 12 days of applied force only in 5-LO<sup>-/-</sup> mice.

### **TRAP activity and osteoclast numbers were decreased in 5-LO<sup>-/-</sup> and Zileuton animals**

In the control mice, TRAP activity was found on the distal bone of the distal buccal root, and no activity was observed in the mesial region of the periodontium.

On day 6, TRAP activity appeared to increase on the mesial periodontium of the distal buccal root, the pressure side, and to decrease on the distal alveolar bone of this root in WT mice. In 5-LO<sup>-/-</sup> (Fig. 3A) and Zileuton-treated (Fig 3B) groups, TRAP activity appeared to increase in mesial bone of distal buccal root, but with smaller activity than in WT mice and vehicle-treated mice, respectively. On day 12, TRAP activity appeared to increase more extensively in WT mice (Fig. 3A) and vehicle-treated mice (Fig. 3B), which presented a greater bone resorption area than 5-LO<sup>-/-</sup> (Fig 3A) and Zileuton-treated mice (Fig 3B). Overall, there was a good correlation between the intensity of TRAP activity, as evaluated qualitatively, and the number of TRAP-positive osteoclasts. The number of TRAP-positive osteoclasts was

diminished in 5-LO<sup>-/-</sup> mice (Fig. 3A) and Zileuton-treated mice (Fig. 3B), after 6 and 12 days of mechanical loading, when compared to WT mice (Fig 3A) and vehicle-treated mice (Fig. 3B), respectively.

## DISCUSSION

The recruitment of osteoclasts to sites of compression is essential for orthodontic tooth movement. Several studies have attempted to elucidate the role of inflammatory mediators on the mechanisms controlling the appearance of osteoclasts at orthodontic compression sites (Brezniak and Wasserstein, 2002; Kohno *et al.*, 2003; Jager *et al.*, 2005).

Previous *in vitro* studies showed that LTs might be associated with osteoclast formation and activation (Garcia, 1996; Jiang *et al.*, 2005). The present study observed a diminished amount of tooth movement in 5-LO<sup>-/-</sup> mice, comparing to WT. Parallely, there was a decreased amount of TRAP-positive osteoclasts in 5-LO<sup>-/-</sup> mice. These findings suggest that 5-LO, via derived metabolites, plays a role in osteoclast recruitment and bone resorption associated with orthodontic tooth movement. Our results are in agreement with preceding studies that demonstrated an augmented bone thickness in 5-LO<sup>-/-</sup> mice (Bonewald, *et al.*, 1997) and a smaller bone lost after ovariectomy (Bonewald, *et al.*, 1997).

The reduced number of TRAP positive cells might be partially explained by the absence of 5-LO derived metabolites, such as LTB<sub>4</sub> and Cysteinyl LT, known to stimulate osteoclast formation and activity (Garcia, 1996; Jiang *et al.*, 2005; Hikiji, *et al.*, 2009). It might also be related to the regulatory role of leukotriene in cytokine production (DiMeo *et al.*, 2007). Interleukin-10 is up-regulated in 5-LO<sup>-/-</sup> mice, while TNF- $\alpha$  is down-regulated in a model of LPS-induced inflammation (DiMeo *et al.*, 2007). Previous studies reported that TNF- $\alpha$  plays a role in osteoclast recruitment (Andrade *et al.*, 2007) and that IL-10 negatively regulates bone resorption in a mouse OTM model (Andrade *et al.*, 2009). Taken all together, the increased quantity of IL-10

and the reduced level of TNF- $\alpha$  might, in some extent, lead to a decline in bone resorption in 5-LO<sup>-/-</sup> animals.

We also found hyalinized areas only in 5-LO<sup>-/-</sup> mice after 12 days of applied force. It is possible that the lack of LTs might have inhibited the collagenase synthesis (Nolan and Pickett, 1985). In addition, it is known that LTs participate in regulation of granulocyte-macrophage progenitors, cells responsible for resorption of hyalinized tissue (Pasquale and Chikkappa, 1993). In agreement, macrophage counting was decreased in a model of LPS induced inflammation in 5-LO<sup>-/-</sup> mice (DiMeo *et al.*, 2007). Further studies are necessary to better understand the role of 5-LO in removing hyalinized areas during OTM.

To gain more insight into the role of 5-LO metabolites in osteoclast recruitment on OTM, and to confirm the results of 5-LO<sup>-/-</sup> animals, we next investigated the effects of 5-LO inhibition by Zileuton, a drug that specifically targets 5-LO blocking CysLT and LTB<sub>4</sub> and is commonly used in asthma treatment (Werz and Steinhilber, 2005). As expected, it was observed that Zileuton mice presented less TRAP activity, significantly fewer osteoclasts and diminished tooth movement after 12 days of mechanical loading than vehicle mice. Therefore, leukotrienes inhibitor drugs seem to diminish osteoclast recruitment. Our results are in agreement with previous studies that evaluated the effects of different 5-LO inhibitors on bone remodeling models. Rats treated with 5-LO inhibitor BWA4C showed a decreased quantity of mononucleated TRAP-positive cells and differentiated osteoclasts (Franchi-Miller and Saffar, 1993). In a model of aseptic bone loss, 5-LO inhibitor ZM230487 was able to reduce osteoclast resorptive activity and the number of osteoclasts and macrophages (Anderson *et al.*, 2001). Accordingly, in an OTM

model, rats treated with 5-LO inhibitor AA861 exhibit less tooth movement, although the number of TRAP positive cells was not evaluated (Mohammed *et al.*, 1989).

In conclusion, our study suggests that 5-LO derived metabolites might be up regulators of osteoclasts recruitment and, consequently, of tooth movement. Also, it points out the possible interference of therapeutic drugs, such as Zileuton, on osteoclasts recruitment and, consequently, the OTM.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We 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

- Andrade Jr I, Silva TA, Silva GA, Teixeira AL, Teixeira MM (2007). The role of tumor necrosis factor receptor type 1 in orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 86:1089-1094.
- Andrade Jr I, Taddei SRA, Garlet GP, Garlet TP, Teixeira AL, Silva TA *et al.* (2009). CCR5 down-regulates osteoclast function in orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 88:1037-1041.
- Anderson GI, MacQuarrie R, Osinga C, Chen YF, Langman M, Gilbert R (2001). Inhibition of leukotriene function can modulate particulate-induced changes in bone cell differentiation and activity. *J Biomed Mater Res* 58:406-414.
- Bonewald LF, Flynn M, Qiao M, Dallas MR, Mundy GR, Boyce BF (1997). Mice lacking 5-LO have increased bone thickness. *Adv Exp Med Biol* 433:299-302.
- Bonewald LF, Rosser J, Dallas M, Storey B, Mundy GR, Boyce BF Mice which lack the functional gene for 5-lipoxygenase lose significantly less bone after ovariectomy (1997). *Journal of bone and mineral research* 12:112.
- Brezniak N, Wasserstein A (2002). Orthodontically induced inflammatory root resorption. Part I: The basic science aspects. *Angle Orthod* 72:175-179.
- Collet AR, Stewart AG (1991). Eicosanoids: Physiology update and orthodontic implications. *Aust Orthod J* 12:116-123.
- Cuzzocrea S, Rossi A, Mazzon E, Di Paola R, Genovese T, Muia C, Caputi AP, Sautebin L (2005). 5-Lipoxygenase modulates colitis through the regulation of

adhesion molecule expression and neutrophil migration. *Laboratory Investigation* 85:808–822.

Davidovitch Z, Nicolay OF, Ngan PW, Shanfeld JL (1988). Neurotransmitters, cytokines and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dental clinics of North America* 32:411-435.

DiMeo D, Tian J, Zhang J, Narushima S, Berg DJ (2007). Increased interleukin-10 production and Th2 skewing in the absence of 5-lipoxygenase. *Immunology* 123: 250-262.

Flynn MA, Qiao M, Garcia C, Dallas M, Bonewald LF (1999). Avian osteoclast cells are stimulated to resorb calcified matrices by and possess receptors for leukotriene B4. *Calcif Tissue Int* 64:154-159.

Franchi-Miller C, Saffar L (1993). The 5-lipoxygenase inhibitor BWA4C impairs osteoclastic resorption in synchronized model of bone remodeling. *Bone* 17:185-191.

Funk, CD (2001). Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Nature* 294:1871-1875.

Garcia C, Boyce B, Gilles J, Dallas M, Qiao M, Mundy GR, Bonewald LF (1996). Leukotriene B4 stimulates osteoclastic bone resorption both *in vivo* and *in vitro*. *J Bone Miner Res* 11:1619-1627.

Garcia C, Qiao M, Chen D, Kirchen M, Gallwitz W, Mundy GR, Bonewald LF (1996). Effects of synthetic peptido-leukotrienes on bone resorption *In vitro*. *J bone miner res* 11:527-529.

- Gursel T, Firat S, Ercan Z (1997). Increased serum leukotriene B4 level in the active stage of rheumatoid arthritis in children. *Prostaglandins, Leukot and Essent Fatty Acids* 56:205-207.
- Henneman S, Von der Hoff J, Maltha J (2008). Mechanobiology of tooth movement. *Eur J Orthod* 30:299-306.
- Hikiji H, Takato T, Shimizo T, Ishii S (2008). The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. *Prog Lipid Res* 47:107-126.
- Hikiji H, Ishiib S, Yokomizo T, Takato T, Shimizu T (2009). A distinctive role of the leukotriene B4 receptor BLT1 in osteoclastic activity during bone loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:21294-21299.
- Jäger A, Zhang D, Kawarizadeh A, Tolba R, Braumann B, Lossdörfer S, Götz W (2005). Soluble cytokine receptor treatment in experimental orthodontic tooth movement in the rat. *Eur J Orthod*.27:1-11.
- Jiang J, Lv H, Lin J, Jiang D, Chen Z (2005). LTB4 can directly stimulate human osteoclast formation from PBMC independent of RANKL. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 33:391–403.
- Klosterhalfen B, Peters K M, Tons C, Hauptmann S, Klein CL, Kirkpatrick CJ (1996). Local and systemic inflammatory mediator release in patients with acute and chronic posttraumatic osteomyelitis. *J Trauma* 40:372-378.

- Kohno S, Kaku M, Tsutsui K, Motokawa M, Ohtani J, Tanne K, *et al.*(2003). Expression of vascular endothelial growth factor and the effects on bone remodeling during experimental tooth movement. *J Dent Res* 82:177-182.
- Krishnan V, Davidovitch Z (2006). Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 129:1-32.
- Mohammed AH, Ttakis DN, Dziak R (1989). Leukotrienes in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 95:231-237.
- Paredes Y, Massicotte F, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Laufer S, Lajeunesse D (2002). Effects of cyclooxygenase and/or 5-lipoxygenase inhibition. *Arthritis and rheumatism* 46:1804–1812.
- Pasquale D, Chikkappa G (1993). Lipoxygenase products regulate proliferation of Granulocyte-Macrophage progenitors. *Exp Hematol* 21:1361-1365.
- Pradeep R, Manjunath S, Swati P, Shikha C, Sujatha P (2007). Gingival crevicular fluid levels of leukotriene B4 in periodontal health and disease. *J Periodonto* 78:2325-2330.
- Traianedes K, Dallas MR, Garrett IR, Mundy GR, Bonewald LF (1998). 5-Lipoxygenase metabolites inhibit bone formation in vitro. *Endocrinology* 139:3178-3184.
- Zweifel BS, Hardy MM, Anderson GD, Dufield DR, Pufahl RA, Masferrer JL (2008). A rat air pouch model for evaluating the efficacy and selectivity of 5-lipoxygenase inhibitors. *Eur J Pharmacol* 584:166-174.

Werz O, Steinhilber D (2005). Development of 5-lipoxygenase inhibitors—lessons from cellular enzyme regulation. *Biochemical Pharmacology* 70:327–333.

Werz O, Steinhilber D (2006). Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. *Pharmacology and Therapeutics* 112:701–718.

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1.

(A) Amount of orthodontic tooth movement in 5-LO<sup>-/-</sup> and WT mice, after 6 and twelve days. (B) Amount of tooth movement in Zileuton and vehicle after 6 and 12 days. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. #P < 0.05 comparing WT with 5-LO<sup>-/-</sup> and Zileuton with Vehicle experimental groups. One-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test. Bar = 100  $\mu$ m.

### Figure 2.

Histological changes related to orthodontic tooth movement. Sections of the periodontium around the disto-buccal root of the first molar were stained with TRAP. (A) Control, (B) WT mice (C) 5-LO<sup>-/-</sup> (D) Zileuton-treated mice, all after 12 days. (E) Amplified view 40x of the identified area in A (E), B (F), C (G), D (H). Small arrows identify TRAP positive cells. MB, mesial alveolar bone; DB distal alveolar bone; PL, periodontal ligament; R, root; H, hyalinized area. Large arrows indicate the direction of tooth movement. Bar = 100  $\mu$ m

### Figure 3

Number of TRAP positive osteoclasts in WT and 5-LO<sup>-/-</sup> groups and (B) in Vehicle and Zileuton groups after 6 and 12 days. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. \*P < 0.05 comparing the control group to the respective experimental group. #P < 0.05 comparing WT with 5-LO<sup>-/-</sup> and Zileuton with Vehicle experimental groups. One-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test. Bar = 100  $\mu$ m.

Figure 1

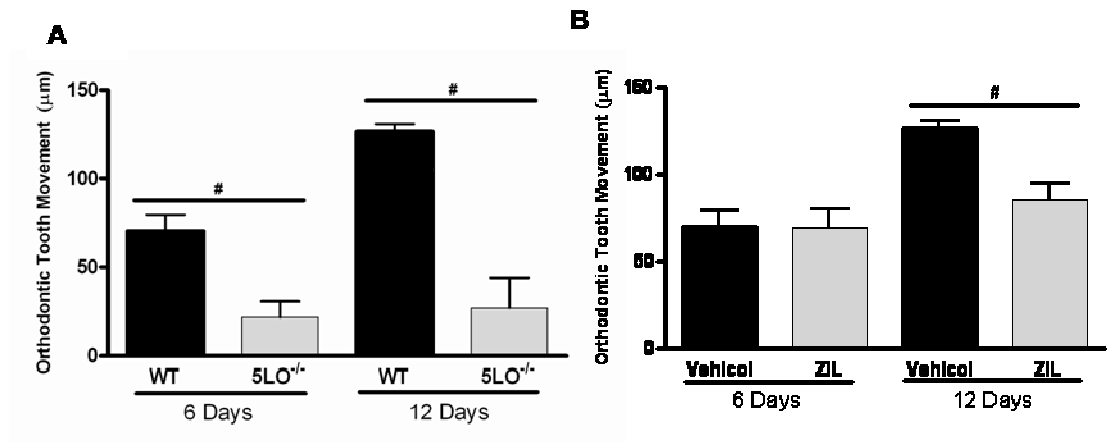


Figure 2

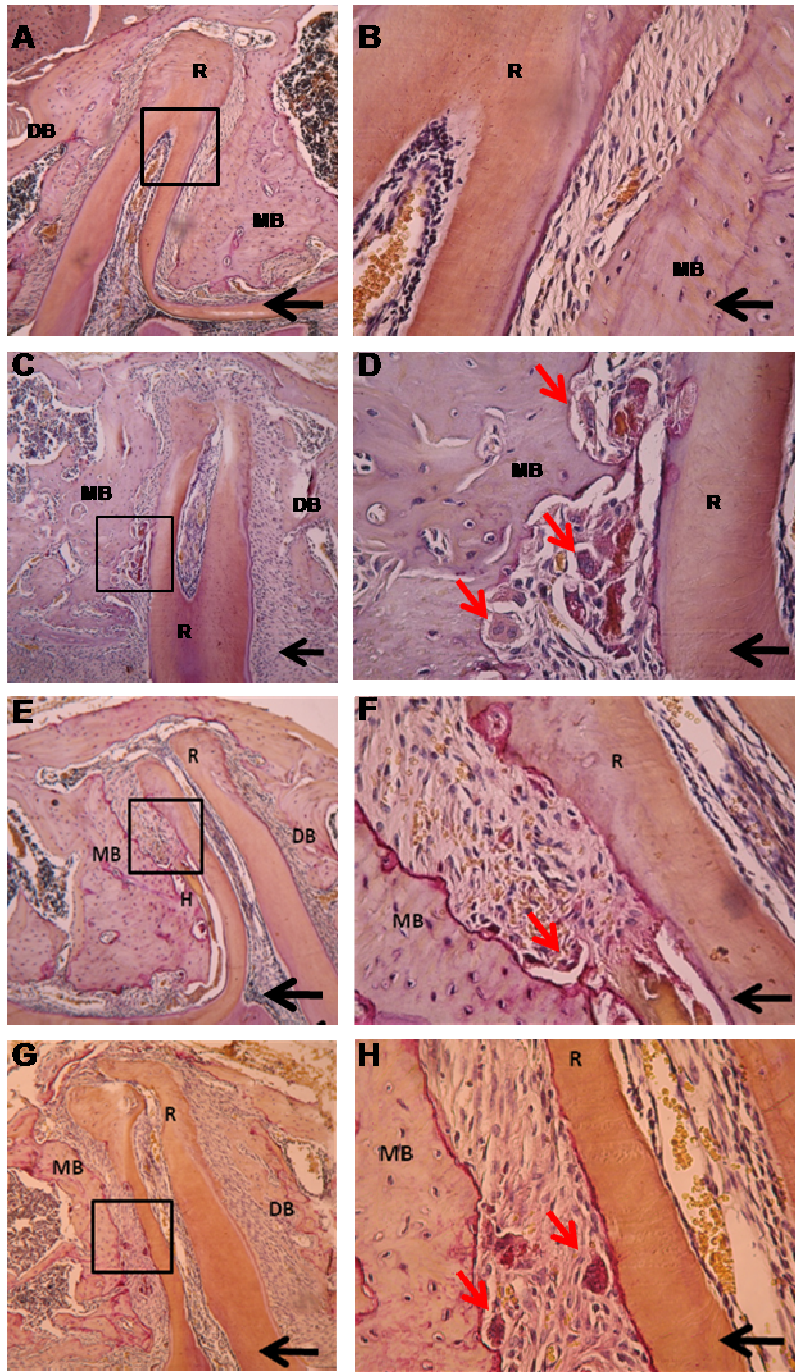


Figure 3

