

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS
Departamento de Odontologia

**EFEITO DA DIABETES MELLITUS NA MOVIMENTAÇÃO
DENTÁRIA ORTODÔNTICA**

Sarah Marina Guerra Braga

Belo Horizonte
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Sarah Marina Guerra Braga

**EFEITO DA DIABETES MELLITUS NA MOVIMENTAÇÃO
DENTÁRIA ORTODÔNTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Ortodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ildeu Andrade Júnior
Co-orientadores: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira
Prof^a. Dra. Tarcília Aparecida da Silva

Belo Horizonte

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

B813e Braga, Sarah Marina Guerra
Efeito da diabetes mellitus na movimentação dentária ortodôntica / Sarah Marina Guerra Braga. Belo Horizonte, 2009.
63 f. : il.

Orientador: Ildeu Andrade Júnior
Co-Orientadores: Mauro Martins Teixeira; Tarcília Aparecida da Silva
Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

1. Diabetes mellitus. 2. Movimentação dentária. 3. Ortodontia. 4. Remodelação óssea. 5. Citocinas. I. Andrade Júnior, Ildeu. II. Teixeira, Mauro Martins. III. Silva, Tarcília Aparecida da. IV. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU: 616.314-089.23

APRESENTAÇÃO

Este trabalho se refere à dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Odontologia, com área de concentração em Ortodontia, da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC - Minas) e representa requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Os questionamentos que culminaram com a elaboração desta tese, bem como os dados para a sua elaboração, surgiram com o desenvolvimento de um modelo em camundongos, que visa avaliar os mecanismos celulares e moleculares da movimentação dentária ortodôntica. Este projeto foi desenvolvido pelo meu orientador, professor Ildeu Andrade Júnior, no laboratório de Imunofarmacologia – Departamento de Bioquímica, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) durante seu processo de doutoramento.

Nosso estudo foi iniciado em setembro de 2007, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA – UFMG) com o protocolo 135/08 sob o título “Efeito da diabetes mellitus na movimentação dentária ortodôntica”. A proposta do nosso trabalho foi avaliar as conseqüências biológicas da diabetes mellitus no recrutamento de osteoclastos induzido pela aplicação de forças ortodônticas em animais diabéticos.

De acordo com as opções de formato contempladas pelo regulamento do Programa, essa tese se baseia em um artigo produzido durante o mestrado, intitulado:

“Effect of diabetes mellitus on orthodontic tooth movement in a mice model.”

O artigo visa elucidar as alterações celulares e moleculares ocasionadas pela diabetes na remodelação óssea necessária para a movimentação dentária ortodôntica.

O artigo será enviado para a publicação na revista *Journal of Dental Research*.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar e guiar meus caminhos.

Ao Prof. Dr. Ildeu Andrade Jr. pela orientação, paciência e dedicação.

À Prof^a. Dra. Tarcília Aparecida Silva, sem a qual não teria sido possível realizar este trabalho. Agradeço a disponibilidade, paciência e todos os ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira pelo acolhimento em seu laboratório, pela oportunidade e confiança em mim depositada para gerarmos um trabalho em conjunto, e pelo exemplo de pesquisador.

Aos Prof. Dr. Gustavo Garlet e Prof^a. Dra. Milene Rachid pela grande colaboração para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Imunofarmacologia por todo o auxílio, em especial à Angélica, Celso, Davi, José Felipe, Silvana e Val.

A todos os professores do mestrado em Ortodontia, por não pouparem esforços para nossa formação, pelos ensinamentos e pela amizade desenvolvida ao longo dos últimos 29 meses de intensa convivência. Ao Prof. Júlio Brant pelo incentivo a escolher este caminho, e aos Profs. José Maurício Vieira e Tarcísio Junqueira por me abrirem as portas de seus consultórios. Ao Prof. Dr. Dauro Douglas Oliveira, a quem almejo espelhar-me como profissional. Ao Prof. Hélio Brito pelo acolhimento e sabedoria.

Aos amigos do curso de Mestrado Ana Paula Ferreira, Bruno Fonseca Pereira, Bruno Frazão Gribel, Maria Rita Danelon, Paula Melo e Rafael Araugio pela amizade e convivência. Agradeço em especial ao meu amigo Rafael por amenizar as dificuldades do dia a dia com a sua presença.

A todos os funcionários da PUC - Minas, pela convivência diária e prazerosa, em especial Diego, Alcides, Lorraine, Vivian, Andreza, Toninha e Mariângela.

Aos meus amigos, que sempre me aconselharam e ouviram com carinho, entendendo meus momentos de ausência.

Ao meu avô Assis, por existir.

Ao meu Padrinho, por me mostrar com seu exemplo a importância do estudo. À minha madrinha Regina, pela confiança e ajuda em todos os passos

dados até hoje na nossa profissão. À minha madrinha Mariângela pelo constante bom humor e alegria de viver.

Aos meus pais, meus exemplos de vida, garra e força, que não mediram esforços para minha formação. Obrigada por tanto amor e por confiarem em mim. Aos meus irmãos, Felipe e Lucas, pelo amor e amizade.

Ao meu amor, Thiago, por estar sempre presente com palavras de incentivo e força em todos os meus momentos de angústia e preocupações. Não imagino esta vitória sem você.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e da minha formação como profissional e como ser humano.

RESUMO

A movimentação dentária ortodôntica (MDO) é alcançada pela remodelação do osso alveolar em resposta às forças mecânicas. A diabetes tipo 1 altera a remodelação óssea, o que sugere que esta doença também afete a MDO. O presente estudo investigou as mudanças nos mecanismos celulares e moleculares relacionados ao recrutamento e atividade osteoclástica durante a MDO em camundongos diabéticos. Foram colocados dispositivos ortodônticos em camundongos C57BL6/J normoglicêmicos (NG) e diabéticos (DB) por indução através de estreptozotocina. Foi realizada análise histomorfométrica e bioquímica através do Real Time PCR após 6 e 12; e 12 horas e 72 horas, respectivamente. Os resultados mostraram que os DB apresentaram maior MDO e maior número de células TRAP-positivas após 12 dias. Entretanto, foram observados níveis maiores de RANKL, CCL2, CCL5 e TNF- α e menores de RUNX2, COL-1 e ALP após 72 horas nos DB. Analisados em conjunto, os resultados sugerem que a diabetes aumenta a migração e atividade dos osteoclastos, e diminui a diferenciação dos osteoblastos, levando a uma maior MDO.

Palavras-chave: diabetes- movimentação dentária ortodôntica – remodelação óssea – citocinas.

ABSTRACT

Orthodontic tooth movement (OTM) is achieved by remodeling of alveolar bone in response to mechanical loading (ML). Type 1 diabetes alters bone remodeling, suggesting that this disease might affect OTM. This study investigated the changes in the cellular and molecular mechanisms related to osteoclast recruitment and activity during OTM in diabetic (DB) mice. An orthodontic appliance was placed in normoglycemic (NG) and made DB by streptozotocin C57BL6/J mice. Histomorphometric analysis and Real Time PCR of periodontium was performed after 6 and 12 days, and 12 hours and 3 days of ML, respectively. The results showed that DB exhibited greater OTM and increased number of TRAP-positive osteoclasts after 12 days. Meanwhile, higher levels of RANKL, CCL2, CCL5 and TNF- α , and lower levels of RUNX2, COL-1 and ALP was observed after 3 days in DB. Altogether, the data suggested that diabetes upregulated osteoclast migration and activity and downregulated osteoblast differentiation, leading to a greater OTM.

Key words: diabetes- orthodontic tooth movement- bone remodeling- cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A) Anestesia peritoneal B) Mesa cirúrgica utilizada neste trabalho.....	24
Figura 2: A) Estereomicroscópio para visualização do campo microcirúrgico. B) Fibra óptica para iluminação do campo microcirúrgico.....	24
Figura 3: Camundongo posicionado na mesa cirúrgica.	24
Figura 4: Movimento dentário ortodôntico em camundongo utilizando uma mola Ni-Ti aberta.	25
Figura 5: Desenho esquemático do preparo das peças para processamento histológico.	28
Figura 6: Fotomicrografias de secções do pâncreas de camundongos não tratados (A) e tratados com estreptozotocina.....	30
Figura 7: Avaliação morfométrica do movimento dentário após a aplicação de força ortodôntica.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

- CEJ – Cementum-enamel-junction's / Junção amelo-cementária
- DB – Diabetic / Diabético
- DP – Ducto Pancreático
- Fig. – Figure / Figura
- LP – Periodontal ligament / ligamento periodontal
- MB – Mesial bone / osso mesial
- MDO – Movimentação dentária ortodôntica
- NG – Normoglicemic / normoglicêmico
- Ni-Ti – Níquel Titânio
- OB – Osteoblast / osteoblasto
- OC – Osteoclast / osteoclasto
- Rpm – Rotações por minuto
- STZ – Streptozotocin / Estreptozotocina
- VS – Vaso sanguíneo

LISTA DE SIGLAS

ALP – Fosfatase Alcalina

COL-1 – Colágeno tipo 1

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

MMP – Metaloproteinase da matriz

NIH – National Institutes of Health / Instituto Nacional de Saúde

OCN – Osteocalcina

OMS – Organização Mundial da Saúde

RANK - Receptor activator of nuclear factor / Ativador do receptor nuclear

kappa B

RANKL - Receptor activator of nuclear factor ligand / Ligante do ativador do receptor nuclear kappa B

RUNX2 – Runt-related transcription factor 2 / Fator de transcrição relacionado ao runt tipo 2

TRAP – Fosfatase ácida resistente ao tartarato

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

WHO – World Health Organization / Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1. Diabetes Mellitus: dados relevantes.....	15
2.2. Modelos em Animais	16
2.3. Diabetes quimicamente induzida em animais	16
2.4. Biologia do Movimento Dentário	17
3. OBJETIVOS.....	21
3.1. Objetivo Geral	21
3.2. Objetivos Específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1. Delineamento Experimental	22
4.2. Métodos	22
4.2.1. Protocolo da Indução da Diabetes Mellitus por Estreptozotocina	22
4.2.2. Protocolo Experimental.....	23
4.2.3. Análise quantitativa dos níveis de Citocinas através do Real- Time-PCR	26
4.2.4. Processamento histológico e análise microscópica	27
4.2.5. Documentação Fotográfica dos Pâncreas	29
4.2.6. Análise Microscópica das Lesões Pancreáticas	29
4.2.7. Contagem do Número de Células TRAP- positivas	30
4.2.8. Mensuração da Movimentação Dentária	31
4.2.9. Análise Estatística.....	31
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
6. ARTIGO GERADO.....	37
7. ANEXOS.....	62

1. INTRODUÇÃO

A diabetes mellitus é uma desordem metabólica de etiologia múltipla, caracterizada por deficiência na secreção e/ou ação da insulina, que leva à hiperglicemia crônica, distúrbios no metabolismo do carboidrato, da gordura e da proteína (ALBERT and ZIMET for WHO, 1998). A incapacidade de absorção ou a falta da insulina pode afetar o remodelamento ósseo, resultando na diminuição da densidade mineral óssea (SCHWARTZ, 2003).

De fato, os pacientes diabéticos mostram múltiplas alterações ósseas, tais como osteopenia, osteoporose (RÄKEL *et al.*, 2008), atraso na cicatrização de fraturas (DINIZ *et al.*, 2008) e aumento na incidência de doenças periodontais (MISHIMA *et al.*, 2002).

Vários mecanismos já foram citados como possíveis explicações para a alteração da remodelação óssea na diabetes, dentre eles a diminuição da formação óssea por causa da atividade osteoblástica diminuída (VERHAEGHE *et al.*, 1997), ou ainda aumento da apoptose de células osteoblásticas (HE *et al.*, 2004). Essas alterações podem ser decorrentes de um aumento na formação de produtos da glicólise (ALIKHANI *et al.*, 2006), além de aumentar o nível de expressão de citocinas em respostas inflamatórias (LIU *et al.*, 2006; GRAVES *et al.* 2005). Outro fator que pode estar relacionado à alteração do metabolismo ósseo pode ser o aumento da atividade de reabsorção (HIE *et al.*, 2007). Entretanto, ainda é controverso na literatura se a função e o recrutamento osteoclásticos são alterados positivamente ou negativamente na diabetes (SUZUKI, 2002).

A MDO é alcançada pelo remodelamento do osso alveolar em resposta a um estímulo mecânico (KRISHNAN e DAVIDOVITCH, 2006; MASELLA e MEISTER, 2006). Isso se deve à reabsorção óssea pelos osteoclastos no lado de compressão e à nova formação óssea pelos osteoblastos no lado de tensão (KRISHNAN e DAVIDOVITCH, 2006; MASELLA e MEISTER, 2006).

A força ortodôntica aplicada ao dente provoca uma resposta inflamatória do tecido periodontal, que varia conforme sua intensidade, magnitude e duração. A liberação de mediadores inflamatórios no tecido periodontal dispara o processo biológico de reabsorção do osso alveolar, causando mudanças micro e macroscópicas. A remodelação óssea durante a MDO está intimamente relacionada

à atividade de células osteogênicas, incluindo osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. É essencial que haja aplicação de uma carga biomecânica adequada para indução da remodelação óssea, minimizando possíveis danos aos tecidos dentários e periodontais (KOYAMA *et al.*, 2008).

Uma alteração no estado metabólico ósseo pode resultar em taxas de MDO alteradas (VERNA *et al.*, 2000). Nesse contexto, como a diabetes afeta a remodelação óssea, supõe-se que também afete a MDO. Pouco se sabe ainda sobre o assunto, o que justifica a necessidade do presente estudo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Diabetes Mellitus: dados relevantes

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a diabetes acomete cerca de 171 milhões de indivíduos e estima-se que em 2030 este número aumente para 366 milhões, devido ao crescimento populacional, ao envelhecimento, à urbanização, ao sedentarismo e ao aumento da obesidade. O Brasil atualmente ocupa o oitavo lugar no *ranking* dos países com maior número de indivíduos diabéticos, com 4,6 milhões (WILD *et al.*, 2004).

A hiperglicemia observada na *Diabetes Mellitus* ocorre como resultado de um transporte inadequado de glicose do plasma para dentro das células dos tecidos (GRAVES *et al.*, 2006).

Segundo a OMS (2006), a *Diabetes Mellitus* em humanos é caracterizada pela hiperglicemia recorrente ou persistente, e é diagnosticada em uma das três situações:

1. Quando o nível plasmático de glicose em jejum estiver maior ou igual a 99 mg/dL (7,0 mmol/l);
2. Quando o nível plasmático de glicose estiver maior ou igual a 200 mg/dL ou 11,1 mmol/l duas horas após uma dose de 75g de glicose oral como em um teste de tolerância à glicose em duas ocasiões;
3. Quando o nível plasmático de glicose aleatória estiver a partir de 200 mg/dL ou 11,1 mmol/l associados a sinais e sintomas típicos de diabetes.

Sabe-se que a *Diabetes Mellitus* é coincidente com osteopenia em humanos e animais experimentais (BOTOLIN e MCCABE, 2007; MISHIMA *et al.*, 2002). Apesar disso, ainda não se conhece o mecanismo envolvendo o efeito da *Diabetes Mellitus* na remodelação, formação e reabsorção do osso alveolar (MISHIMA *et al.*, 2002). A osteopenia e a osteoporose em adultos manifestam-se através de baixas taxas de formação e altas taxas de reabsorção óssea (ROBERTS *et al.*, 2004). A osteoporose é uma complicação em potencial para esses indivíduos (ROBERTS *et al.*, 2004; BOTOLIN e MCCABE, 2007).

Além disso, a diabetes leva a grandes perdas ósseas periodontais e aumenta o risco de perdas dentárias (GRAVES *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2006; ROBERTS *et al.*, 2004; TAKAI *et al.*, 1986; MISHIMA *et al.*, 2002).

2.2. Modelos em Animais

A MDO em camundongos é um bom modelo *in vivo* para investigar as modificações ósseas induzidas por carga biomecânica (YOSHIMATSU *et al.*, 2006). Os molares dos roedores, como ratos e camundongos, em condições fisiológicas, têm uma migração distal e a parede alveolar envolvendo o dente mostra um padrão único de remodelação contínua. O deslize distal dos molares promove uma deposição óssea regular e constante, sem reabsorção precedente na parede alveolar mesial, e uma rápida remodelação do osso alveolar ocorre no lado distal (MISHIMA *et al.*, 2002).

Apesar de não haver um modelo animal que preencha completamente a dinâmica das doenças humanas, existe a vantagem de se eliminar variáveis como etnia, dieta, gênero, idade e interações medicamentosas, com estudos potencialmente influenciáveis clinicamente. Além disso, o estudo em animais possibilita fácil aquisição de tecidos, o que nem sempre é possível em pesquisas clínicas. (THOMPSON, 2008). Ademais, os mecanismos biológicos envolvidos na remodelação óssea em animais são semelhantes aos em humanos.

2.3. Diabetes quimicamente induzida em animais

Uma enorme variedade de modelos animais já foi desenvolvida para examinar os mecanismos associados às complicações da diabetes (BOTOLIN e MCCABE, 2007). A forma mais conveniente de indução química de diabetes experimental em ratos é através da destruição das células- β pancreáticas (SZKUDELSKI, 2001). Atualmente a substância mais utilizada é a estreptozotocina (THOMPSON, 2008).

A estreptozotocina é uma nitrosamida sintetizada por *Streptomyces achromogenes*, e faz parte de um grupo de drogas alquilantes, que agem diretamente na metilação do DNA (BOLZÁN e BIANCHI, 2002). A ação da estreptozotocina nas células- β é acompanhada de alterações nas concentrações de insulina e glicose no sangue. Duas horas após a injeção pode ser observada hiperglicemia com concomitante queda de insulina. Em média 6 horas depois se observa hipoglicemia e altos níveis de insulina. Finalmente, a hiperglicemia se desenvolve e a insulina diminui. Essas mudanças de concentração de glicose e insulina no sangue refletem anormalidades no funcionamento das células- β . A estreptozotocina diminui a oxidação da glicose, e diminui a biosíntese e secreção de insulina. Foi observado que a estreptozotocina inicialmente anula a resposta das células- β à glicose. Há um retorno temporário da resposta que é seguido de danos permanentes e perda dessas células (SZUDELSKI, 2001).

O modelo com estreptozotocina permite precisão no diagnóstico e indução da diabetes em camundongos, e exhibe alguns parâmetros associados à diabetes em humanos. A diabetes induzida por múltiplas doses de injeção de estreptozotocina é um modelo válido para entender os processos patológicos agudos e crônicos em resposta à diabetes e seus mecanismos no tecido ósseo (BOTOLIN e MCCABE, 2007).

2.4. Biologia do Movimento Dentário

A movimentação dentária pela aplicação de forças ortodônticas é o resultado de uma resposta biológica à interferência no equilíbrio fisiológico do complexo dentofacial por aplicação de uma força externa (KRISHNAN e DAVIDOVITCH, 2006).

Inicialmente ocorre a liberação de mediadores químicos em resposta ao estímulo mecânico, que deforma os tecidos paradentais, desencadeando o processo biológico de reabsorção óssea (KOYAMA *et al.*, 2008). A transdução direta da força mecânica ortodôntica para a célula estressada é realizada através de mensageiros contidos no citoplasma (KRISHNAN e DAVIDOVITCH, 2006), levando à ativação de genes específicos e, conseqüente produção e liberação de várias citocinas,

moléculas de sinalização bioquímicas locais e neuropeptídios para o meio extracelular (DAVIDOVITCH, 1991). Essas substâncias interagem direta ou indiretamente com a população de células parodontais nativas, promovendo adesão dos leucócitos circulantes às células endoteliais ativadas, dilatação dos vasos sanguíneos e conseqüente extravasamento do plasma e migração, por diapedese, destas células para o compartimento extravascular. Essa fase dura de 24 horas a 2 dias em humanos (KRISHNAN e DAVIDOVITCH, 2006).

À medida que a inflamação aguda diminui, ela é substituída por um processo crônico predominantemente proliferativo. Desta forma, os leucócitos, que migraram para o sítio de remodelação na fase inicial da movimentação dentária também sintetizam e liberam moléculas de sinalização (citocinas, fatores de crescimento, fator de estimulação de colônia e metabólicos do ácido araquidônico) (DAVIDOVITCH, 1991; KRISHNAN e DAVIDOVITCH, 2006). As interações dos vários tipos de células parodontais com estas substâncias desencadeiam o recrutamento de células fagocíticas, tais como macrófagos e osteoclastos das áreas sadias do ligamento periodontal e das cavidades da medula óssea alveolar adjacentes (RODY *et al.*, 2001). Estas células removem o tecido acelular da área do ligamento periodontal comprimido e osso alveolar adjacente, permitindo posteriormente que o dente continue o seu movimento (KRISHNAN & DAVIDOVITCH, 2006).

O recrutamento dos osteoclastos e osteoblastos (FULLER *et al.*, 1995; YU *et al.*, 2004; YANO *et al.*, 2005), suas atividades, diferenciações e sobrevivência (YU *et al.*, 2004; YANO *et al.*, 2005) são regulados por citocinas e quimiocinas endógenas, tais como TNF- α , IL-1, CCL2, CCL3, CCL5 (YU *et al.*, 2004; YANO *et al.*, 2005). Estudos recentes mostraram aumento dos níveis de CCL2, CCL5, TNF- α em modelos de movimentação ortodôntica em animais (ALHASHIMI *et al.*, 1999; ANDRADE JR. *et al.*, 2007) e em humanos (MAEDA *et al.*, 2007; GARLET *et al.*, 2008).

O TNF- α desempenha um importante papel na movimentação dentária ortodôntica, por modular a reabsorção óssea. Estudos em humanos mostraram que o nível de TNF- α é elevado tanto no sulco gengival (LOWNEY *et al.*, 1995) quanto no ligamento periodontal, no lado de compressão do dente movimentado após aplicação de força mecânica ortodôntica (GARLET *et al.*, 2007). Em estudos similares com modelos animais, o TNF- α foi também fortemente expresso durante a

movimentação ortodôntica em estágios tardios (entre 10 e 12 dias) (YOSHIMATSU *et al.* 2006; ANDRADE JR. *et al.*, 2007a).

O CCL2 é um dos responsáveis pela quimioatração de células mononucleares fagocitárias para locais de reabsorção óssea (WISE *et al.*, 1999). Andrade Jr. *et al.* (2007a) mensuraram a concentração de CCL2 em diferentes momentos durante o deslocamento do dente de camundongos por meio de aparelhos ortodônticos. Foi encontrado aumento nos níveis de CCL2, sugerindo que estas quimiocinas estão relacionadas com o recrutamento de células mononucleares, diferenciação e ativação de pré-osteoclastos em osteoclastos maduros funcionais e, desempenhando, portanto, importante papel na movimentação dentária ortodôntica.

Trabalhos anteriores sugerem que CCL5 está envolvida com a progressão de doenças como artrite reumatóide, osteoartrite, osteomielite e respostas pós-traumáticas (WRIGHT e FRIEDLAND, 2002; LISIGNOLI *et al.*, 2002). CCL5 também se mostrou capaz de recrutar osteoclastos (YU *et al.*, 2004). Estudos demonstram ainda que essa seja uma importante molécula de comunicação entre os osteoclastos e osteoblastos (Yano *et al.*, 2005), e é altamente expressa durante o movimento dentário ortodôntico, principalmente na fase inicial de movimentação (ALHASHIMI *et al.*, 1999; ANDRADE JR. *et al.*, 2007a).

O ativador do receptor nuclear kappa B (RANK) e o ligante do ativador do receptor nuclear kappa B (RANKL) fornecem a base celular e molecular da integração entre osteoclasto e osteoblasto, essenciais para a remodelação óssea. RANKL pertence à superfamília de TNF- α , e é molécula importante da osteoclastogênese (Suda *et al.*, 1999). Ogasawara *et al.* (2004) em seu estudo relata que RANKL foi detectado em osteoblastos em células do ligamento periodontal durante movimentação dentária experimental.

As proteínas da família da metaloproteinase de matriz (MMP) estão envolvidas na degradação da matriz extracelular em processos fisiológicos normais, como o desenvolvimento embrionário, reprodução e remodelação tecidual, bem como em processos de doenças, como artrite e metástase. As MMP-1, -8 e -13 estão presentes no ligamento periodontal. Takahashi *et al.* (2008) verificou a expressão de MMP13 em ambos os lados de tensão e compressão durante movimentação ortodôntica em ratos.

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima relacionada à atividade de neoformação óssea (LORCH, 1949). Hie *et al.* (2007) encontrou níveis diminuídos da atividade dessa enzima em fêmur de ratos diabéticos em relação aos animais controle.

O Fator de transcrição relacionado ao runt tipo 2 (RUNX2) é uma proteína ligada a fatores de transcrição da família RUNX essencial para a diferenciação osteoblástica e formação óssea. Fowlkes *et al.*, (2007) relata ter observado em seu estudo níveis diminuídos dessa proteína em animais diabéticos hiperglicêmicos.

A osteocalcina (OCN) é uma proteína da matriz óssea, produzida pelos osteoblastos, que age especificamente no metabolismo ósseo e não sofre influência por desordens ósseas de origem metabólicas (KANBUR *et al.*, 2002).

O colágeno é um componente da matriz extracelular que, durante a remodelação óssea, é degradado e removido, para que novos componentes sejam então formados e depositados (Holiday *et al.*, 2003). A clivagem do colágeno tipo 1 (COL-1) está relacionada ao desencadeamento de reabsorção óssea in vivo (Holiday *et al.*, 2003).

Alguns estudos anteriores mostraram que a diabetes aumenta a expressão das citocinas inflamatórias (GEERLINGS e HOPELMAN, 1999; ZYKOVA *et al.*, 2000; FURUDOI *et al.*, 2003) e está relacionada a distúrbios da remodelação óssea. Já que a diabetes causa um estímulo persistente para esse recrutamento de células ósseas (NAGUIB *et al.*, 2004), que, conseqüentemente, afeta o remodelamento ósseo, é importante investigar o impacto desta doença no recrutamento e ativação dos osteoclastos, e conseqüentemente, na movimentação dentária ortodôntica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo desse estudo foi avaliar as mudanças celulares e moleculares causadas pela diabetes no recrutamento e atividade dos osteoclastos, e, conseqüentemente, na MDO em modelo animal.

3.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver diabetes em camundongos e avaliá-los em um modelo pré-existente de aplicação de forças ortodônticas, analisando o recrutamento de osteoclastos associado à MDO nessa condição patológica, comparando-os a camundongos saudáveis;
- Avaliar a expressão da citocina (TNF- α), das quimiocinas (CCL2 e CCL5), e do recrutamento de osteoclastos nos tecidos periodontais submetidos à MDO em camundongos diabéticos e saudáveis.
- Avaliar a expressão dos marcadores osteoclásticos (RANK / RANKL, MMP13) e de atividade osteoblástica (RUNX2, COL-1, ALP e OCN) no ligamento periodontal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento Experimental

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunofarmacologia (Departamento de Bioquímica e Imunologia – ICB/UFMG). Todos os animais foram tratados sob as normas do Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo nº. 135/08).

Para realização deste experimento, foram utilizados 50 camundongos machos C57BL6/J selvagens com idade média de 11 semanas e peso variando entre 20-25g, disponíveis no biotério da UFMG no departamento de Bioquímica e Imunologia (residindo em gaiolas de plástico; dieta composta de ração pastosa e água; mantidos em um ciclo de 12 horas claro/escuro). Nesta idade os camundongos tinham atingido a maturidade sexual e seu máximo peso corporal. Os animais foram pesados durante todo o período experimental.

Uma mola ortodôntica foi instalada entre os molares do lado direito e caninos dos camundongos. Para avaliação da concentração das quimiocinas, foi utilizado o teste Real Time-PCR após 12 e 72 horas de força ortodôntica. Foram também avaliados histopatologicamente o recrutamento de osteoclastos e osteoblastos nos tecidos periodontais, e a quantidade de MDO após 6 e 12 dias de carga biomecânica.

Os seguintes critérios foram usados para determinar se o animal seria ou não incluído no estudo: (1) Ausência de irritações ou inflamações na cavidade oral; (2) permanência do aparelho nos elementos dentários até o final do tratamento; (3) glicemia acima de 300mg/dl – para os grupos diabéticos.

4.2. Métodos

4.2.1. Protocolo da Indução da Diabetes Mellitus por Estreptozotocina

Com idade média de 7 semanas e peso médio de 19g, os animais foram submetidos à indução da diabetes após jejum de 8 horas, via injeção intraperitoneal de estreptozotocina na concentração de 120mg/kg diluída em solução tampão citrato a 0,01 molar. A glicemia era medida sete dias após a indução através de um pequeno corte no rabo dos camundongos, de onde retirava-se uma gota de sangue para ser levada ao aparelho medidor de glicose (*Accu-check Advantage*, Roche, Mannheim, Germany), estando os animais em jejum de 8 horas. Eram considerados diabéticos aqueles animais que apresentavam glicemia acima de 300mg/dl. Caso a glicemia estivesse inferior a esse valor, a indução era repetida, por no máximo quatro vezes. A glicemia foi medida durante todo o período experimental. No grupo de animais não-diabéticos foi veiculada a solução tampão citrato.

4.2.2. Protocolo Experimental

Todo o protocolo experimental está baseado na tese do Prof. Dr. Ildeu Andrade Jr. (2007b).

Os camundongos foram anestesiados pela injeção intraperitoneal de 0,2 mL/25g de peso corporal, de uma solução contendo xilazina ($0,02 \text{ mg mL}^{-1}$), ketamina (50 mg mL^{-1}) e solução salina em uma proporção de 1: 0,5: 3, respectivamente. Em seguida, os animais foram colocados com a cabeça para cima em uma mesa cirúrgica especialmente desenhada para restringir movimentos e permitir o acesso intra-oral (Fig. 1, 2, 3).



Figura 1: A) Anestesia peritoneal B) Mesa cirúrgica utilizada neste trabalho. Fotos gentilmente cedidas pelo Dr. Ildeu Andrade Jr. (Tese de Doutorado – Departamento de Morfologia – ICB/UFMG, 2007).

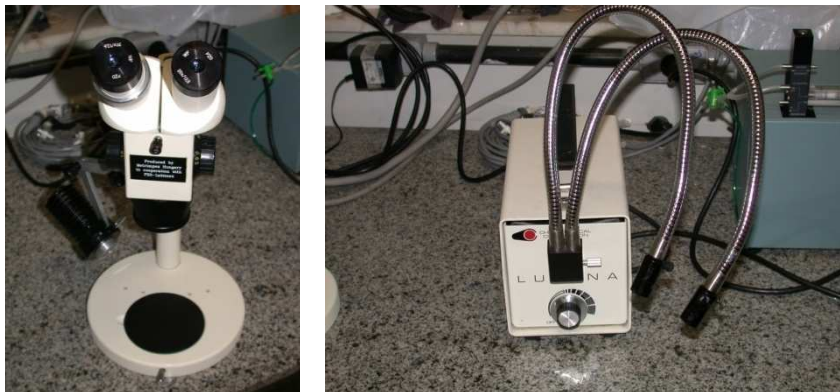


Figura 2: A) Estereomicroscópio para visualização do campo microcirúrgico. B) Fibra óptica para iluminação do campo microcirúrgico. Fotos gentilmente cedidas pelo Dr. Ildeu Andrade Jr. (Tese de Doutorado – Departamento de Morfologia – ICB/UFMG, 2007).

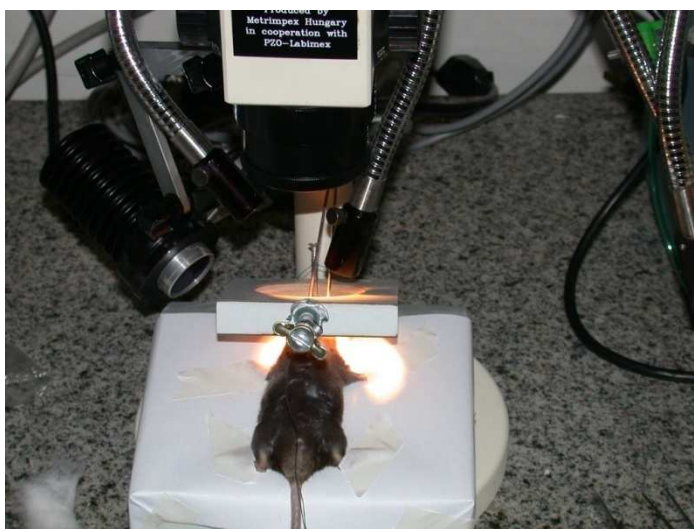


Figura 3: Camundongo posicionado na mesa cirúrgica. Foto gentilmente cedida pelo Dr. Ildeu Andrade Jr. (Tese de Doutorado – Departamento de Morfologia – ICB/UFMG, 2007).

O animal foi posicionado, tendo a cavidade oral iluminada pelas fibras ópticas e visualizada com auxílio do estereomicroscópio.

Após o posicionamento do animal na mesa cirúrgica, a superfície oclusal do primeiro molar superior do lado direito foi limpa com acetona por 10 segundos e um selante auto-adesivo (*self-etching primer*, Unitek, 3M, Minneapolis, USA) foi então aplicado. Utilizamos uma mola ortodôntica aberta em Níquel-Titânio (Ni-Ti) de 0.25 x 0.76 mm (Lancer Orthodontics, San Marcos, CA, USA), fixada com resina

fotopolimerizável (Transbond, Unitek/3M, St. Paul, MN) e posicionada entre o primeiro molar superior direito e os incisivos centrais. A parte posterior da mola foi então colada na superfície oclusal do primeiro molar superior (Fig.4).

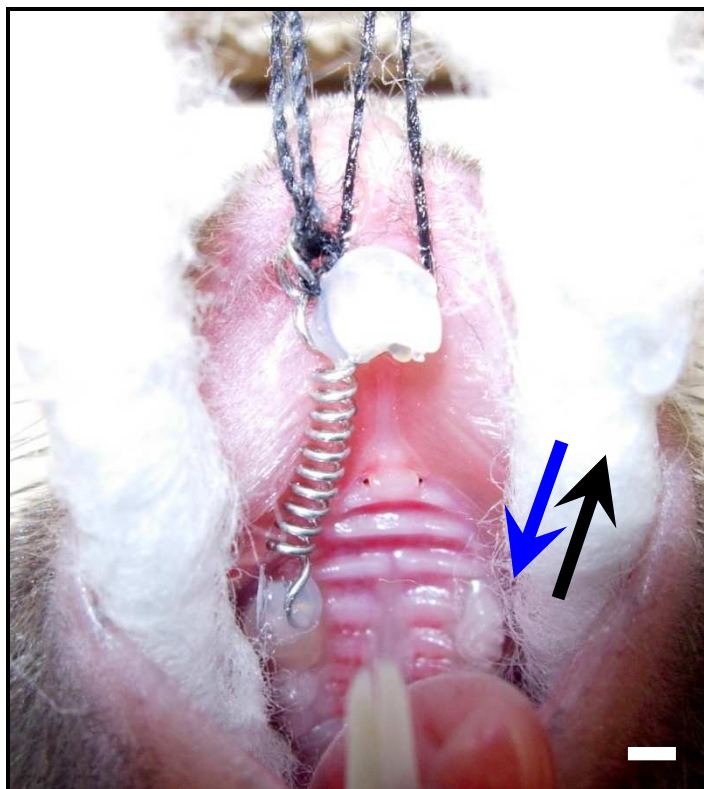


Figura 4: Fotografia intra-oral após a colocação da mola de Ni-Ti aberta entre o primeiro molar superior direito e os incisivos. A seta preta indica direção do movimento dentário ortodôntico. A seta azul indica o movimento dentário fisiológico. Barra = 1mm. Foto gentilmente cedida pelo Dr. Ildeu Andrade Jr. (Tese de Doutorado – Departamento de Morfologia – ICB/UFMG, 2007).

O lado esquerdo foi utilizado como controle. A magnitude de força foi calibrada por um tensiômetro (Shimpo Corp., Tokyo, Japan) para exercer uma força de 10g aplicada na direção mesial. Não houve reativação durante o período experimental.

Os animais foram divididos em 2 grupos: diabéticos (DB), normoglicêmicos (NG). Nestes grupos os animais foram divididos em 2 subgrupos: controle (animais sem mola) e experimental (com mola ativada). O sacrifício foi realizado com overdose de anestésico.

Para a análise histológica foram utilizados 20 animais (10 DB e 10 NG), onde foram feitas análises microscópicas e mensuração da MDO. Esses animais receberam aplicação de força ortodôntica no primeiro molar superior direito através de uma mola de Níquel-Titânio e foram sacrificados após 6 e 12 dias (n = 5). O molar esquerdo foi usado como controle.

Para a análise bioquímica (PCR), foram utilizados 30 animais DB e 20 NG. Entre os diabéticos, 5 foram usados como grupo controle, sacrificados no dia 0 (sem colocação da mola). Os camundongos DB e NG receberam aplicação de força ortodôntica no primeiro molar superior direito e foram sacrificados após 12 horas e 3 dias (5 animais para cada tempo experimental).

Andrade Jr. *et al.* (2007b) observou que a máxima expressão das citocinas era observada após 12 horas de força ortodôntica e suas concentrações diminuía e alcançavam os níveis basais após 3 dias. Além disso, o maior número de osteoclastos no periodonto foi observado após 12 dias, sendo que após 6 dias de carga biomecânica o número de osteoclastos já era significativamente maior do que após os outros momentos anteriores estudados. Assim, definimos os principais momentos a serem analisados neste estudo, com os animais sendo sacrificados com uma overdose de anestésico nos seguintes períodos: 0, 12 e 72 horas para análise bioquímica; e, 6 e 12 dias para análise histológica.

4.2.3. Análise quantitativa dos níveis de Citocinas através do Real-Time-PCR

Usando um estereomicroscópio, o ligamento periodontal e o osso alveolar circundante foram extraídos dos primeiros molares superiores. A mucosa gengival e oral foram dissecadas e descartadas, juntamente com os dentes. As amostras foram submetidas à extração de RNA total usando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), homogeneizadas em vortex e mantidas por cinco minutos à temperatura ambiente. Para cada 1 mL da suspensão foi adicionado 200 µL de clorofórmio, em seguida as amostras foram centrifugadas a 1300 rpm durante 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, ao qual foram adicionados 500 µL de isopropanol, agitado em vortex e incubado por 20 minutos a -20°C para precipitação do RNA. Os tubos foram centrifugados a 1300 rpm durante 15 minutos a 4°C e o precipitado lavado em etanol 100%. Os tubos foram novamente centrifugados a

1300 rpm durante 15 minutos a 4°C, invertidos sobre papel de filtro e o precipitado suspenso em água deionizada. Alíquotas de cada amostra foram diluídas em água deionizada para quantificação do RNA.

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

4.2.4. Processamento histológico e análise microscópica

Após o sacrifício dos animais, os maxilares superiores foram dissecados e imediatamente imersos em solução de paraformaldeído 4% em PBS 7.4, por 48 horas, para a fixação. Em seguida, as amostras foram lavadas em PBS e desmineralizadas em solução de EDTA 14% (pH 7.4), por 20 dias com trocas diárias de solução. Após a lavagem das peças por uma noite em água corrente, foi feito o preparo das peças para o processamento histológico. Para a obtenção de secções

longitudinais padronizadas, as maxilas foram dissecadas com um auxílio de um estereomicroscópio. Com uma lâmina de aço, foram realizados 2 cortes para redução e preparo das peças para o processamento histológico. Inicialmente, a porção dos maxilares contendo os incisivos foi cortada e descartada. Um segundo corte foi realizado a 1 mm da superfície palatal da coroa dos molares, paralelo a uma linha imaginária traçada sobre a superfície oclusal dos molares. Como amostra, foi utilizado apenas os fragmentos contendo os três molares superiores em ambos os lados (Fig. 5). Após o preparo, realizou-se a desidratação em séries crescentes de álcool 70%, 80%, 90% e absoluto (3 banhos) por 30 minutos cada. Em seguida, as peças foram clarificadas em 3 banhos de xilol (20, 15 e 10 minutos) e incluídas em parafina. As amostras foram incluídas com a superfície palatal voltadas para o plano da microtomia. Os blocos de parafina foram cortados longitudinalmente com 4 μ m de espessura empregando-se um micrótomo rotatório (Jung, Histocut 820, Mussioch, Alemanha). Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina para seleção. As amostras selecionadas foram então coradas para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) e contra-coradas com hematoxilina de acordo com instruções do fabricante.

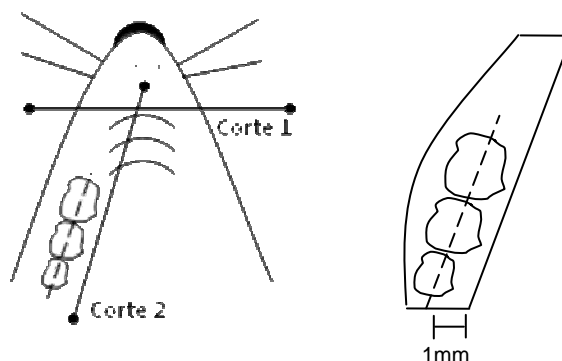


Figura 5: Desenho esquemático do preparo das peças para processamento histológico. Fragmento da maxila anterior, contendo os incisivos está separado pelo Corte 1. Em seguida, um bisturi posicionado a 1 mm da superfície palatal da coroa dos molares e paralelo a uma linha imaginária traçada sobre a oclusal dos molares, separa o fragmento de interesse (corte 2). Procedimento foi realizado em ambos os lados (direito e esquerdo) da maxila. Figura gentilmente cedida pelo Dr. Ildeu Andrade Jr. (Tese de Doutorado – Departamento de Morfologia – ICB/UFMG, 2007).

Foram também extraídos os pâncreas para avaliação das ilhotas pancreáticas. Após a dissecação, fragmentos dos pâncreas foram imediatamente fixados em solução de paraformaldeído a 4% em PBS (pH 7,4), por 24 horas à

temperatura ambiente. Em seguida, os tecidos foram desidratados em séries crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol e processados rotineiramente para inclusão em parafina. Cada amostra foi cortada em micrótomo rotatório (Jung, Histocut 820, Mussioch, Alemanha) para obter-se secções de 4 µm de espessura. Os cortes obtidos foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE). As lâminas obtidas foram avaliadas ao microscópico óptico, para estudos histológicos.

4.2.5. Documentação Fotográfica dos Pâncreas

Para a documentação fotográfica dos cortes dos pâncreas utilizou-se microscópio Olympus BX50 acoplado a vídeo-câmera Olympus Q Colour 3 e conectado a um computador. As imagens foram capturadas com a utilização do programa Q Capture Pro (Q Imaging, Canadá) do Laboratório de Biologia Linfóide e da Regeneração do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

4.2.6. Análise Microscópica das Lesões Pancreáticas

Os cortes corados com Hematoxilina e Eosina foram avaliados microscopicamente em aumento de 40x. Para confirmação da indução da diabetes por destruição das células-β pancreáticas os pâncreas dos camundongos deveriam se apresentar com características histopatológicas semelhantes às da figura 6: degeneração das células das ilhotas pancreáticas, presença de infiltrado inflamatório mononuclear intenso, indicativo de pancreatite crônica.

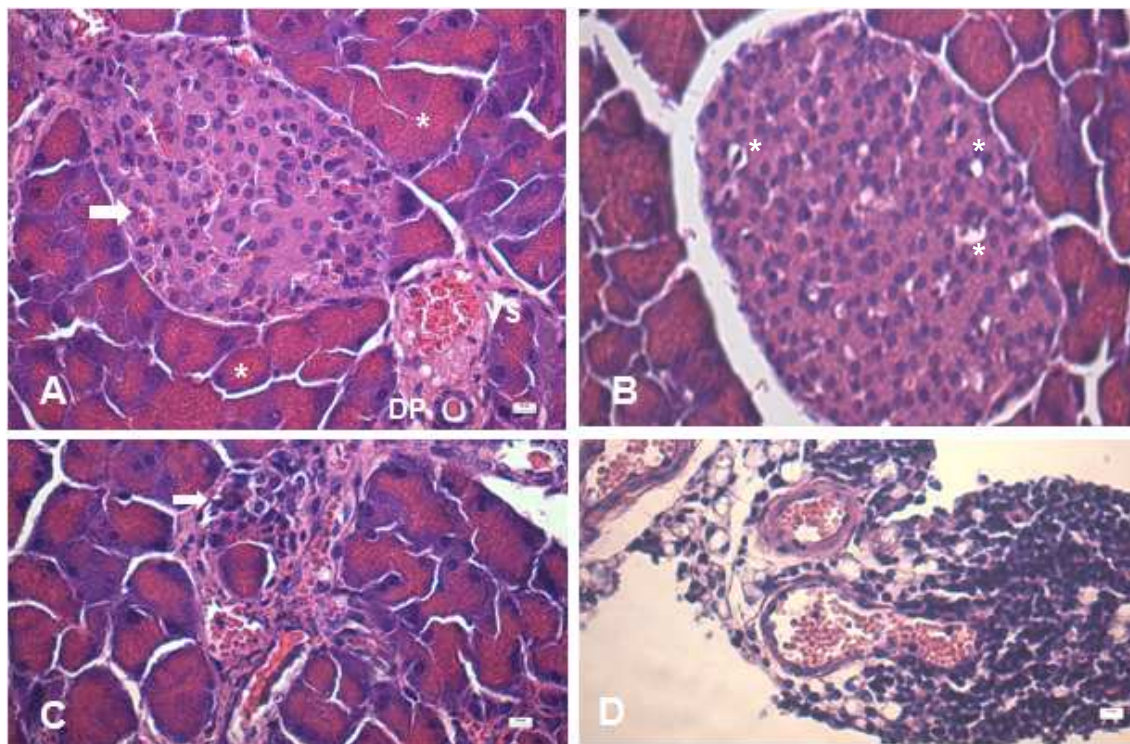


Figura 6: Fotomicrografias de seções do pâncreas de camundongos não tratados (A) e tratados com estreptozotocina (B-D). H.E.; Barra: 10 μ m. (A) Não tratado com estreptozotocina. Ácinos pancreáticos (asteriscos) e ilhota pancreática (seta). Vaso sanguíneo (VS) e ducto pancreático (DP) característicos. (B) Tratado com estreptozotocina, 6 dias. Observa-se degeneração discreta das algumas células da ilhota pancreática (asterisco). (C) Tratado com estreptozotocina, 12 dias. Pancreatite crônica. Observa-se acúmulo perivascular de células inflamatórias mononucleares (seta). (D) Tratado com estreptozotocina, 12 dias. Intensa infiltração de células inflamatórias mononucleares no tecido adiposo peripancreático.

4.2.7. Contagem do Número de Células TRAP- positivas

Para análise histomorfométrica foram utilizadas cinco seções representativas por animal, onde a atividade da fosfatase ácida foi avaliada. O número total de osteoclastos foi contado em 5 campos microscópicos consecutivos (x40). A contagem foi feita na superfície da lâmina dura, no espaço do ligamento periodontal e no endósteo. Os osteoclastos presentes nas lacunas ósseas do osso mesial da raiz disto-vestibular do primeiro molar, nos seus dois terços coronais, foram identificados como células positivas ao TRAP. Para validação destas análises, dois examinadores avaliaram as lâminas. As análises foram realizadas com o auxílio de um microscópio de luz Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha).

4.2.8. Mensuração da Movimentação Dentária

A quantidade de MDO foi avaliada morfometricamente pela mensuração das menores distâncias entre a junção amelo-cementária (JAC) dos primeiros e segundos molares (Fig. 6). As medidas foram tomadas através de um microscópio Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) adaptado a uma câmera digital (PowerShot A620, Canon, Tokyo, Japan), baseado em estudo anterior em camundongos (Andrade Jr. *et al.*, 2007a). O software Image J (National Institutes of Health – EUA) foi utilizado para quantificar a movimentação dentária. Todas as avaliações foram feitas por dois examinadores cegos ao status de cada grupo. Três medidas foram utilizadas para cada avaliação.

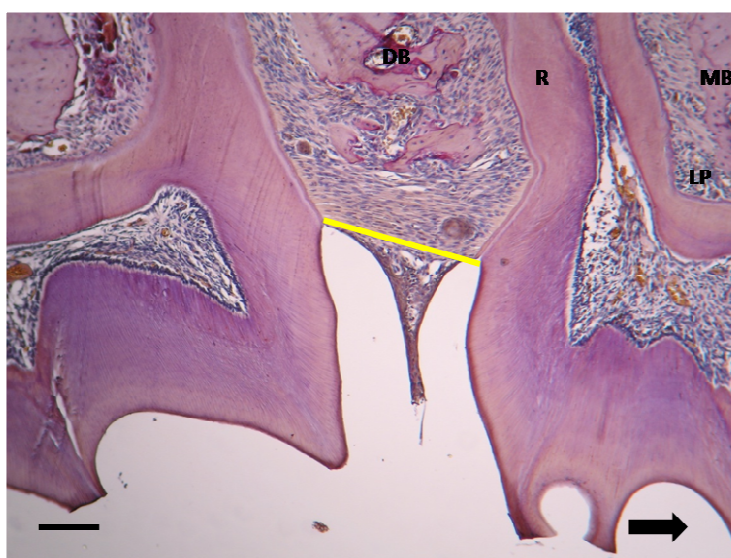


Figura 7: Avaliação morfométrica do movimento dentário após a aplicação de força ortodôntica. A linha amarela representa a distância entre as junções amelo-cementárias do primeiro e segundo molar superior. Os cortes verticais foram avaliados através de um microscópio Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) utilizando o software Image J do NIH (National Institutes of Health). A seta preta indica a direção do movimento dentário ortodôntico. Barra = 100 μ m.

4.2.9. 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.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTI K.G., ZIMMET P.Z. Definition, diagnosis and classification of Diabetes Mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of Diabetes Mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabet Med** 15(7): 539-553. 1998.

ALHASHIMI N., FRITHIOF L., BRUDVIK P., BAKHIET M. Chemokines are upregulated during orthodontic tooth movement. *J Interferon Cytokine Res* 19(9):1047-1052. 1999.

ALIKHANI M, ALIKHANI Z, BOYD C, MACLELLAN CM, RAPTIS M, LIU R, PISCHON N, TRACKMAN PC, GERSTENFELD L, GRAVES DT. Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. *Bone* 2007; Feb;40(2):345-53.

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. **J Dent Res** 86(11):1089-94. 2007a.

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. 2007b. 141f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte.

BOLZÁN A.D., BIANCHI M.S. Genotoxicity of Streptozotocin. *Mutation Research* 512: 131-134. 2002.

BOTOLIN S., MCCABE R. Bone loss and Increased Bone Adiposity in Spontaneous and Pharmacologically Induced Diabetic Mice. **Endocrinology** 148(1): 198-205. 2007.

DAVIDOVITCH Z. Tooth movement. **Crit Rev Oral Biol Med** 2(4):411-450. 1991.

DINIZ SF, AMORIM FP, CAVALCANTE-NETO FF, BOCCA AL, BATISTA AC, SIMM GE, SILVA TA. Alloxan-induced diabetes delays repair in a rat model of closed tibial fracture. **Braz J Med Biol Res**. May;41(5):373-9. 2008.

FULLER K, OWENS J, CHAMBERS T. Macrophage inflammatory protein-1 alpha and IL-8 stimulate the motility but suppress the resorption of isolated rat osteoclast. **J Immunol**. 154:6065-6072. 1995.

FURUDOI S, YOSHII T, KOMORI T. Balance of tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 in a buccal infection in a streptozotocin-induced diabetic rat model. **Cytokine**. Nov 21;24(4):143-9. 2003.

GARLET G.P., CARDOSO C.R., CAMPANELLI A.P., FERREIRA B.R., AVILA-CAMPOS M.J., CUNHA F.Q., et al. The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. **Clin Exp Immunol** 147:128-138. 2007.

GEERLINGS SE, HOPELMAN AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). **FEMS Immunol Med Microbiol**. 26:259-265. 1999.

GRAVES D.T., LIU R., ALIKHANI M., AL-MASHAT H., TRACKMAN P.C. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis – impact on periodontal pathology. **J Dent Res** 85(1): 15-21. 2006

GRAVES DT, NAGUIB G, LU H, LEONE C, HSUE H, KRALL E. Inflammation is more persistent in type 1 diabetic mice **J Dent Res**. Apr;84(4):324-8. 2005.

HE H, LIU R, DESTA T, LEONE C, GERSTENFELD LC, GRAVES DT. Diabetes Causes Decreased Osteoclastogenesis, Reduced Bone Formation, and Enhanced Apoptosis of Osteoblastic Cells in Bacteria Stimulated Bone Loss. **Endocrinology**. Jan;145(1):447-52. Epub 2003 Oct 2. 2004.

HIE M, SHIMONO M, FUJII K, TSUKAMOTO I. Increased cathepsin K and tartrate-resistant acid phosphatase expression in bone of streptozotocin-induced diabetic rats. **Bone**. Dec;41(6):1045-50. Epub 2007 Aug 30. 2007.

HOLLIDAY LS, VAKANI A, ARCHER L, DOLCE C. Effects of matrix metalloproteinase inhibitors on bone resorption and orthodontic tooth movement. **J Dent Res**. Sep;82(9):687-91. 2003.

KANBUR NO; DERMAN O; SEN TA; KINIK E Osteocalcin. A biochemical marker of bone turnover during puberty. **Int J Adolesc Med Health**;14(3):235-44. Jul-Sep.2002.

KOYAMA Y., MITSUI N., SUZUKI N., YANAGISAWA M., SANUKI R., ISOKAWA K., SHIMIZU N., MAENO M. Effect of compressive force on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in osteoblastic Saos-2 cells. **Archives of Oral Biology** 53(5):488-96. 2008.

KRISHNAN V., DAVIDOVITCH Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. **Am J Orthod Dentofacial Orthop** 129:1-32. 2006.

LIU R., BAL H.S., DESTA T., KROTHAPALLI N., ALYASSI M., LUAN Q., GRAVES D.T. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. **J Den Res** 85(6):510-514. 2006.

LORCH IJ. Alkaline phosphatase and the mechanism of ossification. **J Bone Joint Surg Am.** Feb;31B(1):94-9.1949.

MASELLA RS, MEISTER M. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.** Apr;129(4):458-68. 2006.

MISHIMA N., SAHARA N., SHIRAKAWA M., OZAWA, H. Effect of streptozotocin-induced Diabetes Mellitus on alveolar bone deposition in the rat. **Archives of Oral Biology** 47: 843-849. 2002.

NAGUIB G, AL-MASHAT H, DESTA T, GRAVES DT. Diabetes Prolongs the Inflammatory Response to a Bacterial Stimulus Through Cytokine Dysregulation. **J Invest Dermatol.** Jul;123(1):87-92. 2004.

OGASAWARA T, YOSHIMINE Y, KIYOSHIMA T, KOBAYASHI I, MATSUO K, AKAMINE A, SAKAI H. In situ expression of RANKL, RANK, osteoprotegerin and cytokines in osteoclasts of rat periodontal tissue. **J Periodontal Res.**Feb;39(1):42-9. 2004.

RÄKEL A, SHEEHY O, RAHME E, LELORIER J. Osteoporosis among patients with type 1 and type 2 diabetes. **Diabetes & Metabolism** 34: 193–205. 2008

ROBERTS W. E., HUJA S., ROBERTS J. Bone remodeling: biomechanics, molecular mechanisms, and clinical perspectives. **Seminars in Orthodontics** 10(2): 123-161. 2004.

SCHWARTZ, A.V. Diabetes Mellitus: Does it Affect Bone? **Calcif Tissue Int.** 73:515–519. 2003.

SUDA T, TAKAHASHI N, UDAGAWA N, JIMI E, GILLESPIE MT, MARTIN TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev.* Jun;20(3):345-57. 1999.

SUZUKI K, KUROSE T, TAKIZAWA M, MARUYAMA M, USHIKAWA K, KIKUYAMA M, SUGIMOTO C, SEINO Y, NAGAMATSU S, ISHIDA H. Osteoclastic function is accelerated in male patients with type 2 diabetes mellitus: the preventive role of osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin (OCIF/OPG) on the decrease of bone mineral density. **Diabetes Res Clin Pract.** May;68(2):117-25. 2005.

SZKUDELSKI T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol Res** 50:536-546. 2001.

TAKAI N., SHINOHARA M., YOSHIDA Y., OHURA K., MORI M., KAKUDO Y. Effect of streptozotocin diabetes on gingivitis in plaque-susceptible rats. **J Den Res** 65(1):49-52. 1986.

THOMPSON CS .Animal models of diabetes mellitus: relevance to vascular complications. **Curr Pharm Des.**14(4):309-24. 2008.

VERHAEGHE J, VAN HERCK E, VAN BREE R, MOERMANS K, BOUILLON R. Decreased osteoblast activity in spontaneously diabetic rats. In vivo studies on the pathogenesis. **Endocrine.** Oct;7(2):165-75. 1997

VERNA C, DALSTRA M, MELSEN B. The rate and the type of orthodontic tooth movement is influenced by bone turnover in a rat model. **Eur J Orthod.** Aug;22(4):343-52. 2000.

WILD S., ROGLIC G., GREEN A., SICREE R., KING H. Global Prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care** 27(5) 1047-1053. 2004.

YANO S, MENTAVERRI R, KANUPARTHI D, BANDYOPADHYAY S, RIVERA A, BROWN EM, CHATTOPADHYAY N. Functional expression of beta-chemokine receptors in osteoblasts: role of RANTES in osteoblasts and regulation of its secretion by osteoblasts and osteoclasts. **Endocrinology** 146:2324-2335. 2005.

YOSHIMATSU M., SHIBATA Y., KITAURA H., CHANG X., MORIISHI T., HASHIMOTO F., *et al.* Experimental model of tooth movement by orthodontic force in mice and its application to tumor necrosis factor receptor-deficient mice. **J Bone Miner Metab** 24:20-27. 2006.

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

ZYKOVA SN, JENSSEN TG, BERDAL M, OLSEN R, MYKLEBUST R, SELJELID R. Altered cytokine and nitric oxide secretion in vitro by macrophages from diabetic type II-like db/db mice. **Diabetes**; 49:1451-1458. 2000.

6. ARTIGO GERADO

EFFECT OF DIABETES ON ORTHODONTIC TOOTH MOVEMENT IN A MICE MODEL

Braga, SMG¹, I. Andrade Jr.^{1, 2}, SRA. Taddei², GP. Garlet³, MM. Teixeira², TA. Silva^{2, 4}

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

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

3. Department of Biological Sciences, School of Dentistry of Bauru, São Paulo University, Bauru, São Paulo – Brazil

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

Abstract

Orthodontic tooth movement (OTM) is achieved by remodeling of alveolar bone in response to mechanical loading (ML). Type 1 diabetes alters bone remodeling, suggesting that this disease might affect OTM. This study investigated the changes in the cellular and molecular mechanisms related to osteoclast recruitment and activity during OTM in diabetic (DB) mice. An orthodontic appliance was placed in normoglycemic (NG) and made DB by streptozotocin C57BL6/J mice. Histomorphometric analysis and Real Time PCR of periodontium was performed after 6 and 12 days, and 12 hours and 3 days of ML, respectively. The results showed that DB exhibited greater OTM and increased number of TRAP-positive osteoclasts after 12 days. Meanwhile, higher levels of RANKL, CCL2, CCL5 and TNF- α , and lower levels of RUNX2, COL-1 and ALP was observed after 3 days in DB. Altogether, the data suggested that diabetes upregulated osteoclast migration and activity and downregulated osteoblast differentiation, leading to a greater OTM.

INTRODUCTION

Diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by defects in insulin secretion, action or both, leading to chronic hyperglycemia, disturbances of carbohydrate, fat and protein metabolism (Albert and Zimet for WHO, 1998). The low levels of insulin may also affect bone turnover, resulting in diminished bone mineral density (Schwartz, 2003), osteopenia, osteoporosis (Räkel *et al.*, 2008), delay on fracture healing (Diniz *et al.*, 2008), and increased incidence of periodontal disease (Mishima *et al.*, 2002). Several mechanisms have explained the altered bone remodeling in diabetes, one of which is diminished bone formation due to decreased osteoblastic activity (Verhaeghe *et al.*, 1997) or enhanced apoptosis of osteoblastic cells (He *et al.*, 2004). Another contributing factor may be increased bone resorptive activity (Hie *et al.*, 2007). However, it has been still controversial if the osteoclastic function and recruitment in diabetes is elevated or not (Suzuki, 2002).

Orthodontic tooth movement is achieved by the remodeling of alveolar bone in response to mechanical loading (Krishnan e Davidovitch, 2006). It occurs by the bone resorption by osteoclast in compression side and by the formation of new bone by osteoblasts in tension side (Masella e Meister, 2006). An alteration of the metabolic state of bone can result in a different rate of tooth movement (Verna *et al.*, 2000). Therefore, as diabetes may alter bone remodeling, this disease might affect the orthodontic tooth movement, but little is known about this.

Chemokines provide key signals for trafficking and homing of osteoclasts and osteoblasts (Fuller *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 2004; Yano *et al.*, 2005). Recent reports demonstrated increased levels of CCL2, CCL5 and TNF- α during orthodontic movement in animal models (Alhashimi *et al.*, 1999; Andrade Jr. *et al.*, 2007) and humans (Maeda *et al.*, 2007; Garlet *et al.*, 2008). Previous investigators have reported that diabetes present diminished inflammatory cytokine expression, such as receptor activator of nuclear factor ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) (Lappin *et al.*, 2009), while others report have demonstrated enhanced expression of these proteins (Geerlings and Hopelman, 1999; Zykova *et al.*, 2000; Furudoj *et al.*, 2003). Since diabetes may cause a more persistent stimulus for the recruitment of bone cells or not (Naguib *et al.*, 2004) and, consequently, might affect bone

remodeling, it is important to investigate the level of pro-inflammatory cytokines involved in this processes.

The aim of this study was to evaluate the cellular and molecular effects caused by diabetes in osteoclast recruitment and activity, osteoblast activity, and consequently, orthodontic tooth movement in a mice model.

MATERIALS & METHODS

Experimental animals

Eleven-week-old male wild-type mice C57BL6/J were used in this experiment. All animals were treated under ethical regulations for animal experiments, defined by the Institutional Ethics Committee of UFMG (n.135/08). Thirty of these mice were rendered diabetic (DB) by intraperitoneal injection of 120mg/kg of streptozotocin (STZ, Sigma Chemical Co., St Luis, MO), freshly dissolved in citrate buffer 0,1 M (pH 4.5), at 7-weeks of age, weighing 20-25g. Animals were kept on fasting of 8 hours prior to STZ injection. After seven days after induction, blood samples were collected from the tail vein for evaluation of the plasma glucose levels by the glucose-oxidase enzymatic method using Accu-Check Advantage (Roche, Mannheim, Germany). Diabetes mellitus was confirmed by blood glucose concentration greater than 300 mg/dl, after 8 hours of fasting. The injection of STZ was repeated up to four times at intervals of one-week when the animal presented glucose levels below 300mg/dl. In the group of normoglycemic (NG) animals it was injected the citrate buffer solution. The animal's weight and plasma glucose was recorded during the experimental period.

Experimental Protocol

The experimental protocol was based in a previous work (Andrade Jr. *et al.*, 2007). The mice were anesthetized i.p. with 0.2 mL of a solution containing xylazine (0.02 mg mL⁻¹), ketamine (50 mg mL⁻¹). An orthodontic appliance consisted of a Ni-Ti 0.25 x 0.76 mm (Lancer Orthodontics, San Marcos, CA, USA) coil spring, bonded by a light cured resin (Transbond, Unitek/3M, Monrova CA) between maxillary right first molar and the incisors (Fig.1). The left side was used as control. The force magnitude was calibrated by a tension gauge (Shimpo Corp., Tokyo, Japan) to exert a force of 10g applied in the mesial direction. There was no reactivation during the

experimental period. The animals were divided in 2 groups, DB mice and NG mice, which were divided in 2 sub-groups: control (non-operated animals) and experimental group (with activated coil spring). Mice were sacrificed with an overdose of anesthetic at the following times: 6 and 12 days for histological measurements and 0, 12 and 72 hours for biochemical analysis. For every set of experiments (histological and biochemical measurements), 5 animals were used for each time-point.

Histopathological Analysis

The right and the left halves of the maxillae, including first, second and third molars were dissected and fixed in 10% buffered formalin (pH 7.4) and rinsed in distilled water. After fixation, each hemimaxillae were decalcified in 14% EDTA (pH 7.4) for 20 days and embedded in paraffin. The samples were cut into vertical sections of 4 μm thickness. The selection was based on morphological criteria such as the position of the first molar disto-buccal root, where it appeared to be as long as possible. The sections were stained for tartrate resistant acid phosphatase (TRAP; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO), 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 total number of TRAP- positive cells was determined in five consecutive microscopic fields (x 40). The slides were counted by two examiners, and the intraclass correlation coefficient showed average measures of 0.985, validating the measurement.

Measurement of Tooth Movement

The software Image J (National Institutes of Health) was utilized to morphometrically evaluate the amount of tooth movement. This was accomplished by measuring the distance between the cementum-enamel-junction's (CEJ's) from the first molar and the second molar (1st and 2nd molar distance) in 5 vertical sections

per animal under a microscope Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) adapted to a digital camera (PowerShot A620, Canon, Tokyo, Japan), adapted from a previous study (Mavragani *et al.*, 2005). Three measurements were conducted for each evaluation and the variability was below 5% in all cases.

RNA extraction and Real-time PCR

Using a stereomicroscope, periodontal ligament and surrounding alveolar bone samples were extracted from the upper first molars. The gingival, oral mucosa and tooth were dissected and discarded. These tissues were submitted to RNA extraction using TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Complementary DNA (cDNA) was synthesized using 2 µg of RNA through a reverse transcription reaction (Superscript II, Invitrogen). Real-time PCR analysis was performed in ABI Prism 7000 using SYBR-green fluorescence quantification system (Applied Biosystems, Foster City, CA). Standard PCR conditions were 95°C (10 min), and then 40 cycles of 94°C (1 min), 58°C (1 min) and 72°C (2 min), followed by the standard denaturation curve. Primer sequences for mouse β -actin, receptor activator of nuclear factor (RANK), RANKL, MMP13 (matrix metalloproteinase-13), CCL2, CCL5, TNF- α , RUNX2 (runt-related transcription factor 2), COL-1 (collagen type 1), ALP (alkaline phosphatase) and osteocalcin (OCN).

The mean Ct values from duplicate measurements were used to calculate expression of the target gene, with normalization to an internal control (β -actin) using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formula.

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

Streptozotocin-induced diabetes

Table 2 shows the blood-glucose levels before coil bonding and before animal sacrifice in DB group. All DB mice were hyperglycemic, with levels of blood glucose above 300mg/dl. The NG mice presented levels of blood glucose under 200 mg/dl (data not shown). The weight deviation was statistically insignificant during the experimental period for both NG and DB mice (data not shown).

The amount of tooth movement and the number of TRAP-positive cells were increased in diabetic mice

The results demonstrated a greater amount of tooth movement in DB mice after 6 and 12 days of mechanical loading when compared to NG mice at the same time points (Fig.2A). Indeed, the quantification of TRAP-positive osteoclasts was increased after day 6 and 12 in both NG and DB mice after orthodontic force (Fig.2B,C,D,E,F). However, the number of TRAP-positive osteoclasts was greater in DB mice (Fig.2B,F) than in NG mice (Fig.2B,D).

mRNA levels of CCL2, CCL5 and TNF- α were increased in DB mice

The data showed a significant increase in mRNA expression of CCL2, CCL5 and TNF- α in both groups after 12 hours and 3 days of mechanical loading (Fig.3). However, the DB mice presented greater levels of these cytokines at the same time point ($p < 0.05$) (Fig.3).

RANKL expression was increased in diabetic mice

The periodontal tissue of NG and DB mice showed significant increase of RANK, RANKL and MMP13 after 12 hours and 3 days of mechanical loading (Fig.4). Although there was no significant difference in mRNA levels of MMP13 and RANK ($p < 0.05$) (Fig. 4A, B), the levels of RANKL were significant higher in DB mice after 3 days of orthodontic force ($p < 0.05$) (Fig. 4C).

Expression of osteoblastic markers RUNX2, ALP and COL-1 were diminished in DB mice

The mRNA levels of ALP, COL-1 and RUNX2 were significant higher in both groups after 12 and 72 hours of mechanical loading when compared to control group ($p < 0.05$) (Fig.5). However, the levels of these three osteoblastic markers were significant lower in DB mice when compared to NG at the same time points ($p < 0.05$) (Fig.5). On the other hand, there was no significant difference in mRNA levels of OCN between NG and DB mice after 12 hours ($p < 0.05$). Nevertheless, the DB mice presented greater levels of OCN than the NG mice after 72 hours of orthodontic force ($p < 0.05$) (Fig.5).

DISCUSSION

Bone is a tissue in constant remodeling, due to a balance process that involves bone resorption and new bone formation (Krishnan & Davidovitch, 2006). However, diabetes disturbs this equilibrium (Liu *et al.*, 2006; He *et al.*, 2003), and this study, using a mice orthodontic tooth movement model, aimed to know how.

The results were in agreement with other studies that demonstrated that hyperglycemia increased the expression of CCL2 (Shanmugam *et al.*, 2003; Naguib *et al.*, 2004; Graves *et al.*, 2005; Sakallioğlu *et al.*, 2008), TNF- α (Guha *et al.*, 2000; Shanmugam *et al.*, 2003; Furudo *et al.*, 2003; Naguib *et al.*, 2004; Kayal *et al.*, 2007, Salvi *et al.*, 1997) and CCL5 (Herder *et al.*, 2008). These might be proved when the advanced glycation end products receptors were blockade, resulting in diminished levels of TNF- α , IL-6, MMP2, MMP3 and MMP9 (Lalla *et al.*, 2000). These disrupt cytokine networks could lead to a more persistent stimulus for leukocytes recruitment and to a more persistent inflammation (Naguib *et al.*, 2004). In this study, the higher levels of proinflammatory cytokines might explain the enhanced number of osteoclasts in DB mice.

The data also results revealed that there was a significant enhancement in the levels of RANKL in DB mice after 3 days of orthodontic force. This finding is in accordance with previous studies that demonstrated elevated levels of RANKL in DB mice (Kayal *et al.*, 2007) and DB patients (Duarte, 2007). The results supported the hypothesis that the upregulation of gene expression of RANKL, associated to an enhanced number of osteoclasts, might result in an increased bone resorption and consequently, a major orthodontic tooth movement. These findings were held up by the results of Hie *et al.* (2007) that demonstrated increased osteoclastic activity at an early stage of diabetes, which contributed to the bone loss in DB rats. In a fracture model (Kayal *et al.*, 2007), there was no significant difference in the level of MMP13 between DB and NG mice after 12 and 16 days, but it was 1.5-fold higher in the DB group after 22 days. However, the possibility of an enhanced level of MMP13 at later time points cannot be disqualified in our study.

Previous studies have reported that osteoblast/osteoclast interaction chiefly regulates bone remodeling (Yu *et al.*, 2004; Yano *et al.*, 2005; Boyce and Xing, 2008). This study demonstrated that *in vivo* diabetes might lead to a decreased

expression of osteoblastic markers, such as RUNX2, ALP and COL-1. This is in accordance with other studies that reported a decreased expression of RUNX2, ALP, COL-1, OCN, and other markers in the insulin-deficient, hyperglycemic DB animals (Lu *et al.*, 2003; Botolin and McCabe, 2006; Hie *et al.*, 2007, and Fowlkes *et al.*, 2008). Taken together, the results suggested that a diminished differentiation of osteoblasts in DB mice led to a reduction of inhibitory signals for osteoclasts, resulting in increased alveolar bone resorption and greater tooth movement.

This investigation demonstrated that diabetes increased bone resorption in alveolar bone and, consequently, enhanced tooth movement after 6 and 12 days of orthodontic force. Moreover, the number of TRAP-positive cells was increased in diabetic mice. This finding is supported by the results of a preceding study (Hie *et al.*, 2007) that reported higher levels of TRAP activity in a model of streptozotocin induced DB rats.

In conclusion, this study showed that DB mice present higher amount of tooth movement when compared to NG. This probably could be explained by the greater number of osteoclasts and the higher levels of TNF- α , CCL2, CCL5 and RANKL in DB groups. On the other hand, the levels of RUNX 2, ALP and COL-1 were diminished in DB, suggesting decreased osteoblastic differentiation. Altogether, this study suggested that uncontrolled diabetes alters alveolar bone turnover, leading to an increased bone resorption, and a greater orthodontic tooth movement.

Acknowledgments

We are grateful to Fundação de Amparo a Pesquisas do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) for financial support.

References:

Alberti KGMM, Zimmet PZ for the WHO Consultation. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO Consultation. *Diabetic Medicine* 1998; 15:539–553.

Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiet M. Chemokines are upregulated during orthodontic tooth movement. *J Interferon Cytokine Res.* 1999; 19(9):1047-1052.

Andrade I Jr, Silva TA, Silva GA, Teixeira AL, Teixeira MM. The role of tumor necrosis factor receptor type 1 in orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2007; Nov;86(11):1089-94.

Botolin S, McCabe LR. Chronic hyperglycemia modulates osteoblast gene expression through osmotic and non-osmotic pathways. *J Cell Biochem.* 2006; 99:411–24.

Boyce BF, Xing L. Bruton and Tec: new links in osteoimmunology. *Cell Metab.* 2008; 7:283-285.

Diniz SF, Amorim FP, Cavalcante-Neto FF, Bocca AL, Batista AC, Simm GE, Silva TA. Alloxan-induced diabetes delays repair in a rat model of closed tibial fracture. *Braz J Med Biol Res.* 2008; May;41(5):373-9.

Duarte PM, Neto JB, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Diabetes modulates gene expression in the gingival tissues of patients with chronic periodontitis. *Oral Dis.* 2007; Nov;13(6):594-9.

Fowlkes JL, Bunn RC, Liu L, Wahl EC, Coleman HN, Cockrell GE, Perrien DS, Lumpkin CK Jr, Thrailkill KM. Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and RUNX2-related osteogenic genes are down-regulated throughout osteogenesis in type 1 diabetes mellitus. *Endocrinology* 2008; Apr;149(4):1697-704.

Fuller K, Owens J, Chambers T. Macrophage inflammatory protein-1 alpha and IL-8 stimulate the motility but suppress the resorption of isolated rat osteoclast. *J Immunol.* 1995; 154:6065-6072.

Furudoi S, Yoshii T, Komori T. Balance of tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 in a buccal infection in a streptozotocin-induced diabetic rat model. *Cytokine* 2003; Nov 21;24(4):143-9.

Garlet TP, Coelho U, Repeke CE, Silva JS, Cunha Fde Q, Garlet GP. Differential expression of osteoblast and osteoclast chemmoattractants in compression and tension sides during orthodontic movement. *Cytokine* 2008; Jun;42(3):330-5.

Geerlings SE, Hopelman AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 26:259-265.

Graves DT, Naguib G, Lu H, Leone C, Hsue H, Krall E. Inflammation is more persistent in type 1 diabetic mice *J Dent Res.* 2005; Apr;84(4):324-8.

Guha M, Bai W, Nadler JL, Natarajan R. Molecular Mechanisms of Tumor Necrosis Factor a Gene Expression in Monocytic Cells via Hyperglycemia-induced Oxidant Stress-dependent and -independent Pathways. *J Biol Chem.* 2000; Jun 9;275(23):17728-39.

He H, Liu R, Desta T, Leone C, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes Causes Decreased Osteoclastogenesis, Reduced Bone Formation, and Enhanced Apoptosis of Osteoblastic Cells in Bacteria Stimulated Bone Loss. *Endocrinology* 2004; Jan;145(1):447-52.

Herder C, Illig T, Baumert J, Müller M, Klopp N, Khuseyinova N, Meisinger C, Poschen U, Martin S, Koenig W, Thorand B. RANTES/CCL5 gene polymorphisms, serum concentrations, and incident type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002. *Eur J Endocrinol.* 2008; May;158(5):R1-5.

Hie M, Shimono M, Fujii K, Tsukamoto I. Increased cathepsin K and tartrate-resistant acid phosphatase expression in bone of streptozotocin-induced diabetic rats. *Bone* 2007; Dec;41(6):1045-50.

Kayal RA, Tsatsas D, Bauer MA, Allen B, Al-Sebaei MO, Kakar S, Leone CW, Morgan EF, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Graves DT. Diminished bone formation during diabetic fracture healing is related to the premature resorption of cartilage

associated with increased osteoclast activity. *J Bone Miner Res.* 2007; Apr;22(4):560-8.

Krishnan V., Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006; 129:1-32.

Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Spessot A, Qu W, Kislinger T, Lu Y, Stern DM, Schmidt AM. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J Clin Invest.* 2000; Apr;105(8):1117-24.

Lappin DF, Eapen B, Robertson D, Young J, Hodge PJ. Markers of bone destruction and formation and periodontitis in type 1 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 2009; Aug;36(8):634-41.

Liu R., Bal H.S., Desta T., Krothapalli N., Alyassi M., Luan Q., Graves D.T. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Den Res.* 2006; 85(6):510-514.

Lu H, Kraut D, Gerstenfeld LC, Graves DT. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology* 2003; 144:346–352.

Maeda A, Soejima K, Bandow K, Kuroe K, Kakimoto K, Miyawaki S, Okamoto A, Matsuguchi T. Force-induced IL-8 from periodontal ligament cells requires IL-1beta. *J Dent Res.* 2007; 86:629-634.

Masella RS, Meister M. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006; Apr;129(4):458-68.

Mavragani M, Brudvik P, Selvig KA. Orthodontically induced root and alveolar bone resorption: inhibitory effect of systemic doxycycline administration in rats. *Eur J Orthod.* 2005; 27:215-25.

Mishima N, Sahara N, Shirakawa M, Ozawa H. Effect of streptozotocin-induced diabetes mellitus on alveolar bone deposition in the rat. *Arch Oral Biol.* 2002; Dec;47(12):843-9.

Naguib G, Al-Mashat H, Desta T, Graves DT. Diabetes Prolongs the Inflammatory Response to a Bacterial Stimulus Through Cytokine Dysregulation. *J Invest Dermatol.* 2004; Jul;123(1):87-92.

Räkel A, Sheehy O, Rahme E, LeLorier J. Osteoporosis among patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes & Metabolism* 2008; 34(3): 193–205.

Sakallioğlu EE, Ayas B, Lütfoğlu M, Keleş GC, Açıkgöz G, Firatlı E. Gingival levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in diabetes mellitus and periodontitis: an experimental study in rats. *Clin Oral Investig*. 2008; Mar;12(1):83-9.

Salvi GE, Yalda B, Collins JG, Jones BH, Smith FW, Arnold RR, Offenbacher S. Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Periodontol*. 1997; Feb;68(2):127-35.

Schwartz, A.V. Diabetes Mellitus: Does it Affect Bone? *Calcif Tissue Int*. 2003; 73:515–519.

Shanmugam N, Reddy MA, Guha M, Natarajan R. High Glucose–Induced Expression of Proinflammatory Cytokine and chemokine Genes in Monocytic Cells. *Diabetes* 2003; May;52(5):1256-64.

Suzuki K, Kurose T, Takizawa M, Maruyama M, Ushikawa K, Kikuyama M, Sugimoto C, Seino Y, Nagamatsu S, Ishida H. Osteoclastic function is accelerated in male patients with type 2 diabetes mellitus: the preventive role of osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin (OCIF/OPG) on the decrease of bone mineral density. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; May;68(2):117-25.

Verhaeghe J, Van Herck E, van Bree R, Moermans K, Bouillon R. Decreased osteoblast activity in spontaneously diabetic rats. In vivo studies on the pathogenesis. *Endocrine* 1997; Oct;7(2):165-75.

Verna C, Dalstra M, Melsen B. The rate and the type of orthodontic tooth movement is influenced by bone turnover in a rat model. *Eur J Orthod*. 2000; Aug;22(4):343-52.

Yano S, Mentaverri R, Kanuparthi D, Bandyopadhyay S, Rivera A, BROWN EM, Chattopadhyay N. Functional expression of beta-chemokine receptors in osteoblasts: role of RANTES in osteoblasts and regulation of its secretion by osteoblasts and osteoclasts. *Endocrinology* 2005; 146:2324-2335.

Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2004; 19:2065–2077.

Zykova SN, Jenssen TG, Berdal M, Olsen R, Myklebust R, Seljelid R. Altered cytokine and nitric oxide secretion in vitro by macrophages from diabetic type II-like db/db mice. *Diabetes* 2000; 49:1451-1458.

FIGURE LEGENDS

Table 1. Primer sequences and reaction properties.

Table 2. Blood-glucose levels before coil bonding and before sacrifice on diabetic mice (mg/dl).

Figure 1. Occlusal view of a Ni-Ti open coil spring placed between the upper right first molar and the upper incisors. The orthodontic force applied was 10g.

Figure 2. (A-G) (A) Time course of changes in the amount of tooth movement between normoglycemic and diabetic mice. It was morphometrically evaluated by measuring the distance between the cementum-enamel-junction's (CEJ's) from the first molar and the second molar. Normoglycemic mice (dotted line) and diabetic mice (black line). (B) Number of TRAP-positive osteoclasts. The number of TRAP-positive cells on the pressure side of the distobuccal root of the first molar during orthodontic tooth movement in the normoglycemic mice (Black bars), and diabetic mice (Gray bars). The total number of positive cells in the distobuccal root was determined in 5 consecutive microscopic fields (x 40) and each field had an area of 0.12 mm². (C-G) Vertical sections (4 μ m thickness) of the periodontium around the distobuccal root of the first molar stained with TRAP. (C) Normoglycemic Control (without mechanical loading). No TRAP-positive cells are visible at this moment. (TRAP activity was found normal on the diabetic demonstrating the physiological distal tooth movement). (D) Normoglycemic experimental group (12 days after strain), the TRAP- activity enhanced at the DB and a hyalinized area developed in the medial part of the mesial LP. (E) Diabetic Control (without application of orthodontic force). No TRAP-positive cells are visible at this moment. (F) Diabetic experimental group (12 days after mechanical loading). The number of TRAP- positive cells is greater in this group than in the normoglycemic, and it showed a greater MB resorption area. Note the higher hyalinized area developed in the medial part of the mesial LP. (G) Higher view of the

identified area in F. The number of osteoclasts is enhanced in mesial bone of diabetic group after application of orthodontic force. TRAP-positive osteoclasts are shown in blue arrows. MB, mesial alveolar bone; DB, distal alveolar bone; PL, periodontal ligament; R, root. The black arrows indicate the direction of tooth movement. Bar = 10 μ m. The results represent the mean of 5 sections per animal. These mice were killed before and 6 and 12 days after the experiment were initiated. There were 5 animals in each group on each day. The data were expressed as the mean \pm SEM. *P < 0.05 compared control group to experimental group (after 6 or 12 days of orthodontic force). #P < 0.05 compared normoglycemic mice experimental groups and diabetic mice experimental groups, at the same moment. One-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test.

Figure 3. mRNA expression of CCL2 (A), CCL5 (B) and TNF- α (C) in the normoglycemic (NonDB) and diabetic (DB) mice periodontium after 12 hours and 3 days of mechanical loading. The data were expressed as the mean \pm SEM. *P < 0.05 compared control group to experimental group (12 hours or 3 days of orthodontic force). #P < 0.05 compared normoglycemic mice experimental groups and diabetic mice experimental groups, at the same moment. One-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test.

Figure 4. mRNA expression of osteoclastic activity markers MMP 13 (A), RANK (B) and RANKL (C) in the normoglycemic (NonDB) and diabetic (DB) mice periodontium after 12 hours and 3 days of mechanical loading. There were 5 animals in each group on each day. The data were expressed as the mean \pm SEM. *P < 0.05 compared control group to experimental group (after 12 hours or 3 days of orthodontic force). #P < 0.05 compared normoglycemic mice experimental groups and diabetic mice experimental groups, at the same moment. One-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test.

Figure 5. mRNA expression of osteoblastic markers ALP (A), COL-I (B), RUNX2 (C), OCN (D) in the mice periodontium (normoglycemic and diabetic) after 12

hours and 72 hours of mechanical loading. The data were expressed as the mean \pm SEM. *P < 0.05 compared control group to experimental group (after 12 or 72 hours of orthodontic force). #P < 0.05 compared normoglycemic and diabetic experimental groups, at the same moment. One-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test.

Table 1.

Target	Sense and anti-sense sequences	At(°C)	Mt(°C)	bp
CCL2	AGGAAGATCTCAGTG CAGAG AGTCTTCGGAGTTTGCCTTTG	62	82	177
CCL5	TTCCCTGTCATCGCTTGCTCT CGGATGGAGATGCCGATTTT	60	81	433
CCR5	TTCCCTGTCATCGCTTGCTCT CGGATGGAGATGCCGATTTT	60	81	433
RUNX2	AACCACAGAACCACAAGTGCG AAATGACTCGGTTGGTCTCGG	58	80	119
OCN	AAGCCTTCATGTCCAAGCAGG TTTGTAGGCGGTCTTCAAGCC	60	78	170
OPG	GGAACCCCAGAGCGAAATACA CCTGAAGAATGCCTCCTCACA	57	77	225
RANKL	CAGAAGATGGCACTCACTGCA CACCATCGCTTTCTCTGCTCT	65	73	203
MMP-13	AGAGATGCGTGGAGAGTCGAA AAGGTTTGGAATCTGCCCAGG	65	85	162
β -actin	ATGTTTGAGACCTTCAACA CACGTCAGACTTCATGATGG	56	75	495
COL-1	AATCACCTGCGTACAGAACGG CAGATCACGTCATCGCACAAC	62	84	114
ALP	ATGAGGTCACATCCATCCTGC TCACAATGCCACGGACTT	60	83	61

At: annealing temperature; Mt: Melting temperature; bp: base pairs of amplicon size.

Table 2.

Blood Glucose (mg/dl)		
Time (days)	Before coil bonding	Before Sacrifice
6	451 \pm 99.87	394 \pm 105.36
12	471 \pm 92.97	410 \pm 111.47

Figure 1

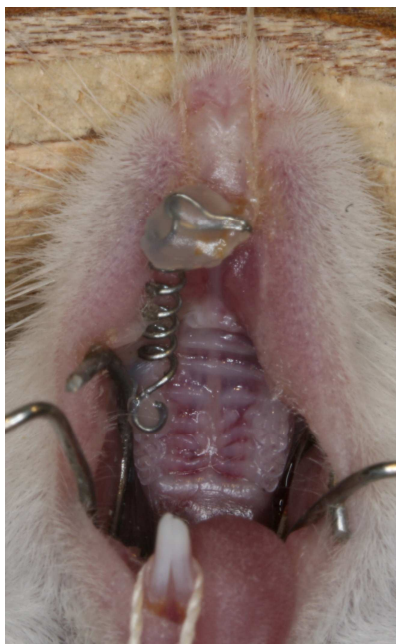
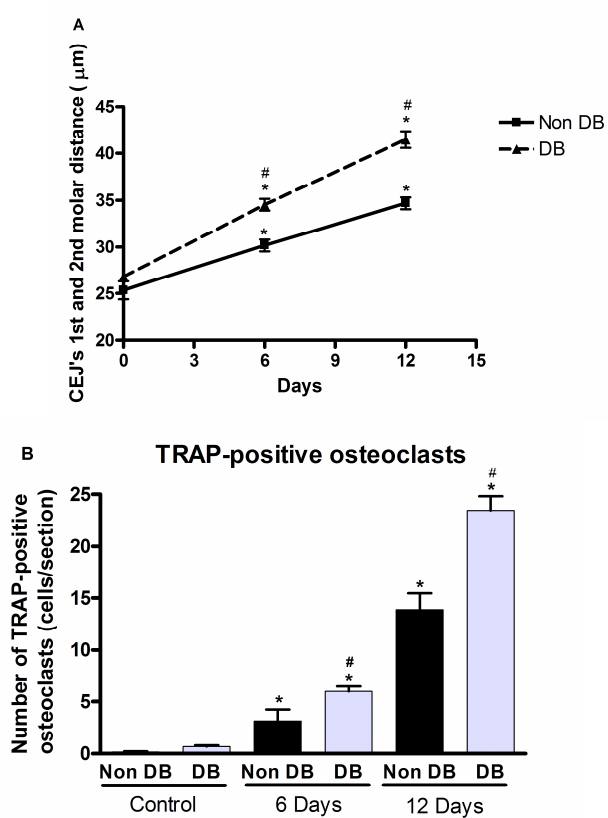


Figure 2



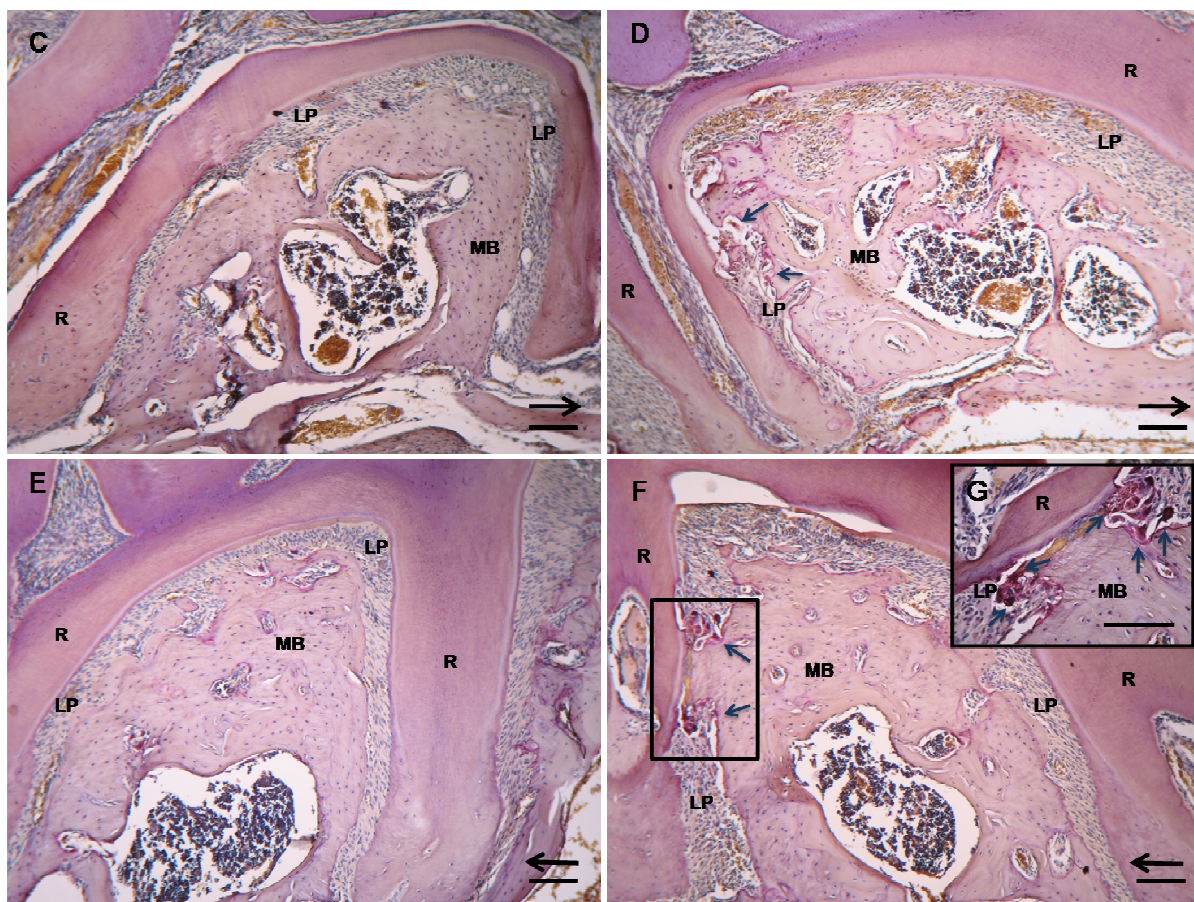


Figure 3

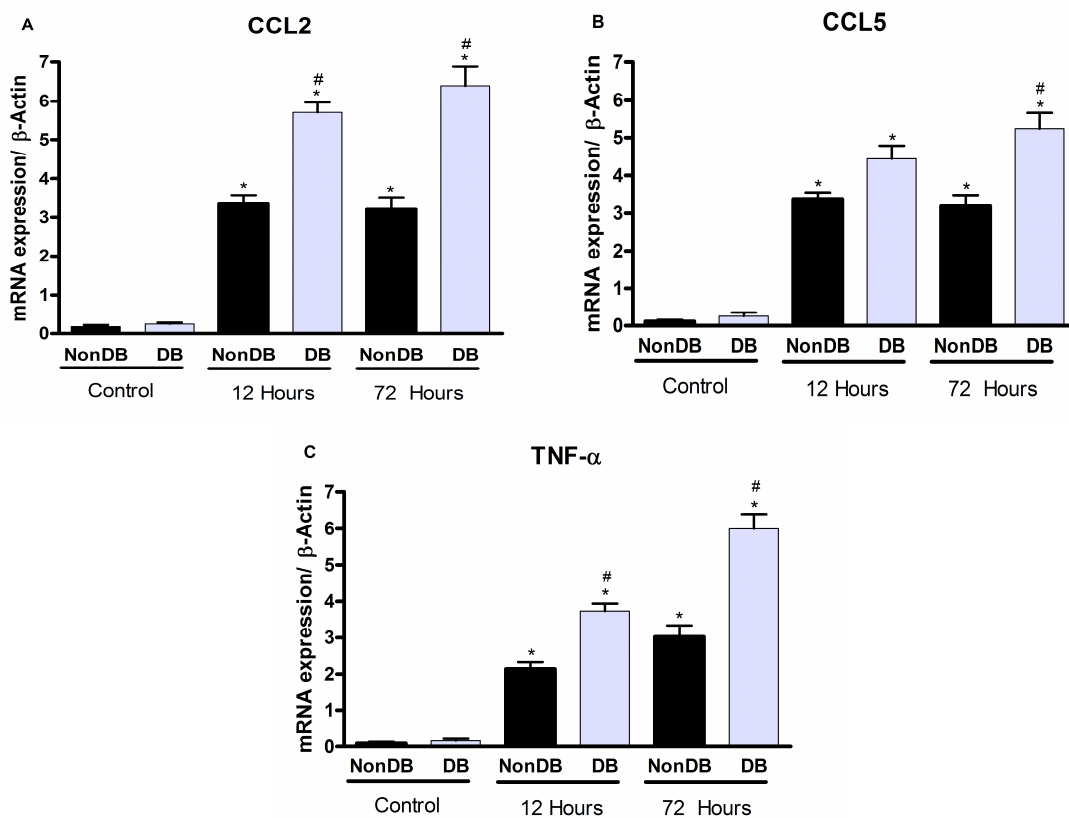


Figure 4

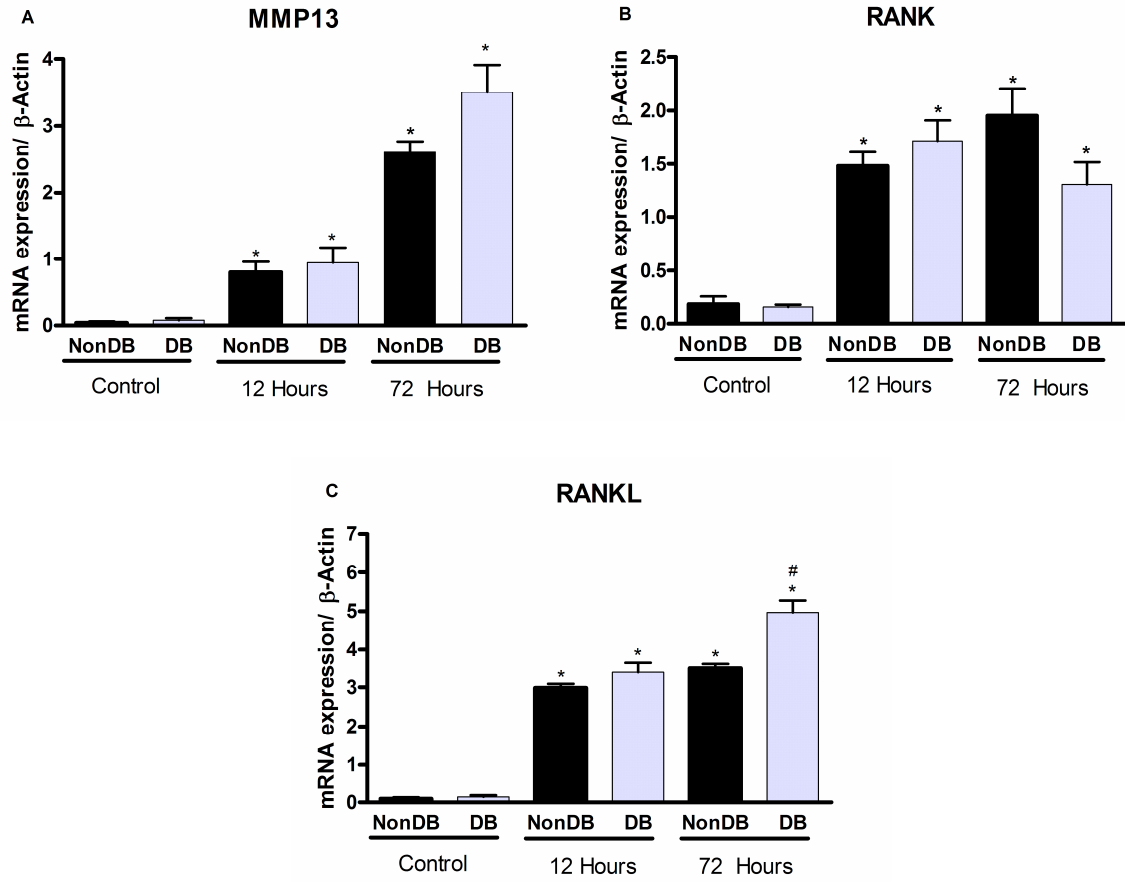
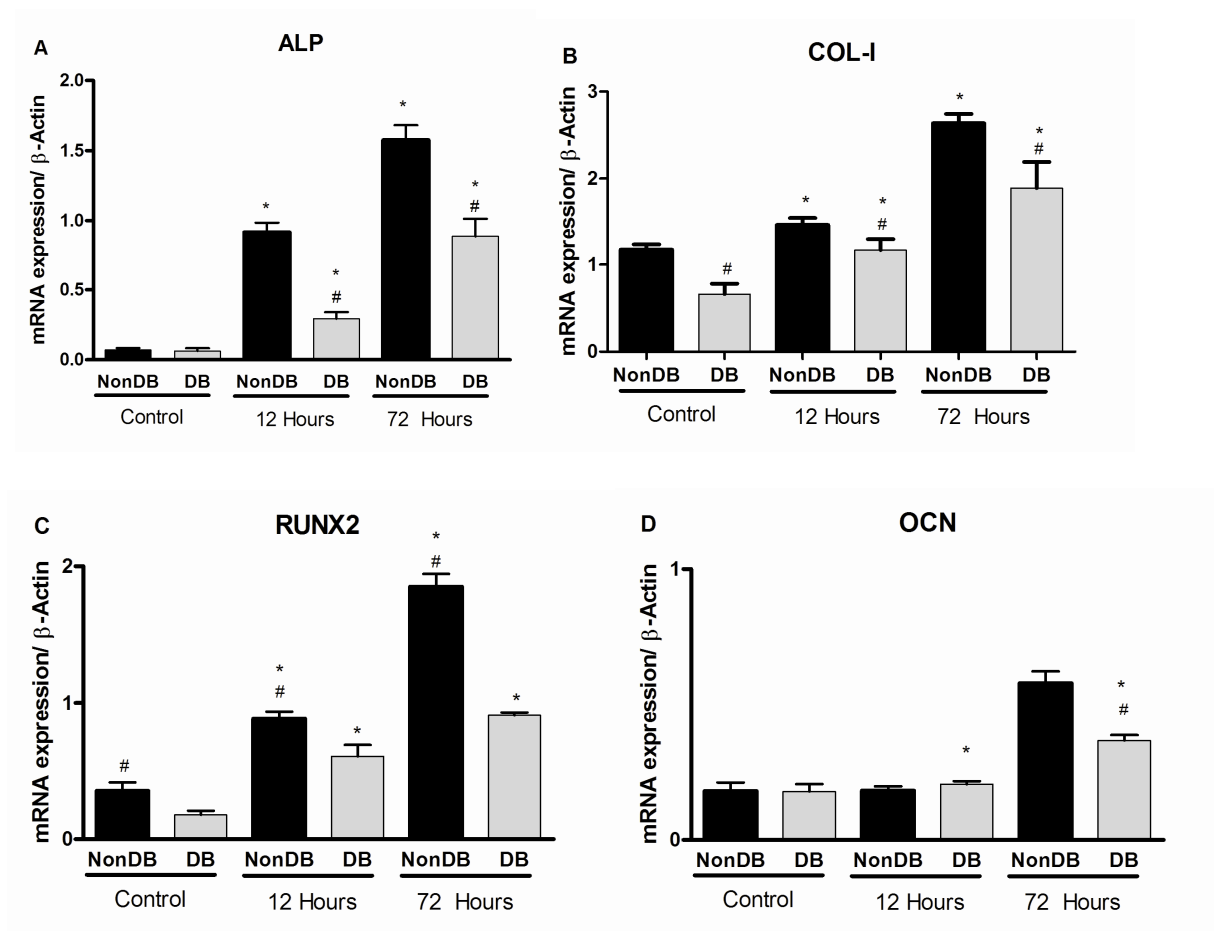


Figure 5



7. ANEXOS



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 135/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Efeito da diabetes mellitus na movimentação dentária ortodôntica**", que tem como responsável(is) **Tarcília Aparecida da 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 **24/ 09/2008**.

Este certificado expira-se em **24/ 09/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 135/2008**, related to the project entitled "**Effect of diabetes mellitus on orthodontic tooth movement**", under the supervisors of **Tarcília Aparecida da 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 **September 24, 2008**.

This certificate expires in **September 24, 2013**.

Belo Horizonte, 30 de Setembro de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)