MARCELLA GOETZ MORO

**Avaliação do efeito do antagonismo do receptor de leucotrienos na modulação da
periodontite experimental em ratos**

São Paulo

2019

MARCELLA GOETZ MORO

**Avaliação do efeito do antagonismo do receptor de leucotrienos na modulação da
periodontite experimental em ratos**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
da Universidade de São Paulo, pelo Programa
de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas
para obter o título de Doutor em Periodontia.

Área de concentração: Periodontia

Orientadora: Profa. Dra. Marinella Holzhausen
Caldeira

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Nicolás
Muscará

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Moro, Marcella Goetz.

Avaliação do efeito do antagonismo do receptor de leucotrienos na modulação da periodontite experimental em ratos / Marcella Goetz Moro ; orientador Marinella Holzhausen Caldeira; co-orientador Marcelo Nicolás Muscará. -- São Paulo, 2019.

112 p. : tab., fig., graf. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Periodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Antagonistas de leucotrienos. 2. Leucotrieno D4. 3. Leucotrieno B4. 4. Ratos. I. Caldeira, Marinella Holzhausen. II. Muscará, Marcelo Nicolás. III. Título.

Moro MG. Avaliação do efeito do antagonismo do receptor de leucotrienos na modulação da periodontite experimental em ratos. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Periodontia.

Aprovado em: 25/04/2019

Banca Examinadora

Profa. Dra. Luciana Saraiva

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco

Instituição: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Julgamento: Aprovada

Prof. Dr. Renato Araujo Prates

Instituição: Universidade Nove de Julho

Julgamento: Aprovada

“Dedico este trabalho, primeiramente, aos meus pais que, com muito carinho e apoio, nunca mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Dedico também às minhas irmãs, avós e companheiro. E, por fim, não menos importante, aos meus orientadores Marinella, Marcelo e Gilson e a todas as amizades que construí no decorrer desta engrandecedora caminhada.”

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem Ele nada é possível.

À minha família, meu pai Nestor e mãe Evelise, minhas irmãs Mariana e Marjorie, meu cunhado João e minha vó Lourdes, pelo incentivo e apoio dado durante esta trajetória, fazendo com que o caminho percorrido tenha sido menos árduo.

Ao meu namorado Gustavo Trevizoli, pelo apoio e incentivo em cada passo dado, além de toda a paciência por ele concedida em diferentes momentos.

À minha orientadora Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira, a qual tão bem me acolheu e sempre acreditou no meu trabalho, me dando força para crescer e ser cada vez melhor.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará, o qual disponibilizou seu laboratório para toda execução do trabalho, além da transmissão de todo o conhecimento e experiência.

À querida Simone Aparecida Teixeira, que esteve do meu lado em todos os momentos na execução dos experimentos, e acabou se tornando uma grande amiga.

Ao Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio, o qual sempre se mostrou muito disposto a ajudar, sendo o responsável por toda a parte histológica do trabalho.

Ao Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco, o qual me ajudou no desenvolvimento inicial do projeto e, mesmo de longe, esteve todo o momento me dando suporte e incentivo.

À minha colega de laboratório Flavia Neto de Jesus, que me ensinou com todo carinho e paciência o modelo a ser desenvolvido.

Às alunas de Iniciação Científica Marília Dantas e Maria Mariante que fizeram um excelente trabalho, participando ativamente do desenvolvimento das metodologias.

À dedicada Karla Feitosa, a qual nunca hesitou ajudar nos momentos em que necessitei.

A toda equipe do Laboratório de Farmacologia Bioquímica dos radicais livres, inflamação e dor do ICB-USP, professora Soraia, Antonio, Anderson, Mayrine, Charlis, Mariana, Leonardo, Carolina, Larissa, Cauane, Isabela, Sylvia, Andreia, Geovana, Julia, Leandro, Caique, Nycole, Mariana, Edinei, Gabriel, Sibebe e Tainá, por estarem do meu lado em todos os momentos, tornando os dias mais alegres.

Agradeço aos professores Wothan Tavares de Lima, Carolina Munhoz, Telma Maria Tenório Zorn, Eliana Akamine, Chao Yun Irene Yan, Luciana Lopes por gentilmente me cederem seus laboratórios para análises e testes específicos.

Aos meus grandes amigos Maria Luisa Silveira Souto e Emanuel Rovai, pela amizade e companheirismo durante o desenvolvimento e execução desse trabalho.

Aos meus professores e colegas do programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, na área de Periodontia, professores Claudio Pannuti, Luciana Saraiva, Cristina Villar, Giuseppe Romito e João Batista, colegas Leticia, Bruno, Emmanuel, Lucas, Tomaz, Carlos Benitez, Marilia, Vanessa, Marcela, Bruna, Carlos Rubio, Laís, Estela, Alexandre, Marcelo, Vanessa Marui, Thais, Vitor, Monica e Gloria, por me proporcionarem amplo conhecimento e experiências grandiosas.

Agradeço a todos os funcionários da USP, principalmente a Marilia, Cecilia, Catia, Carlos e Alessandra, por nos acolherem como “filhos”, ajudando em todos os processos burocráticos necessários.

Agradeço ainda a todos os meus amigos da especialização de Periodontia, Juliana, Gabriela, Catarina, Claudia, Yasmin, Eduardo, Ricardo, Ana Paula, Kaue, Jonleno e Thalwylla, bem como aos professores que não fazem parte do programa de pós-graduação da USP, professores Dacio e Carlos Eduardo Mafra.

Por fim, não menos importante, agradeço aos meus colegas de trabalho, Gislene, Veronica, Giuliana, Ana Carolina, Paulo, Caio, Sergio, Eliane, Hilana, Renato, Leticia e Telma.

Aos animais utilizados nesta pesquisa, meu profundo respeito e agradecimento, bem como aos responsáveis pelo biotério do ICB-USP.

Agradeço também às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro prestado ao projeto.

“Não existe um caminho para a felicidade. A felicidade é o caminho.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

Moro MG. Avaliação do efeito do antagonismo do receptor de leucotrienos na modulação da periodontite experimental em ratos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Corrigida.

Na doença periodontal, quando ativada a resposta imunoinflamatória do hospedeiro, os leucotrienos (LTs) participam do processo de lesão tecidual pela quimiotaxia de leucócitos e ativação osteoclástica. O uso de antagonista do receptor de LTs está relacionado com a expressão de moléculas pró-inflamatórias e osteoclastogênese. No entanto, suas implicações na progressão da DP ainda não foram estudadas. Sendo assim, o trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de antagonista do receptor de LTs (Montelucaste – MT) na modulação da periodontite experimental induzida pelo método da ligadura em ratos. Ratos Wistar machos (6–8 semanas, 200-250 gramas) foram divididos (12 animais/ grupo) nos seguintes grupos experimentais: Sham – sem ligadura/ sem tratamento (carboximetilcelulose – CMC 0,5%, via gavagem); Periodontite – com ligadura/ sem tratamento; MT 10 – com ligadura/ com tratamento (Montelucaste 10 mg/kg/dia, via gavagem); MT 30 – com ligadura/ com tratamento (Montelucaste 30 mg/kg/dia, via gavagem). Após período experimental (7, 14 e 21 dias) os animais foram submetidos à eutanásia e as hemimandíbulas retiradas para realização da análise de perda óssea alveolar (POA) macroscópica, análise histológica (H&E – histopatológico; picrosirius – colágeno), ELISA (LTB4), atividade de mieloperoxidase (MPO), avaliação de marcadores do estresse oxidativo (glutathione, expressão de proteínas carboniladas e proteínas modificadas por 4HNE) e expressão gênica de receptor do ativador de fator nuclear kappa B (RANK), ligante de RANK (RANKL), osteoprotegerina (OPG), fator de transcrição relacionado ao runt 2 (RUNX2), Colágeno tipo I, receptor de LT 1 (BLT1), receptor 1 de cisteinil-leucotrieno (CisLTR1), LTA4 hidrolase (LTA4H) e LTC4 sintase (LTC4S) (ANOVA, pós teste Sidak, $p < 0,05$). O grupo Periodontite apresentou maior POA em comparação ao grupo Sham nos três períodos experimentais avaliados ($p < 0,05$). MT passou a ser efetivo na redução da POA a partir do 14º dia ($p < 0,05$). Ao analisar a degradação de colágeno, no 21º dia os grupos Periodontite e MT apresentaram maior perda em comparação ao grupo Sham ($p < 0,05$). Não foram encontradas diferenças estatísticas quanto à expressão de LTB4 pelo teste ELISA ($p > 0,05$), bem como na avaliação de marcadores de estresse oxidativo, independente do teste realizado ($p > 0,05$). Em relação à MPO, o grupo Periodontite apresentou valores estatisticamente maiores em comparação ao grupo Sham nos três períodos

experimentais ($p < 0,05$). Nos períodos de 7 e 14 dias (30 mg/kg) o grupo MT promoveu diminuição da infiltração granulocítica em comparação ao grupo Periodontite ($p < 0,05$), sem diferença em relação ao grupo Sham ($p > 0,05$). Observou-se que a expressão de colágeno tipo I não apresentou diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$), e que o grupo MT 30 apresentou maior expressão de RUNX2 em comparação aos grupos Sham e Periodontite ($p < 0,05$). No grupo MT 30 houve uma redução significativa da expressão de LTA₄H, BLT1 e LTC₄S ($p < 0,05$). A expressão de CysLTR1 não diferiu entre os grupos ($p > 0,05$). Conclui-se que o uso de antagonista de receptor de LTs foi efetivo na redução do infiltrado granulocítico e da POA, com aumento de RUNX2.

Palavras-chave: Antagonistas de leucotrieno. Leucotrieno D₄. Leucotrieno B₄. Ratos.

ABSTRACT

Moro MG. Cysteinyl leukotriene receptor antagonism modulates experimental periodontitis in rats [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Corrigida.

In periodontal disease (PD), by activation of host immune-inflammatory response, leukotrienes (LTs) participate in the process of tissue damage by leukocyte chemotaxis and osteoclastic activation. Cysteinyl LT receptor activation is associated with the expression of proinflammatory molecules and osteoclastogenesis. However, its implications on PD progression have not been studied. The present study evaluated the effect of cysteinyl LT receptor antagonism (Montelukast – MT) on experimental periodontitis induced by ligature in rats. Male Wistar rats (6-8 weeks, 200-250 grams) were randomly divided into four groups (12 animals/ group): Sham – non-ligated group, no treatment (carboxymethylcellulose - 0.5% CMC via gavage); Periodontitis – ligature group; MT group – ligature placed and systemic administration of two different doses of MT (10 or 30 mg/kg/day, MT 10 and MT 30, respectively). The amount of alveolar bone loss (ABL), as well as the histological analysis of collagen content and inflammatory markers, myeloperoxidase (MPO) activity, and protein expression of LTB₄, and gene expression of Collagen I, BLT1, CysLTR1, LTA₄H, LTC₄S, and bone metabolism and oxidative stress markers were determined at 7, 14 and 21 days (ANOVA, post-test Sidak, $p < 0.05$). Periodontitis group presented higher ABL compared to Sham group in the three experimental periods ($p < 0.05$). MT significantly reduced the expression of LTA₄H, BLT1 and LTC₄S ($p < 0.05$), and was effective in reducing ABL at 14 and 21 days ($p < 0.05$), with no significant effects on gingival collagen content and expression of oxidative stress markers ($p > 0.05$). MT significantly increased RUNX2 expression and decreased gingival MPO at 7 and 14 days ($p < 0.05$). It was concluded that leukotriene receptor antagonism by MT was effective in reducing granulocytic infiltrate and ABL, with increased RUNX2 expression.

Keywords: Leukotriene Antagonists. Leukotriene D₄. Leukotriene B₄. Rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Etiopatogênese da doença periodontal.....	38
Figura 2.2 – Cascata do ácido araquidônico.....	40
Figura 2.3 – Vias de atuação do Montelukaste.....	49
Figura 2.4 – Mecanismo de ação do Montelukaste.....	49
Figura 4.1 – Desenho do estudo.....	59
Figura 4.2 – Delimitação da área de perda óssea alveolar (em mm ²) entre a JAC e a crista óssea alveolar do primeiro molar inferior esquerdo.....	60
Figura 4.3 – Desenho esquemático mostrando os cinco campos da secção ao redor do elemento dental que foram selecionados para análise de degradação de colágeno por meio da coloração de picrosírius.....	61
Figura 5.1 – Efeito de Montelukaste sobre a perda óssea alveolar secundária à periodontite induzida pelo método da ligadura em ratos em função do tempo e da dose.....	69
Figura 5.2 – Cortes histológicos referente ao grupo Sham.....	71
Figura 5.3 – Cortes histológicos referente ao grupo Periodontite.....	72
Figura 5.4 – Cortes histológicos referente ao grupo Montelukaste.....	72
Figura 5.5 – Efeito de Montelukaste sobre a degradação de colágeno por meio da coloração de picrosírius em cortes histológicos na região de primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos em função do tempo e da dose.....	73

Figura 5.6 – Efeito de Montelukaste sobre a atividade de mieloperoxidase a partir da coleta de tecido gengival adjacente ao primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos em função do tempo e da dose.....	74
Figura 5.7 – Efeito de Montelukaste sobre a formação de radicais livres por meio da dosagem de glutathione a partir da coleta de tecido gengival adjacente ao primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos no período experimental de 14 dias.....	75
Figura 5.8 – Efeito de Montelukaste sobre a expressão de proteínas carboniladas a partir do plasma sanguíneo.....	76
Figura 5.9 – Efeito de Montelukaste sobre a expressão de proteínas modificadas por 4HNE no tecido gengival removido na região do primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos no período experimental de 14 dias.....	77
Figura 5.10 – Efeito de Montelukaste sobre expressão gênica de Colágeno tipo I a partir da coleta de tecido gengival na região de primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos no período experimental de 14 dias, na dose de Montelukaste de 30 mg/kg/dia.....	79
Figura 5.11 – Efeito de Montelukaste sobre expressão gênica de RUNX2 a partir da coleta do ligamento periodontal e osso alveolar na região de primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos no período experimental de 14 dias.....	79
Figura 5.12 – Efeito de Montelukaste sobre expressão gênica de RANK a partir da coleta do ligamento periodontal e osso alveolar na região de primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos no período experimental de 14 dias.....	80

Figura 5.13 – Efeito de Montelukaste sobre expressão gênica de RANKL a partir da coleta do ligamento periodontal e osso alveolar na região de primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos no período experimental de 14 dias.....	80
Figura 5.14 – Efeito de Montelukaste sobre expressão gênica de OPG a partir da coleta do ligamento periodontal e osso alveolar na região de primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos no período experimental de 14 dias.....	81
Figura 5.15 – Efeito de Montelukaste sobre expressão gênica de LTA4H a partir da coleta de tecido gengival, bem como ligamento periodontal e osso alveolar na região de primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos no período experimental de 14 dias.....	81
Figura 5.16 – Efeito de Montelukaste sobre expressão gênica de BLT1 a partir da coleta de tecido gengival, bem como ligamento periodontal e osso alveolar na região de primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos no período experimental de 14 dias.....	82
Figura 5.17 – Efeito de Montelukaste sobre expressão gênica de LTC4S a partir da coleta de tecido gengival, bem como ligamento periodontal e osso alveolar na região de primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos no período experimental de 14 dias.....	82
Figura 5.18 – Efeito de Montelukaste sobre expressão gênica de CysLTR1 a partir da coleta de tecido gengival, bem como ligamento periodontal e osso alveolar na região de primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos no período experimental de 14 dias.....	83

LISTA DE QUADRO

Quadro 4.1 – Sequência dos primers utilizados nos ensaios de PCR em tempo real.....	67
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	American Academy of Periodontology
AC	Anticorpo
AINÉ	Antiinflamatório não esteroideal
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenilato-ciclase
BLT	Receptor de leucotrieno
BSA	Albumina de soro bovino
cAMP	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CD14	Grupamento de diferenciação 14
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
Cis-LT	Cisteinil-leucotrieno
CisLTR	Receptor de cisteinil-leucotrieno
CMC	Carboximetilcelulose
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase
Ct	“threshold cycle” (ciclo onde a reação cruza o limiar de detecção)
DAB	3,3' Diaminobenzidina tetrahidrocloreto
DEPC	Dicarbonato de dietila
DP	Doença Periodontal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
DNPH	2,4-dinitro fenil hidrazina
DNP	2,4-Dinitrofenol
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTNB	5,5-dithiobis, 2-ácido nitrobenzoico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

FDA	Administração de comidas e remédios
FLAP	Proteína de ativação acessória de 5-LO
g	Grama
g	Força gravitacional
GSH	Glutationa
GSSG	Dissulfureto de glutathione
h	Hora
HAT	Enzima acetiltransferase de histona
HCl	Ácido clorídrico
H&E	Hematoxilina e Eosina
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase
HRP	Peroxidase de raiz forte
ICB	Instituto de Ciências Biológicas da Universidade
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon-gama
IP	Intraperitoneal
JAC	Junção ameloementária
kg	Quilograma
LP	Ligamento periodontal
LPS	Lipopolissacarídeos
LT	Leucotrieno
LTA4H	Leucotrieno A4-hidrolase
LTC4S	Leucotrieno C4-sintase
M	Molar
mA	miliampére
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MCP-1	Proteína quimioatratadora de monócito-1
M-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos
mg	Miligrama
min	Minuto
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinase de matriz

MPO	Mieloperoxidase
MRH	Modulador da Reposta do Hospedeiro
MT	Montelukaste
n	Número
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NFATc1	Fator nuclear de células T ativadas c1
NF-κB	Fator nuclear kappa B
ng	Nanograma
NHANES	National Health and Nutrition Examinations Surveys
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico
OA	Osso alveolar
OPG	Osteoprotegerina
p	Probabilidade de significância
PAF	Fator ativador de plaqueta
PAMP	Padrão molecular associado com patógenos
PB	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PBST	Tampão fosfato salino com 0,05% de Tween 20
PCS	Profundidade clínica de sondagem
PDE	Fosfodiesterases dos nucleótidos cíclicos
PG	Prostaglandina
pg	Picograma
pH	Concentração de cátions hidrônio presentes em um meio
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
PMSF	Fluoreto de fenilmetano sulfonil
POA	Perda óssea alveolar
PPARα	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma nuclear-α
PRR	Receptor de reconhecimento padrão
PVDF	Fluoreto de polivinilideno

P2Y	Receptor purinérgico
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RANTES	Regulada sob Ativação, Expressa e Secretada por Células T Normais
RANK	Receptor do ativador de fator nuclear kappa B
RAKL	Ligante do receptor do ativador de fator nuclear kappa B
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcrição reversa
RUNX2	Fator de Transcrição Relacionado ao Runt 2
s	Segundo
SDS	Lauril sulfato de sódio
SP	São Paulo
TBS	Tampão salino de Tris
TCA	Ácido tricloacético
TG	Tecido gengival
Th	Linfócito T auxiliar
T _m	Temperatura de fusão (melting)
TMB	3,3',5,5' tetrametilbenzidina
TNB	Ácido 5'-tio-2-nitrobenzóico
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TPB	Tratamento periodontal básico
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
v	Volume
V	Voltagem
4HNE	4-hidroxinonenal
5-HETE	Ácido 5-hidroxi-eicosatetraenóico
5-HPETE	Ácido 5-hidroperoxi-eicosatetraenóico
5-LO	5-lipoxigenase
μ L	Microlitro
μ m	Micrometro
μ M	Micromolar

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
Ca ²⁺	cálcio
κ	kappa
α	alfa
β	beta
γ	gama
±	mais ou menos
<	menor que
>	maior que
º	indicador ordinal
°C	graus Celsius
x	vezes
-	menos
Δ	delta
#	cerquilha ou antífen
*	asterisco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	29
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	33
2.1	DOENÇA PERIODONTAL.....	33
2.1.1	Definição e epidemiologia.....	33
2.1.2	Etiopatogênese.....	35
2.2	VIAS DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO.....	39
2.2.1	Lipoxigenase – Leucotrienos e seu papel na inflamação e na doença periodontal.....	39
2.3	TERAPIA PERIODONTAL COM MODULADORES DA RESPOSTA DO HOSPEDEIRO.....	43
2.4	MONTELUCASTE E SEUS MECANISMOS DE AÇÃO.....	47
2.4.1	Segurança clínica, farmacodinâmica e farmacocinética.....	50
2.4.2	Papel anti-inflamatório e antioxidante da inibição de leucotrienos.....	50
2.4.3	Efeito da inibição de leucotrienos sobre o metabolismo ósseo.....	52
3	PROPOSIÇÃO.....	55
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
4.1	ANIMAIS UTILIZADOS NO ESTUDO.....	57
4.2	INDUÇÃO DA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR PELO MÉTODO DE LIGADURA.....	57
4.3	DIVISÃO DOS GRUPOS, ADMINISTRAÇÃO DO TRATAMENTO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	58
4.4	ANÁLISES.....	58
4.4.1	Análise de perda óssea alveolar macroscópica.....	59
4.4.2	Análise histopatológica.....	60
4.4.3	Análise histológica da degradação de colágeno por meio da coloração por picrosírius.....	60
4.4.4	Produção de LTB4 no plasma sanguíneo.....	62
4.4.5	Atividade de mieloperoxidase no tecido gengival.....	62
4.4.6	Atividade de glutathione no tecido gengival.....	63
4.4.7	Análise da expressão de proteínas carboniladas pelo método de Slot Blot e de proteínas modificadas por 4HNE por Western Blot.....	63
4.4.8	Proteínas carboniladas.....	64
4.4.9	Análise da expressão de proteínas modificadas por 4HNE (4-hidroxinonenal) pela técnica de Western blot.....	64
4.4.10	Expressão gênica tecidual de fatores associados com o metabolismo ósseo e receptores específicos de LTB4 e Cis-LTs e seus precursores (PCR real time).....	65

4.5	CÁLCULO AMOSTRAL.....	67
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68
5	RESULTADOS.....	69
5.1	ANÁLISE DE PERDA ÓSSEA ALVEOLAR MACROSCÓPICA.....	69
5.2	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	70
5.3	ANÁLISE HISTOLÓGICA DA DEGRADAÇÃO DE COLÁGENO.....	73
5.4	PRODUÇÃO DE LTB4 NO PLASMA SANGUÍNEO.....	73
5.5	ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE NO TECIDO GENGIVAL.....	74
5.6	ATIVIDADE DE GLUTATIONA NO TECIDO GENGIVAL.....	75
5.7	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS CARBONILADAS.....	75
5.8	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS MODIFICADAS POR 4HNE.....	76
5.9	EXPRESSÃO GÊNICA TECIDUAL DE FATORES ASSOCIADOS COM O METABOLISMO ÓSSEO E RECEPTORES ESPECÍFICOS DE LTB4 E CIS-LTS E SEUS PRECURSORES.....	77
6	DISCUSSÃO.....	85
7	CONCLUSÕES.....	93
	REFERÊNCIAS.....	95
	ANEXO A.....	109

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) é considerada atualmente a principal responsável pela perda de elementos dentários em indivíduos com 40 anos ou mais (Houshmad et al., 2012; Kassebaum et al., 2014). Sua prevalência e incidência variam conforme o país e/ ou estado a ser estudado, no entanto, como média geral, as doenças periodontais afetam aproximadamente 100% da população mundial (Kassebaum et al., 2014).

Caracterizada pela presença de quadro inflamatório, a DP se inicia a partir do acúmulo de biofilme na superfície dentária, tendo como possível consequência a destruição dos tecidos de suporte dos dentes, até a completa esfoliação dos mesmos (Van Dyke; Serhan, 2003; Dentino et al., 2013; Boillot et al., 2015). No entanto, embora seu principal fator etiológico seja a presença de bactérias periodontopatógenas Gram negativas, a patogênese da doença está relacionada intrinsecamente à resposta imunoinflamatória do hospedeiro (Van Dyke; Serhan, 2003; Dentino et al., 2013).

Neste sentido, com o intuito de controlar a doença, seu tratamento torna-se fundamental (de Almeida et al., 2015). De maneira tradicional, o tratamento periodontal básico consiste na desorganização e remoção do biofilme bacteriano por meio da raspagem supra e subgingival e alisamento radicular, além de instruções de higiene oral ao paciente (de Almeida et al., 2015). Porém, em algumas situações, o tratamento pode não apresentar o resultado esperado, sendo necessário o uso de adjuvantes que modulem o mecanismo de defesa do hospedeiro, de forma a atuar em mediadores pró e anti-inflamatórios, como, por exemplo, sobre os leucotrienos (LTs) (Bitencourt et al., 2013).

Diante da conversão do ácido araquidônico pela 5-lipoxigenase (5-LO), originam-se os LTs, importantes mediadores inflamatórios, os quais podem ser divididos em dois grupos: leucotrieno B₄ (LTB₄) e cisteinil-leucotrieno – Cis-LT (LTC₄, LTD₄, LTE₄) (Back et al., 2007; Cakici et al., 2011). O LTB₄ é considerado um potente quimiotático responsável por atrair e ativar leucócitos em sítios de inflamação promovendo lesão tecidual (Bitencourt et al., 2013). Em pacientes com periodontite, a associação com Cis-LT pode intensificar a atividade inflamatória da doença por meio do aumento da permeabilidade vascular com a consequente formação de edema. Além disso, tanto o LTB₄ quanto o Cis-LT podem vir a estimular o processo de reabsorção óssea por meio da ativação de fator nuclear de células T ativadas c1 (NFATc1), a partir do aumento do fluxo de Ca²⁺, o que facilita o desenvolvimento de osteoclastos (Jozefowski et al., 2005; Lee et al., 2012; Dixit et al., 2014); sendo que, ainda, estes últimos, especificamente, por serem considerados reguladores negativos da diferenciação

das células mesenquimais, inviabilizam a formação de osteócitos e o consequente reparo tecidual (Back et al., 2007; Wixted et al., 2009; Cakici et al., 2011; Bitencourt et al., 2013; Dixit et al., 2014).

Dessa forma, como os LTs estão envolvidos na patogenia de diferentes doenças inflamatórias, como na DP, por exemplo, o uso de um antagonista do receptor de leucotrienos pode vir a ser útil no tratamento da mesma (Bitencourt et al., 2013). Dentre os antagonistas, o Montelukaste é um medicamento utilizado inicialmente para o tratamento da asma e tem como seu mecanismo de ação primário o bloqueio reversível do receptor de Cis-LT (Cakici et al., 2011). No entanto, como mecanismo de ação secundário, pode agir sobre as vias de 5-LO e LTB₄, provocando uma diminuição de suas sínteses (Tintinger et al., 2010). Assim, é classificado como um anti-inflamatório com atividade antioxidante, de forma a atuar na inibição da atividade de neutrófilos e mediadores pró-inflamatórios (Sener et al., 2005; Coskun et al., 2011; Abdel-Raheem et al., 2014).

Na tentativa de avaliar o efeito do Montelukaste sobre o controle da inflamação, em modelos animais, autores concluíram que o mesmo apresentou um efeito anti-inflamatório significativo (Sener et al., 2005), além de inibir a ativação de fator nuclear kappa B (NF- κ B) (El-Swefy; Hassanen, 2009), promovendo a diminuição dos níveis de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Tugtepe et al., 2007; Hemmati et al., 2013; Abdel-Raheem et al., 2014; Khodir et al., 2014). Também foi capaz de reestabelecer a concentração de glutatona, protegendo os tecidos contra danos oxidativos (Khodir et al., 2014); e reduzir a expressão de mieloperoxidase, importante marcador de infiltração granulocítica (Mohamadin et al., 2011).

Ainda, ao adicionar Montelukaste em cultura celular de linhagens ósseas, foi constatado que a formação de osteoclastos foi completamente suprimida, tanto nas fases precoces, como nas tardias da osteoclastogênese (Lee et al., 2012). Além disso, camundongos que receberam carga mecânica durante 12 dias e foram tratados com Montelukaste apresentaram uma diminuição do recrutamento de osteoclastos, além de diminuição de todos os marcadores inflamatórios analisados, com exceção do ligante do receptor ativador de NF- κ B (RANKL)/osteoprotegerina (OPG), o qual é responsável pela deposição óssea, sugerindo seu uso como estratégia terapêutica no tratamento de doenças que envolvem destruição óssea (Moura et al., 2014).

No entanto, apesar de suas atividades anti-inflamatórias e antioxidantes serem amplamente estudadas, não se sabe ainda as possíveis implicações do uso sistêmico de um antagonista do receptor de leucotrienos (Montelukaste) na modulação da doença periodontal. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia do uso de antagonista do

receptor de leucotrienos na modulação da periodontite experimental induzida pelo método da ligadura em ratos.

Hipotetizou-se que o uso de antagonista do receptor de leucotrienos estaria associado com uma redução da perda óssea alveolar e um aumento das fibras colágenas, bem como com uma diminuição na expressão dos marcadores inflamatórios analisados, como MPO e marcadores específicos associados ao estresse oxidativo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Na revisão de literatura iremos abordar sobre a DP, moduladores da resposta do hospedeiro no seu tratamento, bem como o mecanismo de ação de antagonista do receptor de leucotrienos (Montelukaste).

2.1 DOENÇA PERIODONTAL

A DP é caracterizada pela presença de quadro inflamatório crônico consequente a um acúmulo bacteriano organizado (biofilme) e a resposta do hospedeiro frente a esses patógenos, tendo como resultado a destruição dos tecidos de suporte das estruturas dentais (Van Dyke; Serhan, 2003; Fredman et al., 2011; Sanchez et al., 2013).

2.1.1 Definição e epidemiologia

Baseada nas recomendações do Workshop Mundial para Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-Implantares (2017), a classificação atual, referente ao ano de 2018, classifica as condições periodontais em três grandes grupos, sendo: 1) Saúde Periodontal, condições e doenças gengivais; 2) Periodontite; e 3) Outras condições que afetam o periodonto (Caton et al., 2018). No grupo 1, na presença de gengivite induzida por biofilme, a doença se restringe aos tecidos gengivais (Mariotti, 1999), sendo reversível, se acompanhada de uma correta higiene oral e, conforme o caso, de profilaxia profissional (Loe et al., 1965). Por outro lado, na periodontite, o biofilme, localizado na porção subgengival, apresenta alto potencial de virulência, o que leva a destruição dos tecidos de suporte (ligamento periodontal – LP, cemento e osso alveolar), com a futura perda do elemento dental (Van Dyke; Serhan, 2003; Armitage; Robertson, 2009; Dentino et al., 2013; de Almeida et al., 2015; Herrera et al., 2015).

No grupo 2, da periodontite, deve haver perda de inserção em dois ou mais sítios interproximais não adjacentes, ou então perda de inserção de 3 mm ou mais na face vestibular ou lingual/ palatina em pelo menos 2 dentes. A causa da perda de inserção não pode ser consequência de recessão gengival de origem traumática, cárie dental em região cervical, perda de inserção da face distal de segundo molar associado ao mau posicionamento ou extração de

terceiro molar, lesão endodôntica periodontal, ou então ocorrência de fratura radicular vertical (Caton et al., 2018).

A periodontite é classificada de acordo com seu estágio e seu grau. Ainda, a mesma é caracterizada como localizada (até 30% dos dentes afetados), generalizada (30% dos dentes ou mais) ou padrão molar/incisivo. O estágio I tem como característica determinante perda de inserção interproximal no pior sítio de 1 a 2 mm, ou então perda radiográfica no terço coronal menor que 15%. Como característica secundária, observa-se profundidade clínica de sondagem (PCS) de até 4 mm, sem perda dentária devido à periodontite e padrão de perda óssea horizontal. No estágio II há perda de inserção clínica de 3 a 4 mm, com perda radiográfica no terço coronal entre 15 e 33%. A PCS tem valor máximo de 5 mm, sem perda dentária devido à periodontite e padrão de perda óssea horizontal. No estágio III o pior sítio apresenta perda de inserção clínica interproximal de 5 mm ou mais, e perda óssea radiográfica se estendendo à metade ou ao terço apical da raiz. A PCS apresenta 6 mm ou mais, com perda de perda dental consequente à periodontite em até 4 dentes. Pode ter perda óssea vertical de até 3 mm, lesões de furca grau II ou III e moderado defeito de rebordo. No estágio IV, o paciente apresenta perda de inserção clínica interproximal de 5 mm ou mais no pior sítio e perda óssea radiográfica se estendendo à metade ou ao terço apical da raiz. Como fatores que modificam o estágio, fica evidente a perda de 5 ou mais dentes devido à periodontite. Além disso, associado aos fatores do estágio III, pode ocorrer disfunção mastigatória, trauma oclusal secundário (mobilidade grau 2 ou 3), defeito de rebordo grave, problemas mastigatórios, e menos de 20 dentes remanescentes (Caton et al., 2018).

Quanto aos graus, o A é definido como progressão lenta. Existe evidência de não progressão de perda de inserção por 5 anos ou então perda óssea/ano de até 0,25 mm. Os pacientes apresentam grande acúmulo de biofilme, porém pouca destruição periodontal. Neste grau não há fatores de risco associados, como tabagismo e diabetes mellitus. No grau B há progressão moderada da periodontite. Há uma progressão inferior a 2 mm em 5 anos, com perda óssea de 0,25 a 1 mm por ano. A destruição periodontal é compatível com os depósitos de biofilme. O hábito de fumar (menos que 10 cigarros por dia) ou então a presença de diabetes (hemoglobina glicada menor que 7%) pode modificar o curso da doença. No grau C há uma rápida progressão da periodontite. Como característica determinante, observa-se progressão igual ou maior que 2 mm em 5 anos, ou então perda óssea anual superior a 1 mm. A destruição excede o esperado para quantidade de biofilme. Podem haver períodos de rápida progressão, ou então acometimento precoce da doença. Um exemplo é o padrão molar/incisivo e ausência de resposta esperada às terapias de controle do biofilme. Tabagismo (10 ou mais cigarros por

dia) e diabetes (hemoglobina glicada maior que 7%) podem modificar o curso da doença (Caton et al., 2018).

Nos Estados Unidos da América (EUA), de acordo com o National Health and Nutrition Examinations Surveys (NHANES) de 2009-2012, a prevalência da DP foi de 45,9% nos americanos com 30 anos ou mais, e 64% nos indivíduos com mais de 65 anos. Porém, nos casos de periodontite severa (estágio III ou IV de acordo com a classificação atual), a porcentagem variou de 8,9% a 12%, conforme a classificação adotada (Borrell et al., 2005). No Brasil, um estudo transversal realizado com 127 indivíduos, apresentando 30 anos ou mais, na região metropolitana da cidade de Porto Alegre, mostrou que, aproximadamente 97%, 79% e 52% dos indivíduos, e 68%, 36% e 16% dos dentes por indivíduos tinham perda de inserção clínica de 3 mm ou mais, 5 mm ou mais, e 7 mm ou mais, respectivamente, sendo que as porcentagens foram maiores conforme o aumento da idade (Susin et al., 2004).

Com o intuito de obter informações conclusivas a respeito da prevalência e incidência de casos de periodontite com perda de inserção clínica maior que 6 mm, ou profundidade de sondagem maior que 5 mm, no âmbito mundial, Kassebaum et al. (2014), realizaram uma revisão sistemática com 72 artigos publicados entre 1990 e 2010, os quais abrangeram 37 países e 291.170 pessoas. Em 2010, a prevalência da doença foi de 10,8%, sendo a mesma aumentada conforme o aumento da idade; ao passo que, a incidência foi de 701 novos casos a cada 100000 pessoas. Países como Chile, Brasil, Quênia, Indonésia, Austrália e Grécia foram os que apresentaram maior prevalência da doença, enquanto que a Argentina foi o país de maior incidência.

Desta forma, por meio da realização de diferentes estudos epidemiológicos, fica evidente que, à medida que a idade da população avança, maior é a taxa da doença, sendo a mesma encontrada em maior porcentagem no sexo masculino e na raça negra (Albandar; Rams, 2002; Susin et al., 2004; Borrell et al., 2005). Além de que, com base nos dados supracitados, torna-se possível afirmar que, devido à sua forte presença na atualidade, a DP passa a representar um grande problema público de saúde, o qual deve ser controlado (Fredman et al., 2011; Herrera et al., 2015).

2.1.2 Etiopatogênese

Embora a DP tenha como fator etiológico principal a presença de biofilme bacteriano, sua patogênese está relacionada intrinsecamente com a resposta imunoinflamatória e hábitos do

hospedeiro (Pouliot et al., 2000; Van Dyke; Serhan, 2003; Fredman et al., 2011; Sanchez et al., 2013; Herrera et al., 2015; Arabaci et al., 2015).

O biofilme dental tem sua composição variada conforme o indivíduo, o dente e o sítio em que se encontra (Paster et al., 2006). No entanto, como regra geral, sua formação é iniciada com a colonização de bactérias Gram positivas e, por fim, bactérias periodontopatógenas Gram negativas dominam a região, como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, as quais pertencem ao complexo vermelho, além de *Aggregatobacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus*, *Parvimonas micra* e *Streptococcus intermedius* (Offenbacher, 1996; Socransky et al., 1998; Kolenbrander et al., 2006).

Neste sentido, na presença do biofilme, uma resposta imunoinflamatória é ativada pelo hospedeiro (de Almeida et al., 2015). Como primeira linha de defesa, neutrófilos polimorfonucleares (PMN) e receptores de reconhecimento padrão (PRR), encontrados na superfície de diferentes células, são atraídos para o local (Kanzler et al., 2007). Enquanto que os PMN são as células mais abundantes nas lesões periodontais iniciais (Pouliot et al., 2000); os PRR, mais especificamente os toll-like (grupo encontrado na DP), são responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados com patógenos (PAMPs), como lipopolissacarídeos (LPS), por exemplo. Essa interação faz com que ocorra a síntese de espécies reativas de oxigênio (EROs), citocinas (interleucina-1 – IL-1, IL-12, fator de necrose tumoral- α – TNF- α), e quimiocinas (IL-8 e RANTES), sendo iniciada uma resposta imune inata com a migração de mais PMN para o local da inflamação (Dentino et al., 2013).

À medida que há um aumento desta migração, mais mediadores inflamatórios, tais como citocinas, quimiocinas e metaloproteínases de matriz (MMPs) migram para região, além da presença de produtos derivados do ácido araquidônico, como os leucotrienos (LTs) e prostaglandina (PG) E₂ (Pouliot et al., 2000). Os LTs, compostos biologicamente ativos de extrema importância na defesa do hospedeiro, além de induzirem o aumento da permeabilidade vascular, são considerados os mais potentes estimuladores de PMN, os quais, por sua vez, são responsáveis pela fagocitose e morte bacteriana, objetivando restabelecer a saúde periodontal (Goodson et al., 1982; Van Dyke et al., 1990). No entanto, estes leucócitos podem estar com seu funcionamento alterado, desencadeando, assim, um aumento ainda maior da permeabilidade vascular, formação de edema, desregulação da quimiotaxia, anormalidades fagocíticas, além dos mesmos liberarem proteases, PGs e outras moléculas pró-inflamatórias levando a um aumento significativo da inflamação com o início da destruição dos tecidos de suporte (Varani; Ward, 1994; Van Dyke; Serhan, 2003; Fredman et al., 2011).

Dentre as EROs, a liberação de peróxido de hidrogênio e superóxido pelos neutrófilos resultam em estresse oxidativo com consequente destruição do tecido conjuntivo periodontal (Martinez-Herrera et al., 2018). Esses radicais livres estão envolvidos na resposta imune, bem como nas vias de sinalização intracelular. Na doença periodontal pode estar ocorrendo uma baixa resposta antioxidante, bem como uma alta produção de radicais livres pelos neutrófilos. As principais enzimas antioxidantes são: superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Por outro lado, os principais marcadores de estresse oxidativo na doença periodontal são o malondialdeído, proteínas carboniladas, ácido tiobarbitúrico, óxido nítrico, produtos protéicos da oxidação avançada e produtos da peroxidação lipídica (Tothova; Celec, 2017).

Receptores CD14 (outro grupo de PRR), expressos em leucócitos, macrófagos e monócitos, promovem um melhor desempenho na capacidade dos toll-like em reconhecer LPS, ocorrendo um aumento ainda maior na produção de citocinas e quimiocinas. Nesta situação, caso as células de defesa iniciais não consigam derrotar as bactérias, uma maior quantidade de macrófagos e células dendríticas irá migrar para região, dando início a resposta imune adaptativa. Linfócitos T e B se acumulam e dominam a lesão, cada uma com suas funções específicas. As células B produzem anticorpos e as células T se subdividem (T-helper – Th1 e Th2) e asseguram a regulação imunológica da DP (Seymour; Taylor, 2004).

Em decorrência da excessiva liberação de citocinas, MMPs e fatores osteoclastogênicos, os tecidos de sustentação do dente vão sendo destruídos (Arabaci et al., 2015). Membros da família do receptor de TNF, denominados de receptor do ativador fator nuclear kappa B (NF- κ B) (RANK), ligante RANK (RANKL) e osteoprotegerina (OPG), são considerados os principais reguladores da deposição e reabsorção de tecido ósseo (Liu et al., 2003; Kawai et al., 2006; Arabaci et al., 2015). RANKL é encontrado nos osteoblastos e em linfócitos presentes no infiltrado inflamatório; enquanto que RANK é expresso em osteoclastos maduros e seus precursores (monócitos/ macrófagos); e OPG é sintetizada por células mesenquimais (Lee et al., 2012; de Almeida et al., 2015).

A diferenciação de osteoclastos é regulada por duas citocinas: fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) e RANKL. A ligação de M-CSF com seu receptor sobre a superfície do precursor de osteoclastos induz a expressão à superfície de RANK. A interação entre RANK e RANKL faz com que os osteoclastos sejam ativados e a reabsorção óssea ocorra. De maneira mais exemplificada, a ligação de RANKL desencadeia a ativação de moléculas sinalizadoras, como proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e NF- κ B que, em

seguida, levam a ativação de c-Fos, o qual é essencial para indução de fator nuclear de células T ativadas c1 (NFATc1), que é o responsável então pela diferenciação de osteoclastos (Kang et al., 2015).

Após a diferenciação dos mesmos, os osteoclastos se aderem à superfície do osso e secretam enzimas como fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), catepsina K e MMP-9, facilitando a reabsorção óssea. Além da sinalização de RANKL para determinação da osteoclastogênese em condições fisiológicas, várias citocinas pró-inflamatórias, como IL-23, IL-17 e TNF podem ter esse papel (Tobon-Arroyave et al., 2012; Cekici et al., 2014). Em acréscimo, ERO, provenientes dos PMN, também desempenham importante papel na formação de osteoclastos pelo aumento na regulação de RANKL (Arabaci et al., 2015). Além disso, a via de ativação de LTs também tem sido associada com uma rápida inflamação e formação de osteoclastos (Figura 2.1) (Dixit et al., 2014).

Por outro lado, de maneira positiva, a OPG, ao se ligar a RANKL, impede que o processo de reabsorção ocorra (Dentino et al., 2013; Garcia et al., 2013; Arabaci et al., 2015).

Figura 2.1 – Etiopatogênese da doença periodontal

Fonte: adaptado de Zenobia et al. (2015)

2.2 VIAS DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

O ácido araquidônico presente da bicamada de fosfolipídios das membranas celulares é metabolizado por duas vias (ciclooxigenase – COX e 5-lipoxigenase – 5-LO), levando a formação de eicosanoides, os quais estão intrinsicamente relacionados com a patofisiologia das doenças inflamatórias (Molloy; McCarthy, 2005; Hemmati et al., 2013; Hansen et al., 2015).

2.2.1 Lipoxigenase – Leucotrienos e seu papel na inflamação e na doença periodontal

Quando o ácido araquidônico é liberado pela enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) citosólica dependente de cálcio, a enzima 5-LO oxida esse ácido livre, na presença da proteína de ativação acessória de 5-LO (FLAP), para que seja transformado em ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE) (lipoxigenação), o qual pode ser reduzido por peroxidases para ácido 5-hidroxeicosatetraenóico (5-HETE) ou então ser desidratado em um segundo 5-LO por uma reação catalisada pelo leucotrieno A₄ (LTA₄) (Peters-Golden; Henderson, 2007; Lee et al., 2012), seja pela atividade diferencial de qualquer LTA₄-hidrolase (LTA₄H) ou LTC₄-sintase (LTC₄S) (Dixit et al., 2014). O LTC₄S pode se conjugar com a glutathione para formar o LTC₄, enquanto que a LTA₄H transforma LTA₄ em LTB₄. O LTC₄ é convertido extracelularmente em LTD₄ por meio da ação da enzima gama glutamil transferase e, em seguida, em LTE₄, devido à ação da enzima dipeptidase (Back et al., 2007; Riccioni et al., 2007; Ersoy et al., 2008; He et al., 2011; Lee et al., 2012).

Desta maneira, os leucotrienos são divididos em duas classes, de acordo com a presença ou ausência de um peptídeo com ligação de tioéter. LTC₄, LTD₄ e LTE₄ apresentam essa ligação e formam o grupo denominado de cisteinil-leucotrienos (Cis-LTs), sendo que o primeiro é ligado com glutathione, o segundo faz ligação com cisteinilglicina, e o último, com cisteína. Já o LTB₄ não apresenta a ligação (Figura 2.2) (Riccioni et al., 2007).

araquidônico seja aumentada, a produção de LT torna-se cada vez mais intensa (Bitencourt et al., 2013).

O LTB₄ consegue exercer suas funções devido à sua ligação com os receptores acoplados à proteína G, denominados de receptores BLT1 e BLT2 (Lee et al., 2012), o que resulta em um aumento de cálcio intracelular e redução de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP), mediando assim a ativação de quinase, transcrição gênica, e o recrutamento de células (Paula-Silva et al., 2016). No entanto, enquanto que BLT1 é expresso principalmente em leucócitos, BLT2 é ubíquo. E, embora BLT2 se liga ao LTB₄ com menor afinidade que BLT1, o mesmo pode mediar respostas de derivados de outras vias da lipoxigenase. Um terceiro receptor de LTB₄, denominado de receptor ativado por proliferador de peroxissoma nuclear- α (PPAR α), ao contrário dos receptores de membrana, está associado com efeitos anti-inflamatórios (Jozefowski et al., 2005).

Além do mais, embora o LTB₄ não seja produzido a partir de linfócitos, ele pode modular as suas funções induzindo a liberação de interferon- γ (INF- γ) e IL-2 a partir de células T, e IL-1 a partir de monócitos (Pradeep et al., 2007). Tendo também sua produção induzida por bactéria periodontopatogênica específica (*A. actinomycetemcomitans*, por exemplo), os LTB₄ são capazes de ativar a proliferação de osteoclastos, além de promoverem a degradação de colágeno (Hung et al., 2007; Pradeep et al., 2007; Lee et al., 2012; Sanchez et al., 2013).

Neste sentido, no que se refere ao metabolismo ósseo, o LTB₄ pode promover a ativação do fluxo de cálcio (aumento da concentração de Ca²⁺) por meio de seus receptores BLT1/ BLT2, além da inibição de adenilato-ciclase (ATP). Esta sinalização de cálcio é capaz de ativar NFATc1 e iniciar a transcrição de genes relacionados com osteoclastos, como TRAP, catepsina K e integrina β 3, facilitando o desenvolvimento de osteoclastos (Dixit et al., 2014). Além disso, o LTB₄ inibe a proliferação das células precursoras de osteoblastos e a consequente formação óssea (Paula-Silva et al., 2016). Desta forma, na presença de inflamação, a liberação de LTB₄ é aumentada a partir de monócitos/ macrófagos, o que leva a uma produção autócrina contínua dos mesmos, intensificando a osteoclastogênese (reabsorção óssea) (Jozefowski et al., 2005).

Em pacientes com periodontite moderada e grave, os níveis de LTB₄ estão aumentados, como resposta ao estímulo inflamatório, o que leva a progressão da forma crônica da doença (Sanchez et al., 2013). Estudos mostram que o LTB₄ foi encontrado em amostras de fluido crevicular gengival, sendo considerado um importante mediador na regulação de respostas inflamatórias em tecidos periodontais, podendo amplificar a inflamação e destruição dos tecidos devido a indução da liberação de outros mediadores inflamatórios (Emingil et al., 2001;

Pradeep et al., 2007). Desta maneira, estão intimamente envolvidos na regulação da resposta inflamatória durante a patogênese da DP, tendo sua expressão aumentada nas fases iniciais da inflamação (Hung et al., 2007).

Com relação aos Cis-LTs, estes são responsáveis pelo aumento da resposta inflamatória local, tendo suas concentrações aumentadas na presença de DP (alta incidência no fluido crevicular) (Back et al., 2007). Ainda, além de serem potentes quimiotáticos, são também referidos como reguladores negativos da diferenciação das células mesenquimais (Cakici et al., 2011), o que favorece a reabsorção óssea (Ersoy et al., 2008; Ersahin et al., 2012).

Suas funções são exercidas por meio de dois receptores transmembrana acoplados a proteína G, denominados de CisLTR1 e CisLTR2 (Lee et al., 2012). Desta forma, são considerados potentes mediadores pró-inflamatórios, sendo o CisLTR1 expresso em leucócitos no sangue periférico, como eosinófilos, mastócitos, monócitos e macrófagos. CisLTR1, o qual é responsável pela maior parte das atividades biológicas, liga-se com alta afinidade a LTD4, sendo a afinidade diminuída progressivamente em LTC4 e LTE4. Por outro lado, CisLTR2 liga-se a LTC4 e LTD4 com igual afinidade (Lee et al., 2012; Ersahin et al., 2012; Abdel-Raheem et al., 2014; Calapai et al., 2014).

Dentre as funções do CisLTR1, pode-se dizer que este é responsável pelo aumento da permeabilidade vascular (Tintinger et al., 2010). Após interação de Cis-LTs com esse receptor, ocorre o recrutamento e ativação de células inflamatórias, concomitante com a liberação de enzimas proteolíticas como elastase e MMP. Por promover a sensibilização dos neutrófilos fazendo com que os mesmos se tornem hiper-reativos, ocorre um aumento ainda maior de liberação de elastase e MMP-8 (Tintinger et al., 2010).

Além disso, medeia a proliferação e migração de diversos tipos celulares, como células musculares lisas vasculares (Yuan et al., 2009). No estudo de Yuan et al. (2009), foi constatado que a migração de células endoteliais pode ser estimulada por LTD4 mediado por CisLTR1s, sem afetar a proliferação, indicando, assim, que esses receptores tem um papel regulador na função endotelial. No entanto, este efeito de LTD4 sobre a proliferação de células estará relacionado com o tipo celular envolvido e com a interação com outros fatores de crescimento (Yuan et al., 2009). Ou seja, LTD4 facilita a migração, enquanto que fatores de crescimento e citocinas regulam a proliferação. Desta forma, é possível concluir que os CisLTR1s podem parcialmente mediar a angiogênese, a qual é caracterizada por degradação da membrana basal, proliferação e migração de células endoteliais e maturação de neovasculatura (Yuan et al., 2009).

Ainda, de maneira semelhante ao LTB₄, estudos mostram que os Cis-LTs também estão relacionados com a ativação de NFATc1 e a formação de osteoclastos. O CisLTR1 provoca um aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular, por meio de RANKL, que antagoniza a elevação de cAMP produzida por outros receptores, sendo esse processo o responsável pela regulação positiva na formação de osteoclastos (Jozefowski et al., 2005; Lee et al., 2012).

Em contrapartida, CisLTR2 é capaz de mediar respostas pró-inflamatórias iniciais e eventos pró-trombóticos em células endoteliais (Uzonyi et al., 2006). Esse receptor também medeia o aumento de Ca²⁺ intracelular e a permeabilidade vascular induzida por LTD₄ ou LTC₄, podendo desempenhar papéis críticos na fase inicial da inflamação endotelial (Hui et al., 2004; Uzonyi et al., 2006).

2.3 TERAPIA PERIODONTAL COM MODULADORES DA RESPOSTA DO HOSPEDEIRO

O tratamento periodontal tem como objetivo a eliminação dos fatores etiológicos presentes, de forma a obter uma superfície dental e/ou radicular biologicamente aceitável, com redução na perda de inserção e ausência de sangramento e supuração (Dentino et al., 2013). Ele pode ser dividido em: 1) fase sistêmica, onde é feito o controle de doenças sistêmicas do paciente, como diabetes, imunossupressão, além de ser alertado sobre os riscos do cigarro; 2) fase aguda, apenas para formas sintomática da doença; 3) fase inicial ou relacionada à causa, onde o paciente é, primeiramente, instruído a realizar um correto controle da placa por meio da higiene oral, para então ser realizado, pelo cirurgião dentista, o tratamento periodontal básico (TPB) que consiste na raspagem e alisamento radicular, sendo removido o biofilme, toxinas e cálculo; 4) fase cirúrgica; e 5) fase de manutenção (Dentino et al., 2013; de Almeida et al., 2015).

Contudo, embora o TPB seja o padrão ouro no controle da DP, em situações de periodontite agressiva, ou em casos em que o paciente não responde a esse tratamento, podemos lançar mão de uma terapia complementar, como é o caso da administração de antibióticos ou moduladores da resposta inflamatória, devendo a escolha do medicamento ser feita baseada na história médica e odontológica do paciente (Garcia et al., 2013; de Almeida et al., 2015).

Os Moduladores da Resposta do Hospedeiro (MRH) começaram a ser estudados quando constatado que a minociclina foi capaz de inibir a atividade da enzima collagenase em modelo

animal (Golub et al., 1983). Desta forma, para comprovar o efeito do fármaco sobre a collagenase, o mesmo foi utilizado em animais livres de bactéria, e a minociclina continuou a atuar nos níveis de collagenase, sendo confirmada a efetividade das tetraciclinas em inibir a atividade collagenolítica (MMP) e a destruição do tecido conjuntivo (Golub et al., 1984; Sorsa et al., 2016). Desta forma, a partir da metade dos anos 80, as tetraciclinas passaram a ser reconhecidas como um tratamento alternativo para DP (Burns et al., 1989; Golub et al., 1991). Dentre as tetraciclinas, a doxíciclina foi escolhida por apresentar menor concentração inibitória (Burns et al., 1989), além de ser mais efetiva em bloquear MMP-8, sendo considerada segura e interferindo na collagenase sem interferir com a renovação de tecido conjuntivo normal (Golub et al., 1995; Smith et al., 1999). A doxíciclina pode inibir a atividade de MMP por um mecanismo dependente de cálcio e zinco, ou inibir a produção de EROs provenientes de PMN (Wasil et al., 1988; Golub et al., 1998), o que contribui com suas propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias (Ramamurthy et al., 1993; Ryan; Ashley, 1998). Pode ainda inibir a produção de células epiteliais derivadas de MMP (Nip et al., 1993), além de contribuir com a diminuição da quebra de tecido conjuntivo pela diminuição da expressão de mediadores pró-inflamatórios e citocinas, aumentar a produção de colágeno e a atividade osteoblástica e, conseqüentemente, a formação óssea (Milano et al., 1997; Golub et al., 1998).

No entanto, apesar de seus benefícios, seu uso durante um longo período acaba por provocar resistência bacteriana (Kornman; Karl, 1982). Para resolver este problema, seu uso em dose subantimicrobiana foi introduzido, sendo utilizada atualmente na dose de 20 mg, duas vezes ao dia, durante um período que varia entre 3 a 9 meses (Caton et al., 2000; Gokhale; Padhye, 2013). Considerada até o momento como o único MRH aprovado pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento da DP, a dose subantimicrobiana de doxíciclina (DSD) ao ser administrada durante 2 semanas por pacientes com periodontite crônica, reduziu a atividade da collagenase em 60–80% no tecido gengival (Golub et al., 1990; Caton et al., 2011), sendo o mesmo fato comprovado por estudos posteriores, indicando que a mesma previne a progressão da doença sem provocar resistência microbiana (Golub et al., 1994).

Em estudo realizado com sujeitos com periodontite crônica (PC) submetidos ao TPB seguido pelo uso de placebo ou DSD (2 meses, intervalo de 2 meses, uso por mais 2 meses), foi visto que a DSD provoca melhora significativa na profundidade de sondagem (PS) e no nível clínico de inserção (NCI), além de reduzir a atividade de collagenase (Crout et al., 1996). Outro estudo demonstrou que o uso de DSD promove uma redução na atividade de MMP com concomitante redução dos níveis de degradação de colágeno (Golub et al., 1997). Ainda, após 4 anos, o mesmo grupo, ao submeter pacientes ao TPB com o uso de DSD ou placebo (12

semanas, intervalo de 12 semanas, uso por mais 12 semanas), observou redução nos níveis de collagenase, confirmando os achados prévios (Golub et al., 2001). Com relação aos parâmetros clínicos periodontais, estudos mostraram que o uso de DSD adjunto ao TPB resulta em maior número de sítios com resolução da inflamação (Caton et al., 2000; Caton et al., 2001). 46% das bolsas de 4-6 mm passaram a ter 3 mm ou menos de PS após 9 meses em comparação a apenas 34% do grupo placebo. Além do mais, o uso de DSD previne que sítios percam inserção ao longo do tratamento. Em ensaio clínico randomizado (ECR) foi encontrado que o uso de DSD durante 6 meses após TPB em pacientes com periodontite severa generalizada reduz a PS e previne seu aumento com o passar do tempo (Novak et al., 2002). Ainda, ao indicar uso de DSD durante 6 meses após cirurgia de retalho, foi encontrada uma cicatrização significativamente melhor em comparação ao placebo com relação a PS (Gapski et al., 2004).

Para identificar a interferência da DSD no crescimento bacteriano, um estudo realizado com pacientes submetidos ao TPB com placebo ou DSD, concluiu por meio da coleta de placa subgingival que a terapia não provoca crescimento bacteriano ou aparecimento de bactérias oportunistas (Thomas et al., 1998). Outro estudo encontrou redução de espiroquetas e bacilos e aumento de cocos, indicando a presença de microbiota associada com saúde periodontal (Walker et al., 2000).

Com relação aos seus efeitos colaterais, o uso de DSD é bem tolerado, sem diferença em relação ao placebo (Caton et al., 2000), sendo dor de cabeça e resfriado os efeitos adversos mais frequentes (Preshaw et al., 2004). A American Dental Association mostrou que RAR sozinha e RAR combinada com DSD são considerados os tratamentos mais eficientes e seguros, sendo a DSD responsável por uma melhora de 71% no NCI comparada a RAR sozinha (Golub et al., 2016).

Ainda, anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e bifosfonatos também já foram utilizados como terapia complementar em pacientes com doença periodontal (Dentino et al., 2013).

Foi proposto que o processo de reabsorção óssea pode ocorrer a partir de PGs, PGI₂ e LTs (Klein; Raisz, 1970; Goldhaber, 1971; Goodson et al., 1974; Salvi; Lang, 2005b). Estudos encontraram um considerável aumento nos níveis de PGE₂ em pacientes com periodontite (Goodson et al., 1974; ElAttar et al., 1976). Visto isso, como os AINEs bloqueiam a formação de metabólitos do ácido araquidônico, acreditava-se que seu uso poderia ser benéfico no tratamento da DP, sendo classificados como não seletivos (atuam sobre COX-1 e COX-2) e seletivos para COX-2, também chamados de coxibes (FitzGerald; Patrono, 2001).

A primeira descoberta que comprovou a eficiência dos AINEs foi com o uso da aspirina, onde a mesma inibiu a produção de PGs pelo bloqueio da COX (Vane, 1971). Já o primeiro estudo *in vivo*, realizado em cães com DP durante 12 meses, ao comparar o uso de flurbiprofeno com placebo em associação com o TPB, observou que o uso de AINE diminuiu significativamente a perda óssea (Williams et al., 1984; Williams et al., 1985). Em outros experimentos *in vitro*, o uso de indometacina esteve relacionado com uma redução maior que 50% na reabsorção óssea (Goldhaber et al., 1973), chegando a bloquear mais de 90% do processo (Gomes et al., 1976). Ainda, a mesma foi capaz de suspender a resposta inflamatória aguda, e diminuir a reabsorção óssea em cães (Nyman et al., 1979), além de suprimir a densidade osteoclástica em macacos com DP (Weeks-Dybvig et al., 1982).

Ao avaliar a prevalência da DP em pacientes usuários de AINEs para tratamento de outras doenças em comparação com não usuários, foi constatado que seu uso está relacionado com menor inflamação gengival e bolsas mais rasas (Waite et al., 1981). Ainda, pacientes que receberam flurbiprofeno duas vezes ao dia, durante 2 anos, tiveram menor perda óssea em comparação ao grupo placebo (Williams et al., 1989); além do fato de o uso de naproxeno (2 vezes ao dia, 3 meses) adjunto ao TPB em casos de periodontite de rápida progressão promover uma significativa diminuição na perda óssea (Jeffcoat et al., 1991).

Para comparar a eficácia de AINEs seletivos e não seletivos, ratos com DP experimental receberam indometacina (não seletivo) ou meloxicam (seletivo) durante 7 dias. Como resultado, ambos os fármacos provocaram inibição da perda óssea e inflamação. No entanto, meloxicam provocou menor dano gástrico (Bezerra et al., 2000). Ainda, seguindo o mesmo modelo de estudo, foi observado que a administração de celecoxibe (seletivo para COX-2) promoveu uma diminuição na resposta inflamatória aguda e na perda óssea alveolar (Holzhausen et al., 2002). Por outro lado, ao incluir o uso de antibiótico após cirurgia periodontal, o mesmo promoveu maior ganho de inserção, ao passo que o ibuprofeno não apresentou efeito benéfico no parâmetro periodontal (Haffajee et al., 1995), sendo o mesmo resultado encontrado com o uso de flurbiprofeno na cicatrização tecidual após cirurgia de retalho, o qual apresentou os mesmos efeitos que o placebo, tanto no nível ósseo, como na PS e NCI (Bragger et al., 1997).

No entanto, embora os AINEs possam ter efetividade no controle da DP, seu uso fica restrito em virtude de seus efeitos colaterais. O bloqueio de COX-1 provoca danos gastrointestinais. Além disso, problemas renais também podem ocorrer, pois tanto PGE₂ como PGI₂ são responsáveis pelo controle do fluxo sanguíneo renal e excreção de sal e água. Já em relação ao bloqueio de COX-2, o mesmo pode provocar sérios problemas cardiovasculares (Salvi; Lang, 2005b; Herrera et al., 2015).

Por outro lado, os bifosfonatos têm seu mecanismo de ação baseado na inibição da função osteoclástica, sendo potentes no controle da reabsorção óssea. Este fármaco representa uma classe de compostos químicos estruturalmente relacionados ao pirofosfato, produto do metabolismo humano com propriedades quelantes de cálcio. No entanto, ao contrário do pirofosfato, o bifosfonato é um composto estável e resistente (Rodan, 1998; Rogers et al., 2000). Os bifosfonatos, devido à alta afinidade com cristais de hidroxiapatita, impede o crescimento dos mesmos, o que aumenta a diferenciação dos osteoblastos e inibe a atividade osteoclástica (Fleisch, 1997). Além do mais, estudos *in vitro* apontam que o mesmo ainda interfere com a atividade de MMP (Teronen et al., 1999; Nakaya et al., 2000).

Experimentos em modelo animal também comprovaram sua eficácia. No entanto, dois estudos mostraram que, embora tenha ocorrido diminuição da perda óssea, os sinais da inflamação e a PS não foram afetados (Brunsvold et al., 1992; Reddy et al., 1995). Em estudos com humanos, ainda há uma divergência de resultados (Salvi; Lang, 2005a).

Porém, de maneira negativa, o uso de bifosfonatos pode provocar osteonecrose nos maxilares, afetando com maior prevalência a mandíbula. A partir do desenvolvimento desse processo, o osso da região fica exposto, podendo provocar mobilidade dentária e até mesmo a perda do mesmo, além de o osso poder ficar comprometido (Giannobile, 2008; Preshaw, 2008).

Neste sentido, visto que a modulação da resposta imunoinflamatória do hospedeiro é um fator chave no controle da DP, além da carência de medicamentos que cumprem essa função, sem a presença de efeitos colaterais deletérios ao organismo, torna-se imprescindível o estudo de novos fármacos que apresentam um mecanismo de ação imunomodulador para atuar como adjunto na terapia periodontal a fim de obter melhores resultados (Gokhale; Padhye, 2013). Dentre os fármacos com possíveis resultados promissores, o Montelukaste recebe destaque.

2.4 MONTELUCASTE E SEUS MECANISMOS DE AÇÃO

O Montelukaste, medicamento utilizado inicialmente no tratamento da asma, pertence ao grupo dos antagonistas seletivos do receptor de leucotrienos por ter seu mecanismo de ação baseado no bloqueio reversível do receptor de Cis-LTs, atuando especificamente sobre CisLTR1, de maneira seletiva sobre LTD4 (Riccioni et al., 2007; Ersoy et al., 2008; Tintinger et al., 2010; Mohamadin et al., 2011; Calapai et al., 2014; Ibrahim et al., 2014). Além disso,

devido ao fato de atuar na inibição da atividade de neutrófilos e mediadores pró-inflamatórios, é caracterizado como um detentor de propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (Dengiz et al., 2007; Cakici et al., 2011; Coskun et al., 2011; Abdel-Raheem et al., 2014; Ibrahim et al., 2014).

Como alternativa a esse mecanismo de ação primário, evidências recentes apontam que o Montelukaste apresenta algumas atividades anti-inflamatórias secundárias, não relacionadas com o antagonismo de CisLTR1s (Mamedova et al., 2005; Tahan et al., 2008; Anderson et al., 2009; Tintinger et al., 2010). Ou seja, esse fármaco pode interferir na ativação do fator de transcrição e na enzima acetiltransferase de histona (HAT), o que resulta em uma diminuição da síntese de NF- κ B, tanto nas células imunes como nas inflamatórias, com a consequente modulação da produção de IL-6, TNF- α e proteína quimioatratora de monócito-1 (MCP-1). Neste sentido, estudos concluíram que Montelukaste foi capaz de inibir a produção de TNF- α induzida por IL-8 (Tahan et al., 2008). Pode ainda induzir a produção de IL-10 e inibir a sinalização da via de receptores P2Y, os quais estão envolvidos na ativação de neutrófilos (Mamedova et al., 2005; Tintinger et al., 2010).

O Montelukaste antagoniza as atividades pró-inflamatórias desenvolvidas pelos neutrófilos pela inibição de fosfodiesterases dos nucleótidos cíclicos (PDE) e atenuação do influxo de Ca^{2+} mediada por um aumento basal intracelular de cAMP. cAMP promove o reestabelecimento da homeostase de Ca^{2+} por meio de diversos mecanismos, o que acaba por interferir com a ativação de 5-LO. Desta forma, o Montelukaste também passa a ser relatado como um inibidor de 5-LO, sugerindo uma eficácia na atenuação da geração e ação de mediadores inflamatórios autócrinos (Anderson et al., 2009; Tintinger et al., 2010). Esse bloqueio sobre 5-LO é seletivo, visto que outras enzimas da cascata de leucotrienos não são afetadas, como é o caso de LTC₄, a qual a síntese não é inibida, ou então apresenta uma suave inibição (Ramires et al., 2004; Woszczek et al., 2010). Além disso, o mesmo é capaz de inibir a liberação de elastase e também a produção de LTB₄, sendo esses processos dependentes da dose administrada (Figuras 2.3 e 2.4) (Anderson et al., 2009; Tintinger et al., 2010).

Figura 2.3 – Vias de atuação do Montelukaste

Fonte: a autora

Figura 2.4 – Mecanismo de ação do Montelukaste

Fonte: a autora

2.4.1 Segurança clínica, farmacodinâmica e farmacocinética

No que se refere à sua segurança clínica, o Montelukaste é considerado um fármaco seguro e bem tolerado pelos pacientes, sendo a ocorrência de reações adversas comparável ao uso de placebos, de acordo com revisão sistemática baseada em ensaios clínicos randomizados (Joos et al., 2008). Dentre os efeitos colaterais relatados, destacam-se: infecção do trato respiratório superior, agravamento da asma, faringite, febre, dor de cabeça, gripe, dor abdominal, tosse, distúrbios gastrointestinais, fadiga e erupções cutâneas (Riccioni et al., 2007; Calapai et al., 2014).

Em sua forma neutra original, o Montelukaste é pouco solúvel em água. Sua solubilidade aumenta mais de 200 vezes quando o mesmo é associado ao sódio. Por este motivo, o Montelukaste disponível comercialmente está na forma associada ao sódio. O fármaco é sensível a luz, temperatura, humidade e oxidação (Barbosa et al., 2016).

Após sua administração oral, sugere-se que o Montelukaste necessite de transportadores de membrana para que sejam absorvidos; além do fato de que os mesmos podem ter sua biodisponibilidade afetada por fatores genéticos e cinéticos, resultando em variações de sua concentração no plasma e diferentes respostas ao tratamento (Woszczek et al., 2010). Sua bioavaliabilidade imediatamente após a administração é próxima de 66% (Kittana et al., 2016). Parte do medicamento é absorvido no trato gastrointestinal e, ao ser metabolizado no fígado pela enzima citocromo P450, sua biodisponibilidade é reduzida. Sua permanência na corrente sanguínea é relativamente pequena (Barbosa et al., 2016). Sua concentração plasmática atinge seu pico em torno de 2 a 4 horas após a ingestão e tem rápida eliminação. A meia-vida plasmática média é de 2,7 a 5,5 horas (Kearns et al., 2008).

Quando o uso de Montelukaste é associado com outros medicamentos, como fenobarbital, fenitoína ou rifampina, sua concentração plasmática reduz até 40% (Buck, 2015). Por outro lado, sua concentração pode aumentar consideravelmente caso haja interação medicamentosa com fármacos que bloqueiam a principal enzima responsável por seu metabolismo, como o gemfibrozil, por exemplo (Agarwal et al., 2010).

2.4.2 Papel anti-inflamatório e antioxidante da inibição de leucotrienos

Na tentativa de avaliar a eficácia de Montelukaste na presença de quadro de sepsia induzida por danos hepáticos e intestinais em ratas fêmeas Wistar, Sener et al. (2005) alegaram que o Montelukaste, quando utilizado na dose de 10 mg/kg imediatamente antes da cirurgia de

indução de sepse e após 12 horas, possui um efeito anti-inflamatório significativo, com redução da expressão de MPO, além de proteger contra injúria oxidativa induzida por PMN. Após dano no fígado induzido cirurgicamente em ratos, foi realizada administração de Montelukaste durante 34 dias na dose de 10 mg/kg/dia. Como resultado, os autores concluíram que o fármaco inibe a ativação de NF- κ B (El-Swefy; Hassanen, 2009).

Ainda, o Montelukaste na ocorrência de danos renais oxidativos, quando utilizado imediatamente após cirurgia e em dias alternados, na dose de 10 mg/kg/dia, em ratos, protege os rins contra infiltração neutrofílica, regula o potencial oxidante e antioxidante do organismo, e diminui os níveis de TNF- α (Tugtepe et al., 2007). Abdel-Raheem e Khedr (2014) afirmam que o Montelukaste exerce efeito protetor contra danos renais por meio da inibição da infiltração de PMN, regulação de mediadores pró-inflamatórios, e seu potencial antioxidante. Ratos que receberam injeção com LPS apresentaram baixa porcentagem de sobrevivência, porém, ao ser realizada administração de Montelukaste (20 mg/kg) durante 7 dias, a taxa de sobrevivência teve aumento considerável, indicando que a sepse foi controlada por meio da redução de TNF- α produzida por leucócitos e macrófagos (Khodir et al., 2014).

Em estudo realizado por Hemmati et al. (2013), foi comprovado que esse fármaco inibe a resposta inflamatória em ratos. Além do mais, este medicamento, por ser antioxidante, embora não consiga estimular a biossíntese de glutathione, consegue reestabelecer a concentração da mesma a fim de restaurar os mecanismos de defesa celular, por meio da inibição da reação de peroxidação lipídica, protegendo o tecido contra dano oxidativo (equilíbrio oxidante-antioxidante) (Khodir et al., 2014). Com o seu tratamento, a atividade de mieloperoxidase é reduzida, a qual é considerada um importante marcador de infiltração neutrofílica (Mohamadin et al., 2011).

No estudo de Polat et al. (2013), foi investigado o efeito de Montelukaste na cicatrização de tendão lesionado, em ratos, tendo como foco a fase inflamatória aguda devido ao próprio efeito do medicamento, que é conhecido por atuar no período inicial do processo, em até 10 dias. No grupo que recebeu tratamento (10 mg/kg/dia), houve uma diminuição do infiltrado inflamatório, além de que as fibras colágenas estavam orientadas de forma mais regular, e com a vascularização reduzida. No entanto, trabalhos afirmam que o Montelukaste tem efeito inibidor sobre a maturação de colágeno, tendo como a mais provável explicação para uma melhor orientação das fibras colágenas, a diminuição do turnover (Tolazzi et al., 2009; Peters-Golden & Brock, 2000; Polat et al., 2013).

Em pesquisa laboratorial, ratas Wistar fêmeas foram submetidas à exposição de poluente específico, o qual promove estresse oxidativo. Os animais receberam Montelukaste na dose de 10 mg/kg/dia durante 60 dias. Seu uso promoveu uma redução na oxidação hepática, bem como promoveu uma redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β (Bentli et al., 2016). Um estudo conduzido em 2015 teve como objetivo verificar o potencial quimioatraente de leucotrienos sobre as células Th17. Nos resultados *in vitro*, com cultura celular de células CD4 T, e estimulação durante 3 dias, foi demonstrado que os leucotrienos induzem a quimiotaxia de células Th17. De forma a confirmar este resultado, camundongos fêmeas com indução de encefalomielite que receberam Montelukaste na dose de 10 mg/kg/dia intraperitoneal apresentaram uma redução da infiltração de células Th17, bem como redução dos sintomas da doença (Lee et al., 2015).

2.4.3 Efeito da inibição de leucotrienos sobre o metabolismo ósseo

Como os Cis-LTs estão implicados como reguladores negativos da diferenciação de células mesenquimais, o uso de um antagonista dos mesmos provoca um aumento na diferenciação celular de condrócitos e osteoblastos, o qual tem impacto positivo durante o reparo de fratura (Akino et al., 2006). Wixted et al. (2009), ao testarem o uso de Montelukaste (1,5 mg/kg/dia), via gavagem, sobre a diferenciação de células mesenquimais durante o reparo de fratura em camundongos, concluiu que houve um aumento no tamanho do calo, proliferação de condrócito, e diferenciação durante a fase inicial de cicatrização. Neste sentido, Cakici et al. (2011), baseado neste estudo, hipotetizaram que o Montelukaste (1 mg/kg, intraperitoneal) iria melhorar a cicatrização em um modelo de fratura de tibia em ratos após 3 e 6 semanas, porém, não foram encontradas diferenças, afirmando assim que o efeito positivo do Montelukaste só existe em fases precoces da cicatrização óssea.

Ainda, pode-se dizer que o uso de um inibidor de LTs é capaz de acelerar a ossificação endocondral, levando a um aumento na formação óssea nos primeiros dias após a fratura, indicando a ocorrência de diferenciação de células mesenquimais e proliferação de condrócitos; porém, em período tardios, os resultados podem ser menos expressivos (Cottrell; Connor, 2009; Cakici et al., 2011).

Ao adicionar Montelukaste em cultura celular de linhagens ósseas, a formação de osteoclastos foi completamente suprimida, tanto nas fases precoces, como nas tardias da osteoclastogênese. Para confirmar o resultado, camundongos receberam injeção de LPS em associação ou não com o medicamento, durante 8 dias. O grupo que recebeu Montelukaste na

dose de 5 mg/kg teve seus valores de densidade óssea femoral restaurados, além de ter sido identificada uma menor perda de massa de osso trabecular (Lee et al., 2012). Em outro estudo que fez administração de LPS na calvária de camundongos, houve a perda óssea inflamatória por ativação e diferenciação de osteoclastos, porém, ao utilizar um antagonista de LTs, a formação de osteoclastos induzida por LPS foi inibida, consistente com resultados encontrados in vitro (Kang et al., 2015).

Em estudo recente, cultura celular osteoclástica foi tratada com um inibidor específico de LTB₄, com MT, e inibidor de 5-LO para então a mesma ser estimulada com LPS de *A.a*. Como resultado, os inibidores de 5-LO e LTB₄ reduziram a atividade de osteoclastos, porém, de maneira contraditória aos demais artigos, MT não foi efetivo sobre a linhagem, ou seja, pode não estar envolvido no processo de perda óssea alveolar induzido por *A.a* (Madeira et al., 2017).

Ao ser aplicada força ortodôntica em cães sem raça definida, os animais receberam concomitantemente Montelukaste na dose de 2 mg/kg/dia durante 4 semanas. Como resultado, os autores demonstraram que o uso do fármaco não alterou o movimento ortodôntico. Embora nos cortes histológicos tenha sido possível identificar uma menor atividade osteoclástica nos animais tratados, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Asaad et al., 2017).

Camundongos que receberam carga mecânica durante 12 dias foram tratados com Montelukaste. Ao fazer o uso deste, houve uma diminuição do recrutamento de osteoclastos. Nos camundongos que não expressavam a enzima 5-LO ou nos camundongos que foram tratados com antagonista do receptor de LTs, houve uma diminuição de todos os marcadores analisados, com exceção de RANKL/OPG, o qual é responsável pela deposição óssea (Moura et al., 2014). Neste sentido, o tratamento em camundongos com inibidores de 5-LO pode acelerar a cura da fratura e promover uma maior regeneração óssea, resultados esses encontrados após 7 dias de inibição da 5-LO, onde foi possível encontrar uma maior proporção de RANKL/OPG entre o 7º e o 28º dia. Porém, após inibição por longo período, os efeitos catabólicos no osso foram exacerbados (Paula-Silva et al., 2016).

Além do mais, estudos apontam que camundongos sem a expressão do gene de 5-LO apresentam um aumento da espessura de osso cortical, além de exibirem menor perda óssea após procedimento de ovariectomia, sugerindo assim que os leucotrienos podem funcionar como reguladores do metabolismo ósseo (Bonewald et al., 1997). Concordando com os resultados, em estudo realizado com camundongos sem expressão de 5-LO, os mesmos apresentaram maior calo ósseo, além de melhores propriedades mecânicas após fratura (Manigrasso; O'Connor, 2010).

Em estudo realizado em cultura celular de macrófagos provenientes de camundongos, o uso de Montelukaste inibiu a expressão de RANKL e, conseqüentemente a ativação de osteoclastos. Ainda, o antagonista do receptor de LTs suprimiu a reabsorção óssea. Esse efeito pode ser explicado pela diminuição da expressão de NFATc1. Com o objetivo de comprovar os resultados encontrados *in vitro*, Montelukaste inibiu a osteoclastogênese induzida por inflamação em modelo de calvária em camundongo (Kang et al., 2018).

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a eficácia de antagonista do receptor de leucotrienos na modulação da periodontite experimental induzida pelo método da ligadura em ratos

- **ESPECÍFICA**

Avaliar o efeito de antagonista do receptor de leucotrienos, montelucaste, sobre:

- Perda óssea alveolar a partir do modelo de periodontite experimental e expressão gênica de fatores associados ao metabolismo ósseo (RANK, RANKL, OPG, RUNX2), além da degradação de colágeno tipo 1 e sua expressão gênica;
- Infiltração granulocítica no tecido gengival e o potencial antioxidante no tecido gengival e plasma.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental deste trabalho seguiu as orientações preconizadas no “Arrive Guidelines” (<https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>). A manipulação dos animais seguiu as recomendações do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e a lei 11794, de 8 de outubro de 2008.

4.1 ANIMAIS UTILIZADOS NO ESTUDO

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar, machos), provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade (ICB) de São Paulo (São Paulo/SP – Brasil), com idade de 6 a 8 semanas e peso entre 200 e 250 gramas. Os animais foram tratados com ração balanceada e água *ad libitum*. A temperatura da sala foi mantida a 22°C, sob ciclo de iluminação claro/escuro de 12/12 horas. O protocolo do estudo foi submetido ao Comitê de Ética na Experimentação animal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FO-USP), sob o número 038/2015 e também ao ICB da USP, sob o número 81/2016 (ANEXO A).

4.2 INDUÇÃO DA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR PELO MÉTODO DE LIGADURA

A anestesia foi realizada via injeção intraperitoneal (IP) com solução de anestésico ketamina 10% (90 mg/kg) e relaxante muscular xilazina 2% (10 mg/kg).

Após procedimento anestésico, os animais foram posicionados sobre mesa operatória para colocação de fio de algodão nos primeiros molares inferiores (quadrante direito e esquerdo) na região de sulco gengival, a fim de facilitar o acúmulo bacteriano (Holzhausen et al., 2002; Herrera et al., 2015). A ligadura foi mantida por 7, 14 e 21 dias (3 períodos experimentais).

4.3 DIVISÃO DOS GRUPOS, ADMINISTRAÇÃO DO TRATAMENTO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais foram aleatoriamente divididos (12 animais/ grupo) nos seguintes grupos experimentais: Grupo Sham – sem indução da periodontite experimental pelo método da ligadura/ sem tratamento (placebo, carboximetilcelulose – CMC 0,5%, via gavagem); Grupo Periodontite – com indução da periodontite experimental (ligadura)/ sem tratamento (placebo, CMC 0,5%, via gavagem); Grupo Montelucaste 10 (MT 10) – com indução da periodontite experimental (ligadura)/ com tratamento (Montelucaste de Sódio 10 mg – Biosintética – Aché, 10 mg/kg/dia em solução de CMC 0,5%, via gavagem) (Khodir et al., 2016); Grupo Montelucaste 30 (MT 30) – com indução da periodontite experimental (ligadura)/ com tratamento (Montelucaste de Sódio 10 mg – Biosintética – Aché, 30 mg/kg/dia em solução de CMC 0,5%, via gavagem).

Os animais pertencentes ao grupo Sham foram anestesiados e submetidos à colocação da ligadura. No entanto, a mesma foi retirada logo após a sua colocação, com os animais ainda anestesiados.

Após período experimental, os animais, sob efeito anestésico (ketamina 10% e xilazina 2% – IP), foram submetidos a eutanásia pelo método de exsanguinação. De acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), a exsanguinação é um dos métodos de eutanásia mais recomendados para os roedores. A técnica consiste na secção das artérias abdominal e só pode ser realizada após inconsciência do animal.

4.4 ANÁLISES

Após eutanásia, as hemimandíbulas (direita/ esquerda) de cada animal foram removidas para as análises descritas a seguir. A hemimandíbula esquerda foi utilizada para análise de perda óssea alveolar. Antes do processamento da amostra, no momento da eutanásia, o tecido gengival foi removido para realização de análises específicas. O sangue dos animais também foi coletado neste momento para obtenção de plasma. A hemimandíbula direita foi utilizada para análises histológicas (Figura 4.1).

Figura 4.1 – Desenho do estudo

Fonte: a autora

4.4.1 Análise de perda óssea alveolar macroscópica

Para avaliar a reabsorção óssea alveolar, as hemiarcadas mandibulares (lado esquerdo) foram submergidas em água oxigenada volume 10, com a finalidade de remover os excessos teciduais e, em seguida, permaneceram por 25 minutos em solução de azul de metileno 1% para identificação da junção amelocementária (JAC). As peças foram posicionadas com a face lingual para cima sobre lâminas de vidro e fixadas com cera utilidade (Epoxiglass, Diadema, SP, Brasil) objetivando obter o maior paralelismo possível entre as cúspides e raízes linguais e vestibulares. A imagem foi captada com o auxílio da lupa estereoscópica (Nikon SMZ 1500, Japão) no aumento de 30 a 40x, e então digitalizada para realização das mensurações com o auxílio do software ImageJ (National Institute of Mental Health – Bethesda, Maryland, USA), onde foi avaliada a área de perda óssea alveolar (em mm²) delimitada entre a JAC e a crista óssea, no primeiro molar (Goes et al., 2014) (Figura 4.2) Uma régua milimetrada foi utilizada para padronização das medidas. A análise foi realizada por um avaliador treinado.

Figura 4.2 – Delimitação da área de perda óssea alveolar (em mm²) entre a JAC e a crista óssea alveolar do primeiro molar inferior esquerdo

Fonte: a autora

4.4.2 Análise histopatológica

A hemiarcada mandibular (lado direito) foi fixada inicialmente em solução de formol tamponado 10% por 48 horas, para então ser descalcificada em ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 4% (pH 7,4) durante 40 dias. Após esse período, as amostras foram mantidas em álcool 70% até análise, para então serem embebidas em parafina e cortadas no sentido do plano frontal (vestibular-lingual) dos molares em secções longitudinais de 5 µm de espessura. As peças foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E), para então ser feita a análise qualitativa da região de primeiro molar inferior direito (características histopatológicas) (Goes et al., 2014; Moura et al., 2014; Herrera et al., 2015). A análise consistiu na identificação de normalidade epitelial e do tecido conjuntivo, com a preservação de suas respectivas camadas e estruturas. Além disso, observou-se a presença ou não de infiltrado inflamatório e alterações vasculares. Foi realizada análise do tecido ósseo, bem como a atividade dos osteoclastos e osteoblastos.

4.4.3 Análise histológica da degradação de colágeno por meio da coloração por picrossírius

Para visualização da distribuição do colágeno presente, outra secção das amostras embebidas em parafina (hemimandíbula direita) foi utilizada. Foi utilizado o kit Picrosírius-hematoxilina (Easy Path). Os cortes foram cobertos com Picrosírius (0,2 g sirius red e 100 mL de ácido pícrico saturado) por uma hora. Após esse período, foram lavados com água corrente por 3 minutos. Os cortes foram então cobertos com solução de hematoxilina de Harris (5 g de hematoxilina cristalizada, 100 mL álcool 95%, 20 g de sulfato de alumínio e amônio, 1000 mL de água destilada, 2-4 mL de ácido acético, 3 g de óxido de mercúrio) por 4 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas por 5 minutos em água corrente, desidratadas em álcool 95%, álcool 100% (2 vezes), álcool-xilol, xilol (2 vezes) e montadas. As imagens foram analisadas sob luz polarizada. Para quantificação, cinco campos da secção ao redor do elemento dental foram selecionados e as imagens foram obtidas com auxílio de microscópio Nikon Eclipse E600 (Nikon, Japão) acoplado à câmera digital Olympus DP-72 (Olympus, Japão). Utilizando o software Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics Co., Bethesda, MD, EUA), a área a ser examinada foi selecionada e um filtro de cores pré-estabelecidas foi aplicado para quantificação da deposição de fibras colágenas (Figura 4.3). O resultado foi expresso como porcentagem de área positiva em relação à área total (Wang et al., 2014). A análise foi realizada por um avaliador treinado.

Figura 4.3 – Desenho esquemático mostrando os cinco campos da secção ao redor do elemento dental que foram selecionados para análise de degradação de colágeno por meio da coloração de picrosírius

Fonte: a autora

4.4.4 Produção de LTB₄ no plasma sanguíneo

Por meio da técnica de ELISA, teste imunoenzimático que permite a detecção de ACs específicos, foi realizada a expressão LTB₄ no plasma sanguíneo. O sangue foi coletado a partir da artéria abdominal no momento da eutanásia. Para obtenção do plasma, o sangue, com a presença de anticoagulante (heparina) foi centrifugado durante 10 minutos, a 4°C, e 2000 x g. Inicialmente foi realizada a extração de LTB₄. Para purificação do plasma, 20 µL de plasma foi acidificado pela adição de 1 mL de HCl 1 mM. Posterior a isto, cada amostra foi submetida a passagem na coluna de extração do tipo C18 (Waters - Oasis) (3 mL de cada solução):

- 1) Água;
- 2) Etanol absoluto;
- 3) HCl 1 mM;
- 4) Amostra (1 mL);
- 5) Água;
- 6) Lavagem com hexano;
- 7) Eluir com etanol absoluto (1 mL).

Após as amostras terem sido secas com nitrogênio, foi realizada a ressuspensão com Tris Buffer do kit. A quantificação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen Corporation, #KHL1741, Camarillo, California). A leitura foi realizada em espectrofotômetro Spectra Max plus 384 (Molecular Devices, EUA) em comprimento de onda de 405 nm. As concentrações das amostras foram calculadas a partir da curva-padrão. O valor mínimo de detecção foi de 0,1 pg/mL.

4.4.5 Atividade de mieloperoxidase no tecido gengival

A infiltração granulocítica foi avaliada por meio da mieloperoxidase (MPO) a partir de tecido gengival proveniente do lado esquerdo da mandíbula (Herrera et al., 2011; Holzhausen et al., 2005). Cada amostra foi submergida em 300 µL de solução contendo tampão fosfato de sódio 80 mM e 0,5% de hexadeciltrimetilamônio, homogeneizadas com potter plástico e centrifugadas, para então serem feitas duplicatas em placa de 96 poços. Foram adicionados 200 µL de uma solução contendo 100 µL de tampão fosfato de sódio 80 mM, 85 µL de tampão fosfato de sódio 22 mM e 15 µL de peróxido de hidrogênio 0,017%; e 20 µL de outra solução contendo tetrametilbenzidina 18,4 mM dissolvida em dimetilformamida 8%. A placa foi incubada por 3 minutos a 37°C para então acrescentar 30 µL de acetato de sódio 1,46 mM. A

leitura foi realizada no espectrofotômetro com um comprimento de onda de 460 nm (Bitencourt et al., 2013).

4.4.6 Atividade de glutathiona no tecido gengival

O efeito do Montelukaste sobre a formação de radicais livres específicos foi realizado em tecido gengival (hemiarcada esquerda) por meio da dosagem de glutathiona. O método espectrofotométrico para a glutathiona (GSH) envolve a oxidação da mesma pelo reagente sulfidrilo (5,5-dithiobis, 2-ácido nitrobenzoico – DTNB) para formar o derivado ácido 5'-tio-2-nitrobenzoico (TNB), mensurável a 412 nm. O dissulfureto de glutathiona (GSSG) formado pode ser reciclado para GSH pela glutathiona redutase na presença de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Neste sentido, o ensaio foi realizado em duas etapas: preparação tecidual e detecção de glutathiona total (GSH e GSSG). A menor detecção para GSH e GSSG é de 0,103 nM em uma placa de 96 poços (Vaucher et al., 2014). O tecido foi homogeneizado, com o auxílio de potter plástico, em EDTA 0,02 M, sendo a solução obtida diluída (1:2) de forma que 400 µL do homogenato, 320 µL de água destilada e 80 µL de ácido tricloacético (TCA) 50% foram agitados e centrifugados durante 15 minutos a 1000 x g e 4°C. O sobrenadante foi utilizado para dosar o estresse oxidativo. Em 400 µL do mesmo foi adicionado 800 µL de tampão Tris/ HCl 0,4 M (pH 8,9) e 20 µL de DTNB, seguido de agitação durante 3 minutos, e leitura de absorbância em espectrofotômetro (412 nm) (Bertolini et al., 2002; Rimon et al., 2010; Abdel Raheem et al., 2014).

4.4.7 Análise da expressão de proteínas carboniladas pelo método de Slot Blot e de proteínas modificadas por 4HNE por Western Blot

Preparação das amostras

As amostras gengivais foram homogeneizadas com potter plástico em 200 µL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 contendo 1 mM de fluoreto de fenilmetano sulfonil (PMSF) e, em seguida, centrifugadas durante 5 minutos a 1000 x g e 4°C. Amostras de plasma também foram analisadas, as quais foram diluídas a 1:500 com o mesmo tampão.

A concentração de proteínas totais nas amostras foi determinada por meio do método de Bradford (1976) e, em seguida, foram diluídas em tampão de homogeneização para a concentração de proteínas de 12,5 µg/mL.

4.4.8 Proteínas carboniladas

A análise da expressão de proteínas carboniladas por Slot Blot foi feita de acordo com o método descrito por Robinson et al. (1999).

Duzentos microlitros das amostras (2,5 µg de proteína total) foram aplicados em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) através do sistema slot blot (BIO DOT SF – BioRad) utilizando-se vácuo. A membrana de PVDF foi previamente ativada com 10 mL de metanol durante 1 min e, em seguida, em solução metanol 20% + TBS 80% (Tris-base 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,4) por 5 min. Após a transferência das amostras, a membrana foi lavada em metanol durante 1 min e em seguida foi corada com vermelho de ponceau e foto documentada. Para a retirada de ponceau, a membrana foi lavada 3 x em solução metanol 20% + TBS 80%.

Seguidamente, a membrana foi incubada com HCl 2N por 5 min e a reação de derivatização iniciada pela adição de solução de DNPH 0,1 mg/mL (2,4-dinitro fenil hidrazina) previamente preparada em HCl 2N por exatamente 5 minutos. Em seguida, foi lavada 3 vezes em HCl 2N por 5 min; 3 vezes em metanol 100% por 5 min e finalmente bloqueada com BSA 3% em TBS-t (TBS contendo 0,2% tween-20) por 1 h.

A incubação com anticorpo primário anti-DNP foi realizada “overnight” a 18°C (1:25.000 em tampão de bloqueio (albumina 3%), Abcam, UK).

A seguir, a membrana foi lavada com TBS-t e incubada com o anticorpo secundário anti coelho conjugado com peroxidase (Bio Rad, EUA) na diluição de 1:10.000 em BSA 1,5% por duas horas. Posteriormente, a membrana foi lavada com TBS-t e as bandas imunoreativas foram reveladas por quimioluminescência e detectadas em sistema Image doc (Bio Rad, EUA).

As intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria, empregando-se o software Image J. Os resultados foram normalizados pela densitometria das respectivas bandas quando coradas com Ponceau. Usado como controle interno para controle de proteína

4.4.9 Análise da expressão de proteínas modificadas por 4HNE (4-hidroxinonenal) pela técnica de Western blot

Os homogenatos das amostras de gengiva e plasma foram diluídos em tampão de Laemmli e, após rápida centrifugação a 10.000 x g (30 seg), as proteínas das amostras (2,5 µg/poço) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% contendo 0,1% de lauril sulfato de sódio (SDS) (Laemmli, 1970).

A separação eletroforética das proteínas foi realizada à intensidade de corrente constante (25 mA), durante aproximadamente 2 horas e resultou em valores de voltagem variando entre 100 a 180 V. Posteriormente, as bandas proteicas foram transferidas eletroforeticamente através de sistema submerso para uma membrana de nitrocelulose, aplicando uma amperagem de 200 mA (voltagem ~ 50V) durante uma hora e meia. Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação da mesma com solução a 3% de BSA dissolvido em tampão TBS-t pH 7,4 (20 mM de TRIS-HCl, 8% de NaCl contendo 0,1% de Tween-20) sob agitação constante durante 1 hora. A seguir, as membranas foram incubadas durante 15 - 18 horas, a 4°C com o anticorpo primário anti 4HNE (policlonal, feito em cabra), diluído 1:3.000 em tampão de bloqueio (Bio Rad, EUA). Após o término da incubação, as membranas foram lavadas (6 vezes, durante 10 min) com tampão TBS-t e incubadas com anticorpos secundário anti cabra (feito em burro) conjugados com peroxidase de raiz forte (HRP), diluído 1:5000 em tampão de bloqueio (Santa Cruz, EUA) durante 2 horas em temperatura ambiente.

As membranas foram submetidas a um novo ciclo de lavagens em TBS-t (6 vezes, por 10 min) e as bandas imunorreativas foram reveladas por quimioluminescência (SuperSignal West pico, Thermo Scientific, EUA). As imagens das bandas foram captadas no sistema ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, EUA) e suas intensidades foram estimadas através de análise densitométrica. Os resultados obtidos foram normalizados pela leitura das bandas coradas por vermelho de ponceau e expressos como porcentagem em relação ao grupo Sham.

4.4.10 Expressão gênica tecidual de fatores associados com o metabolismo ósseo e receptores específicos de LTB₄ e Cis-LTs e seus precursores (PCR real time)

A partir da mandíbula dos animais, o primeiro molar foi extraído, para então ser feita a coleta do tecido gengival, ligamento periodontal e osso alveolar da região. Os tecidos foram armazenados em tubos contendo 500 µL de reagente para extração de ácido ribonucleico (RNA) (TRIZOL™, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) em freezer a -80°C. O RNA total foi extraído com TRIZOL™ (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. De maneira resumida, as amostras foram homogeneizadas com potter plástico em Trizol em politron. Após 5 minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de uma solução de clorofórmio/ álcool isoamílico (24/1 v/v). Após agitação vigorosa para a extração dos lipídios, os tubos foram deixados em repouso por 10 min e posteriormente centrifugados a

12.000 x g durante 15 min a 4°C. Dessa forma, foram obtidas três fases: a fase aquosa que contém o RNA (superior), uma fase turva que contém o ácido desoxirribonucleico (DNA) (intermediária) e uma fase sólida inferior (precipitado) que contém proteínas e lipídios. A fase aquosa sobrenadante foi separada e o RNA precipitado pela adição de 500 µL de isopropanol. Após 10 min na temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados (12.000 x g, durante 10 min a 4°C). Os sobrenadantes foram descartados e o precipitado de RNA lavado com 500 µL de etanol 95%. Após centrifugação (7.000 x g, durante 5 min a 4°C), os sobrenadantes foram desprezados, e os precipitados lavados novamente com etanol a 75%, centrifugados (7.000 x g, durante 5 min a 4°C) e os tubos invertidos e apoiados sobre papel de filtro para eliminar os restos de etanol. Finalmente, o precipitado foi dissolvido com 30 µL de água tratada com dicarbonato de dietila (DEPC). A quantificação do RNA total foi realizada em leitor Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). As concentrações de RNA total foram calculadas em ng/µL. Dez microlitros das amostras foram submetidas à eletroforese (voltagem fixada em 70 V) em gel de agarose a 1% para verificação da integridade do RNA extraído.

Para purificação e transcrição reversa (RT) do RNA total, 85 ng de RNA total das amostras (diluídas com água tratada com DEPC, q.s.p. 10 µL) foram tratadas com 1 µL de enzima desoxirribonuclease (DNase) (DNase I, Fermentas Life Science) e 1 µL de tampão para DNase (Fermentas Life Science). Brevemente, as amostras foram aquecidas a 37°C por 15 min e a 75°C por 15 min. Em seguida, as amostras foram deixadas à 42°C por 2 min. A transcrição reversa foi realizada incubando-se o RNA tratado com DNase com uma mistura contendo 0,5 µL de inibidor de RNases (RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor, Fermentas Life Science), 4 µL de 5X First-Strand Buffer, 1 µL de oligo dT (100 µM, Fermentas Life Science), 2 µL de desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTPs) (10 mM, Fermentas Life Science) e 1 µL da enzima transcriptase reversa (RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas Life Science) a 42°C durante 1 h, seguido de 5 min a 70°C e 2 min a 37°C. Os produtos de DNA complementar (cDNA) obtidos foram mantidos a -20°C até serem utilizados.

Após esse processo, foi realizada a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Os primers para RUNX2, RANK, RANKL, OPG, Colágeno tipo I, LTA4H, LTC4S, BLT1, CisLTR1 e HPRT foram desenhados utilizando o programa Primer 3 (desenvolvido por Steve Rozen e Helen J. Skaletsky) e disponível online em <http://frodo.wi.mit.edu>. Os primers foram selecionados de acordo com as seguintes características: composição entre 18 e 24 bases (ótimo entre 20-22), temperatura de fusão (melting; -T_m) entre 59,5 e 60,5 °C (ótima T_m 60 °C), conteúdo de G+C entre 40 e 60% (ótimo 50%) e produtos de amplificação entre 80-200 pares

de bases (pb). As sequências selecionadas foram analisadas com relação à especificidade do gene utilizando o programa BLAT (<http://genome.ucsc.edu>) (Moura et al., 2014). Os primers utilizados se encontram na tabela abaixo (Quadro 4.1).

Quadro 4.1 – Sequência dos primers utilizados nos ensaios de PCR em tempo real

Gene	Forward	Reverse
Runx2	AACCACAGAACCACAAGTGCG	AAATGACTCGGTTGGTCTCGG
RANK	CCAGGAGAGGCACTATGAGC	GACACACACTGTCTGGAGGTG
RANKL	CAGAAGATGGCACTCACTGCA	CACCATCGCTTTCTCTGCTCT
OPG	GGAACCCCAGAGCGAAATACA	CCTGAAGAATGCCTCCTCACA
Colágeno I	CTCCAACGAGATCGAGATCC	GAAGCCGAATTCCTGGTCTG
LTA4H	TTTAGGAGGATGGGGAGAG	CGTAGGGAATGGAGGAGTAG
LTC4S	TCGTGGGAGTTCTGCTG	ATTTACCTGGGCTCGGAAG
BLT1	CCTGGCACTAAGACAGATTCAAGG	CAACAGAGACAGGGACATGC
CisLTR1	ATGTTTTGAGCCTCCACAGG	TCGACTTGGCAGGTTTTTCT
HPRT	AAGCTTGCTGGTGAAAAGGA	TGATTCAAATCCCTGAAGTGC

Fonte: a autora

Como controle negativo, reações foram realizadas na ausência de cDNA. Cada reação foi realizada em duplicata com 3 µL de cDNA diluído 3 vezes, 6 µL de SyBr Green (KAPA SYBR Fast qPCR Master mix, Kapa Biosystems, Boston, Massachusetts, EUA) e 3 µL de primers (concentração final de 300 nM). O protocolo constituiu de uma etapa de 3 min de desnaturação a 95°C e 40 ciclos de amplificação a 95°C por 3 s e 60°C por 20 s. Todos os ensaios foram realizados no Mx3005P® qPCR System (Stratagene) e a análise quantitativa realizada com a versão 4.1 do software MxPro (Stratagene), que estimou valores de “threshold cycle” (Ct; ciclo onde a reação cruza o limiar de detecção) para cada amostra. A expressão gênica relativa do gene de interesse foi normalizado em relação ao HPRT, utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ através da equação $2^{-[\Delta C_t (\text{teste}) - \Delta C_t (\text{HPRT})]}$.

4.5 CÁLCULO AMOSTRAL

A determinação do número de animais foi baseada na análise (média/desvio padrão) de dados da perda óssea alveolar macroscópica do próprio grupo de pesquisa (Teste: Avaliação macroscópica da perda óssea alveolar – dados não publicados). Neste sentido, foi realizado o

teste t, bicaudal, assumindo um d de Cohen de 1,5 (alto efeito), com um poder estatístico de 80% e um nível de significância de 5% (Software GPower 3.1), foi obtido um “n” amostral mínimo de 10 animais/grupo. Considerando a ocorrência de possíveis perdas durante o experimento, foram utilizados 12 animais por grupo (20% a mais).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os valores foram expressos como media $\pm$ erro padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas por meio do uso do programa digital GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc. – San Diego, California, USA). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado a todos os grupos para verificar se os dados seguem a distribuição normal. Como todos os valores apresentaram uma distribuição normal, para análise estatística foi utilizado o teste paramétrico ANOVA seguido pelo pós teste de Sidak para múltiplas comparações entre os grupos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

Seguem os resultados referentes as análises descritas na seção 4 (Material e métodos).

5.1 ANÁLISE DE PERDA ÓSSEA ALVEOLAR MACROSCÓPICA

O efeito de Montelukaste sobre a perda óssea alveolar induzida pelo método da ligadura em ratos encontra-se na Figura 5.1. Na figura é possível observar o efeito do fármaco nos três períodos experimentais (7, 14 e 21 dias), bem como seu uso em diferentes doses (10 e 30 mg/kg/dia).

Ao observar os resultados encontrados, pode-se afirmar que a colocação da ligadura levou a um aumento estatisticamente significativo da perda óssea alveolar nos três períodos avaliados ($p < 0,05$). Nos períodos experimentais de 14 e 21 dias, independente da dose de Montelukaste utilizada, o fármaco promoveu uma redução estatisticamente significativa da perda óssea alveolar em comparação ao grupo Periodontite ($p < 0,05$).

Figura 5.1 – Efeito de Montelukaste sobre a perda óssea alveolar associada à periodontite induzida pelo método da ligadura em ratos em função do tempo e da dose

Média $\pm$ desvio padrão. *** $p < 0,001$ versus Sham; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ versus grupo Periodontite ($n = 12$ animais/grupo)

Fonte: a autora

5.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Nos animais referentes ao grupo Sham, o tecido gengival da face vestibular e lingual do primeiro molar inferior, apresentou-se com características de normalidade. O tecido estava recoberto por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, com a interface entre o epitélio gengival oral e o tecido conjuntivo subjacente composta por pequenas cristas epiteliais para o interior do conjuntivo denso. O epitélio sulcular apresentou-se queratinizado, delgado, e penetrando lateralmente em direção apical até o epitélio juncional. O epitélio juncional era formado por 2-3 camadas de células epiteliais achatadas, frouxamente arranjadas, não queratinizadas, dispostas paralelamente à superfície do dente e infiltrado por alguns neutrófilos. O conjuntivo mostrava densos feixes de fibras colágenas, entremeadas por delicadas estruturas vasculares, e fibroblastos estrelados ou fusiformes. Na região apical, subjacente ao epitélio juncional, observava-se discreto infiltrado inflamatório de células mononucleares. O processo alveolar era constituído pelas tábuas ou corticais externa e interna, tanto na face vestibular quanto na face lingual, o osso alveolar que forma as paredes do alvéolo dentário e o osso esponjoso que ficava entre ambos. Consistia de uma porção externa ou cortical de variável espessura formada por osso compacto regular, uma porção esponjosa central e, na porção próxima ao ligamento periodontal delimitando internamente o alvéolo dentário, observava-se osso compacto irregular de variável espessura também chamada de porção cribiforme. As tábuas ósseas externas e o osso que delimita o alvéolo uniam-se na crista alveolar. O osso trabecular ou esponjoso era composto por trabéculas ósseas irregulares de variáveis espessuras, ora delimitando pequenos espaços ocupados por medula óssea, ora ocupando toda área. Adjacente e alinhados ao trabeculado ósseo, observava-se osteoblastos, que consistiam de células arredondadas ou ovóides com núcleo volumoso, eventualmente osteoclastos acoplados em depressões óssea. Contidos nas lacunas existentes no interior da matriz óssea mineralizada observava-se osteócitos (Figura 5.2).

Os animais do grupo Periodontite mostraram padrão histopatológico compatível com doença periodontal, caracterizado pela presença de leucócitos polimorfonucleares, leucócitos mononucleares, figuras vasculares dilatadas (algumas com nítido processo de estase) observadas principalmente na região subjacente ao epitélio gengival e juncional. De modo geral o epitélio se apresentava hiperplásico, que se caracterizava por ter maior número de células quando comparado aos do grupo Sham. O epitélio gengival da face lingual se mostrava com interdigitações em direção ao conjuntivo. Observou-se ainda reabsorção óssea do processo alveolar caracterizando periodontite. Foi encontrado intenso infiltrado inflamatório, figuras

vasculares dilatadas e reabsorção óssea com nítidas lacunas de Howship e osteoclastos (Figura 5.3).

Nas lâminas referentes aos animais do grupo Montelukaste, foi encontrado um padrão morfológico de gengivite, com infiltrado de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares de variada quantidade, figuras vasculares dilatadas, principalmente na região subjacente ao epitélio gengival e juncional. O epitélio se apresentou hiperplásico, com maior número de células quando comparado aos do grupo Sham, além da presença de tecido conjuntivo fibroso apesar do processo inflamatório presente. Não se observou alterações relevantes no tecido ósseo (Figura 5.4).

Figura 5.2 – Cortes histológicos referentes ao grupo Sham

Na figura A é possível observar ausência de reabsorção óssea, com características de normalidade o cemento, osso alveolar e ligamento periodontal. Nas figuras B e C o tecido gengival apresentou-se com características de normalidade (descrição detalhada no texto). Observava-se apenas discreto infiltrado inflamatório de células mononucleares (*). Na figura D é possível observar, em maior aumento, o ligamento periodontal intacto, com a presença de fibras de Sharpey conectando o osso alveolar e o cemento radicular (↑). Figuras A, B e C com aumento de 10 x e figura D com aumento de 40 x.

Fonte: a autora

Figura 5.3 – Cortes histológicos referentes ao grupo Periodontite

Na figura A é possível identificar a presença de intenso infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo adjacente ao tecido epitelial (*), bem como o tecido epitelial hiperplásico. Nas figuras B-F observa-se a presença de intenso processo de reabsorção óssea, o que caracteriza a periodontite. Na figura C existem grandes áreas de destruição óssea associada a presença de vasos dilatados e com congestão. O mesmo é visto da figura D em maior aumento (→). Na figura E observa-se grande presença de osteoclastos que atuam no processo de reabsorção óssea (>). Figuras A, B e C com aumento de 10 x e figuras D, E e F com aumento de 40 x

Fonte: a autora

Figura 5.4 – Cortes histológicos referentes ao grupo Montelucaeste

Nas figuras A, B e C é possível identificar a presença de infiltrado de leucócitos polimorfonucleares e mononucleares de variada quantidade (*), além de vasos dilatados (#). Quando comparado com o grupo Sham, o epitélio se apresenta hiperplásico. Nas figuras D e E é possível identificar o osso alveolar sem a presença de processo ativo de reabsorção óssea. Na figura F observa-se o ligamento periodontal intacto, com a presença de fibras de Sharpey conectando o osso alveolar e o cimento radicular (↑). Figuras A, B, C e D com aumento de 10 x e figuras E e F com aumento de 40 x.

Fonte: a autora

5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA DEGRADAÇÃO DE COLÁGENO

O efeito de Montelukaste sobre a degradação de colágeno nos tecidos periodontais da região de primeiro molar inferior está demonstrado na Figura 5.5.

Ao analisar a figura, é possível afirmar que nos períodos experimentais de 7 e 14 dias não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p>0,05$). Por outro lado, no período experimental de 21 dias, os grupos Periodontite e Montelukaste apresentaram uma redução estatisticamente significativa da expressão de colágeno tipo 1 em relação ao grupo Sham ($p<0,05$). Os grupos Periodontite e Montelukaste não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p>0,05$).

Figura 5.5 – Efeito de Montelukaste sobre a degradação de colágeno observada por meio da coloração de picrosirius em cortes histológicos na região de primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos

Média $\pm$ desvio padrão. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ versus Sham ($n = 5$ animais/ grupo)

Fonte: a autora

5.4 PRODUÇÃO DE LTB4 NO PLASMA SANGUÍNEO

As leituras obtidas para as amostras de plasma sanguíneo não foram detectadas pelo kit empregado. Os valores de LTB4 das amostras analisadas se encontraram abaixo de 8 pg/mL.

5.5 ATIVIDADE DE MIELOPEROXIDASE NO TECIDO GENGIVAL

O efeito de Montelukaste sobre a atividade de mieloperoxidase a partir da coleta de tecido gengival adjacente ao primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos em função do tempo e da dose pode ser visualizado na Figura 5.6.

O grupo Periodontite promoveu um aumento estatisticamente significativo da atividade granulocítica em comparação ao grupo Sham, independente do período experimental analisado ($p < 0,05$). Nos períodos experimentais de 7 (10 mg/kg/dia) e 14 dias (30 mg/kg/dia), o grupo Montelukaste reduziu de maneira estatisticamente significativa a atividade granulocítica quando comparada com o grupo Periodontite ($p < 0,05$). Nestes mesmos períodos e doses, os grupos Sham e Montelukaste não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p > 0,05$).

Figura 5.6 – Efeito de Montelukaste sobre a atividade de mieloperoxidase a partir da coleta de tecido gengival adjacente ao primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos em função do tempo e da dose

Média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ versus Sham; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ versus grupo Periodontite (n = 6 animais/ grupo)

Fonte: a autora

5.6 ATIVIDADE DE GLUTATIONA NO TECIDO GENGIVAL

O efeito de Montelukaste sobre a formação de radicais livres em tecido gengival por meio da dosagem de glutathione está apresentado na Figura 5.7. Essa análise foi realizada apenas no período experimental de 14 dias, na dose de Montelukaste de 30 mg/kg/dia.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais analisados ($p>0,05$).

Figura 5.7 – Efeito de Montelukaste sobre a formação de radicais livres por meio da dosagem de glutathione a partir da coleta de tecido gengival adjacente ao primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos no período experimental de 14 dias

Média ± desvio padrão. $p>0,05$ ($n = 8$ animais/ grupo)

Fonte: a autora

5.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS CARBONILADAS

Os valores referentes a análise da expressão de proteínas carboniladas no plasma sanguíneo encontram-se na Figura 5.8. Pode-se afirmar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Sham, Periodontite e Montelukaste tanto nas amostras de plasma, como no tecido gengival analisado ($p>0,05$).

Figura 5.8 – Efeito de Montelukaste sobre a expressão de proteínas carboniladas a partir do plasma sanguíneo

Média $\pm$ desvio padrão. $p > 0,05$ ($n = 3$ animais/ grupo)

Fonte: a autora

5.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS MODIFICADAS POR 4HNE

Os valores referentes a análise da expressão de proteínas modificadas por 4HNE no tecido gengival encontram-se na Figura 5.9. Pode-se afirmar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos Sham, Periodontite e Montelukaste tanto nas amostras de plasma, como no tecido gengival analisado ($p > 0,05$).

Figura 5.9 – Efeito de Montelukaste sobre a expressão de proteínas modificadas por 4HNE no tecido gengival removido na região do primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos no período experimental de 14 dias

Média $\pm$ desvio padrão. $p > 0,05$

Fonte: a autora

5.9 EXPRESSÃO GÊNICA TECIDUAL DE FATORES ASSOCIADOS COM O METABOLISMO ÓSSEO E RECEPTORES ESPECÍFICOS DE LTB4 E CIS-LTS E SEUS PRECURSORES

A análise de PCR foi realizada em dois diferentes tipos de amostra: 1) tecido gengival; 2) ligamento periodontal e osso alveolar; sendo todos provenientes de animais pertencentes ao período experimental de 14 dias, na dose de Montelukaste de 30 mg/kg/dia. Os resultados encontram-se nas figuras abaixo (Figuras 5.10 – 5.18).

Na figura 5.10 é possível observar a expressão gênica de colágeno do tipo I no tecido gengival no tempo experimental de 14 dias. Os grupos Sham, Periodontite e Montelukaste não apresentam diferença estatisticamente significativa entre si ($p > 0,05$).

Ao analisar a expressão gênica de RUNX2 no ligamento periodontal e tecido ósseo alveolar, o grupo Montelukaste esteve relacionado com um aumento estatisticamente significativo da expressão de RUNX2 quando comparado com os grupos Sham e Periodontite ($p < 0,05$) (Figura 5.11).

Na Figura 5.12, que retrata a expressão gênica de RANK no ligamento periodontal e tecido ósseo alveolar, os grupos Periodontite e Montelukaste promoveram um aumento

estatisticamente significativa da expressão de RANK em comparação ao grupo Sham ($p < 0,05$). Ainda, quando analisados os gráficos da expressão gênica de RANKL e OPG (Figuras 5.13 e 5.14), não foi possível encontrar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p > 0,05$).

Quando analisada a expressão gênica da enzima LTA4H na figura 5.15, não foi possível encontrar diferença estatisticamente significativa entre os três grupos experimentais no tecido gengival ($p > 0,05$). Por outro lado, ao analisar o tecido ósseo e o ligamento periodontal, o grupo Montelukaste promoveu uma redução estatisticamente significativa da expressão de LTA4H em relação ao grupo Periodontite ($p < 0,05$), ao passo que os grupos Sham e Periodontite, bem como os grupos Sham e Montelukaste não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p > 0,05$). Ao analisar a expressão gênica de BLT1 (Figura 5.16), o grupo Montelukaste promoveu uma redução estatisticamente significativa da expressão de BLT1 no tecido gengival quando comparado com o grupo Periodontite ($p < 0,05$). Os demais grupos, independente do tecido analisado, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p > 0,05$).

Ao analisar a expressão da enzima LTC4S (Figura 5.17) no osso alveolar e ligamento periodontal é possível dizer que os valores encontrados no grupo Periodontite foram estatisticamente maiores que os valores encontrados no grupo Sham ($p < 0,05$). Ao comparar os grupos Sham e Montelukaste entre si, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$). Por outro lado, quando comparados os grupos Periodontite e Montelukaste, o grupo que recebeu tratamento esteve relacionado com uma redução estatisticamente significativa da expressão de LTC4S ($p < 0,05$). No tecido gengival não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos experimentais analisados ($p > 0,05$).

Por fim, ao analisar a expressão de CysLTR1 (Figura 5.18), não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Sham, Periodontite e Montelukaste, independente do tecido periodontal analisado ($p > 0,05$).

Figura 5.10 – Efeito de Montelukaste sobre expressão gênica de Colágeno tipo I a partir da coleta de tecido gengival na região de primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos no período experimental de 14 dias, na dose de Montelukaste de 30 mg/kg/dia

Média ± desvio padrão. $p > 0,05$ (n = 7 animais/ grupo)

Fonte: a autora

Figura 5.11 – Efeito de Montelukaste sobre expressão gênica de RUNX2 a partir do ligamento periodontal e osso alveolar na região de primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos no período experimental de 14 dias

Média ± desvio padrão. * $p < 0,05$ versus Sham; # $p < 0,05$ versus grupo Periodontite (n = 7 animais/ grupo)

Fonte: a autora

Figura 5.12 – Efeito de Montelukaste sobre expressão gênica de RANK a partir da coleta do ligamento periodontal e osso alveolar na região de primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos no período experimental de 14 dias

Média ± desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ versus Sham (n = 7 animais/ grupo)

Fonte: a autora

Figura 5.13 – Efeito de Montelukaste sobre expressão gênica de RANKL a partir da coleta do ligamento periodontal e osso alveolar na região de primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos no período experimental de 14 dias

Média ± desvio padrão. $p > 0,05$ (n = 7 animais/ grupo)

Fonte: a autora

Figura 5.14 – Efeito de Montelukaste sobre expressão gênica de OPG a partir da coleta do ligamento periodontal e osso alveolar na região de primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos no período experimental de 14 dias

Média ± desvio padrão. $p > 0,05$ ($n = 7$ animais/ grupo)

Fonte: a autora

Figura 5.15 – Efeito de Montelukaste sobre expressão gênica de LTA4H a partir da coleta de tecido gengival, bem como ligamento periodontal e osso alveolar na região de primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos no período experimental de 14 dias

Média ± desvio padrão. [#] $p < 0,05$ versus grupo Periodontite ($n = 5$ animais/ grupo). TG: tecido gengival; LP + OA: tecido de ligamento periodontal e osso alveolar

Fonte: a autora

Figura 5.16 – Efeito de Montelukaste sobre expressão gênica de BLT1 a partir da coleta de tecido gengival, bem como ligamento periodontal e osso alveolar na região de primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos no período experimental de 14 dias

Média ± desvio padrão. [#]p<0,05 *versus* grupo Periodontite (n = 5 animais/ grupo). TG: tecido gengival; LP + OA: tecido de ligamento periodontal e osso alveolar

Fonte: a autora

Figura 5.17 – Efeito de Montelukaste sobre expressão gênica de LTC4S a partir da coleta de tecido gengival, bem como ligamento periodontal e osso alveolar na região de primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos no período experimental de 14 dias

Média ± desvio padrão. ^{**}p<0,01 *versus* Sham; ^{###}p<0,001 *versus* grupo Periodontite (n = 5 animais/ grupo). TG: tecido gengival; LP + OA: tecido de ligamento periodontal e osso alveolar

Fonte: a autora

Figura 5.18 – Efeito de Montelukaste sobre expressão gênica de CysLTR1 a partir da coleta de tecido gengival, bem como ligamento periodontal e osso alveolar na região de primeiro molar inferior no qual houve indução de periodontite pelo método da ligadura em ratos no período experimental de 14 dias

Média $\pm$ desvio padrão. $p > 0,05$ ($n = 5$ animais/ grupo). TG: tecido gengival; LP + OA: tecido de ligamento periodontal e osso alveolar

Fonte: a autora

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito do uso de antagonista do receptor de leucotrienos sobre a periodontite experimental induzida pelo método da ligadura em ratos e demonstrou pela primeira vez que o uso de Montelukaste levou a uma diminuição da perda óssea alveolar, com uma elevação da expressão de RUNX2, bem como uma diminuição da infiltração granulocítica analisada pela atividade de mieloperoxidase.

Para indução da periodontite experimental foi utilizado o método da colocação de ligadura bilateral nos primeiros molares inferiores, o qual se mostrou efetivo pois esteve relacionado com uma maior perda óssea alveolar e um aumento da atividade granulocítica. O uso da ligadura é um método de indução de periodontite experimental amplamente utilizado e com eficácia comprovada, sendo utilizado e documentado desde a década de 70 (Weiner et al., 1979; Holzhausen et al., 2011; Spolidorio et al., 2014). O mecanismo pelo qual a ligadura promove a periodontite experimental não se baseia no trauma mecânico. A colocação do fio de algodão na região do sulco induz o acúmulo de biofilme, promovendo a ativação do sistema imunoinflamatório, o que leva à inflamação tecidual e a perda óssea alveolar. Além disso, o biofilme é muito similar ao biofilme humano, sendo principalmente composto por espécies de *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Prevotella nigrescens*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Vargas-Sanchez et al., 2017).

O Montelukaste pertence ao grupo dos antagonistas seletivos do receptor de leucotrienos por ter seu mecanismo de ação baseado no bloqueio reversível do receptor de Cis-LTs, atuando especificamente sobre CisLTR1, de maneira seletiva sobre LTD4 (Riccioni et al., 2007; Ersoy et al., 2008; Tintinger et al., 2010; Mohamadin et al., 2011; Calapai et al., 2014; Ibrahim et al., 2014). Ainda, como mecanismo de ação secundário, dose-dependente, o mesmo pode ser considerado um inibidor de 5-LO e de LTB4 (Anderson et al., 2009; Tintinger et al., 2010). Desta forma, foi realizada a análise de expressão gênica de BLT1, CisLTRA, LTA4H e LTC4S para verificar a efetividade da dose do fármaco, bem como a via de administração escolhida (gavagem).

O uso de Montelukaste na dose de 30 mg/kg/dia esteve relacionado com uma redução significativa na expressão da enzima LTA4H, a qual participa do início da cascata da formação de leucotrienos; bem como uma redução da expressão do receptor BLT1 e da enzima LTC4S. Com relação a expressão gênica de CisLTR1, foi possível verificar uma tendência de redução de sua expressão no grupo que recebeu o medicamento antagonista do receptor de leucotrienos.

Os dados do estudo atual corroboram com estudo conduzido em ratos submetidos à isquemia intestinal, no qual, ao receberem Montelukaste em diferentes doses (0,2, 2 e 20 mg/kg), foi verificada uma redução na expressão de CisLTR1 (Wu et al., 2015). Dessa forma, pode-se concluir que o uso de Montelukaste no presente estudo promoveu uma redução na expressão de leucotrienos, atuando tanto sobre os cisteinil-leucotrienos, bem como sobre o LTB₄.

Após verificação do mecanismo de ação de Montelukaste sobre os LTs, foi analisada a influência do fármaco sobre a perda óssea alveolar. Como resultado das análises macroscópica e histopatológica, em todos os períodos experimentais, o grupo Periodontite diferiu estatisticamente do grupo Sham, o que comprova a eficácia do método da ligadura em induzir a periodontite experimental e, consequentemente, a perda óssea alveolar. Estudo recente, também conduzido em ratos, com o objetivo de identificar a cinética do processo de perda óssea alveolar por meio da comparação de diferentes análises metodológicas, mostrou que, por meio da análise macroscópica, foi possível identificar a perda óssea alveolar induzida pelo método da ligadura a partir do 7º dia, a qual progride e, posteriormente se estabiliza até o período experimental de 60 dias (Vargas-Sanchez et al., 2017).

O grupo Montelukaste, o qual também foi submetido à indução da periodontite experimental pelo método da ligadura, apresentou uma perda óssea alveolar estatisticamente maior que o grupo Sham, independente do período experimental. No entanto, a partir do período experimental de 14 dias, os animais que receberam tratamento com Montelukaste passaram a apresentar uma perda óssea alveolar estatisticamente menor que o grupo Periodontite, demonstrando a eficácia do fármaco na redução da perda óssea alveolar. Em estudo conduzido com camundongos que receberam carga mecânica durante 12 dias e foram tratados com Montelukaste na dose de 2 mg/kg/dia, via gavagem, o mesmo também esteve relacionado com uma redução da perda óssea (Moura et al., 2014). Ainda, estudo realizado *in vitro* demonstrou que a presença de Montelukaste em cultura celular de linhagens ósseas levou a supressão da formação de osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção óssea, tanto nas fases precoces, como nas tardias da osteoclastogênese (Lee et al., 2012).

Estudo conduzido em camundongos, os quais foram submetidos à fratura do fêmur e receberam Montelukaste na dose de 1,5 mg/kg/dia, via gavagem, durante 28 dias, demonstrou que o medicamento promoveu uma melhora no reparo da fratura óssea apenas nos períodos de 7 a 14 dias (Wixted et al., 2009). Ainda, estudo realizado em ratas Wistar fêmeas submetidas à fratura de tibia em associação com o uso de Montelukaste durante 3 e 6 semanas, falhou em demonstrar a eficácia do uso de antagonista do receptor de leucotrienos sobre a formação óssea (Cakici et al., 2011).

Esses dados divergentes em relação aos resultados do estudo atual podem ser explicados devido à diferença do método utilizado. Em nosso estudo foi avaliado o efeito anti-osteoclastogênese do Montelukaste, enquanto que nos trabalhos citados no parágrafo anterior, os autores discorrem sobre a ausência de um papel do fármaco na regeneração óssea. Nos estudos reportados acima, o modelo experimental é de fratura óssea, o qual está relacionado com ossificação endocondral, formação de calo ósseo, e união da fratura (Wixted et al., 2009; Cakici et al., 2011). Os estudos mostram que o aumento da ossificação endocondral ocorre até 14 dias após a fratura, indicando que o maior processo de nova formação óssea ocorre neste período (Wixted et al., 2009; Cakici et al., 2011). Desta forma, sugere-se que no estudo de Cakici et al. (2011) não foi demonstrada a eficácia do Montelukaste, pois o calo ósseo já havia sido formado nas primeiras duas semanas após fratura. No modelo de periodontite experimental o mecanismo de remodelamento ósseo é mais direto, ou seja, o fármaco deve impedir ou reduzir o processo de reabsorção óssea alveolar, o qual não é influenciado pela ossificação endocondral (Madeira et al., 2017). Assim, o estudo atual demonstrou que o uso de antagonista do receptor de leucotrienos promoveu uma redução da perda óssea alveolar nos períodos de 14 e 21 dias.

O remodelamento ósseo é regulado pelas células osteoblásticas e osteoclásticas, as quais são responsáveis pela deposição e reabsorção óssea, respectivamente. A formação de osteoclastos é dependente da ligação entre RANK e RANKL, iniciando assim a reabsorção óssea (Zhen; Shi, 2018). Neste sentido, com o intuito de identificar o mecanismo pelo qual o Montelukaste reduz a perda óssea alveolar, foi realizada a análise de expressão gênica de fatores associados com o metabolismo ósseo, como RANK, RANKL, OPG, RUNX2.

A partir de resultados encontrados em dois estudos laboratoriais realizados em ratos, a perda óssea atinge seu pico no período experimental de 14 dias, o qual permanece constante até os 60 dias (Spolidorio et al., 2004; Vargas-Sanchez et al., 2017). Com base nestes dados, todas as análises foram realizadas apenas no período experimental de 14 dias, na dose de 30 mg/dia, visto que o efeito de Montelukaste é dose-dependente (Wei et al., 2018).

Estudo anterior aponta que a periodontite experimental provoque uma redução estatisticamente significativa na expressão gênica do fator de transcrição RUNX2, o qual está relacionado com a diferenciação de osteoblastos, quando comparado com o grupo controle (Karatas et al., 2019). Esse fato pode ocorrer em consequência do aumento da expressão de TNF- α devido ao processo inflamatório ativado na presença de biofilme, a qual acaba por inibir a expressão de RUNX2, bem como promover a sua degradação (Meng et al., 2018). Por outro lado, o uso de Montelukaste esteve relacionado com um aumento estatisticamente significativo

da expressão gênica do fator de transcrição RUNX no tecido ósseo e ligamento periodontal. Os resultados atuais corroboram com estudo conduzido *in vitro* com células pré-osteoblásticas, o qual demonstrou que, ao adicionar o fármaco Montelukaste na cultura, nas concentrações de 15 e 30 $\mu\text{mol/L}$, durante 24 horas, o mesmo induziu um aumento da expressão de RUNX2 (Wei et al., 2018). Desta forma, pode-se sugerir que o uso de Montelukaste pode auxiliar o processo de neoformação óssea devido ao aumento da expressão de RUNX2 com a consequente ativação de osteoblastos.

Ainda, tanto o grupo Periodontite como o grupo Montelukaste obtiveram um aumento da expressão de RANK no tecido ósseo e ligamento periodontal. Por outro lado, não houve alteração significativa na expressão de RANKL e OPG em nenhum dos grupos experimentais. No entanto, embora o uso de Montelukaste não tenha reduzido de maneira estatisticamente significativa a expressão de RANK, é possível verificar uma tendência de redução da mesma, além de ser possível verificar uma expressiva tendência de aumento da expressão de OPG. No estudo de Moura et al. (2014), já descrito anteriormente, a carga mecânica aplicada sobre os dentes dos camundongos promoveu um aumento da expressão de RANK, porém, quando administrado o Montelukaste, houve uma redução estatisticamente significativa da expressão do mesmo. Além do mais, os autores encontraram um aumento estatisticamente significativo na expressão de RANKL/ OPG. Em estudo *in vitro* realizado com cultura celular osteoclástica, ao ser adicionado Montelukaste, houve uma redução da ligação entre RANK e RANKL, devido a uma redução da expressão de RANK, sugerindo assim o efeito do medicamento sobre a inibição da formação de osteoclastos e, consequentemente a perda óssea (Kang et al, 2018). Quanto maior a expressão de RANKL/ OPG, e menor a expressão de RANK, maior será o processo de neoformação óssea (Moura et al., 2014). Assim, pode-se dizer que, no estudo atual, a indução da periodontite experimental promoveu um aumento da expressão de RANK, o qual está relacionado com o processo de reabsorção óssea pela ativação osteoclástica.

Quando analisada a degradação de colágeno nos tecidos periodontais, é possível afirmar que até o período experimental de 14 dias não houve alteração estatisticamente significativa entre os grupos. Porém, no período experimental de 21 dias, tanto o grupo Periodontite como o grupo Montelukaste mostraram uma redução na presença de fibras colágenas em comparação ao grupo Sham. Este resultado contrapõe a literatura, visto que os estudos mostram que a maior degradação de colágeno deveria ocorrer no início do processo inflamatório (7 dias), devido a grande presença de células inflamatórias na região; ao passo que, no período de 21 dias deveria estar ocorrendo uma adaptação tecidual e não uma degradação de colágeno acentuada (Li; Amar, 2007; Chang et al., 2013). À medida que os neutrófilos, primeiras células de defesa,

migram para região em que há infecção periodontal, MMPs também realizam esse processo (Pouliot et al., 2000). Neste sentido, como as MMPs estão envolvidas na destruição de colágeno, é possível explicar porque a maior destruição tecidual ocorre nos períodos iniciais da periodontite experimental (Yang et al., 2017).

No que se refere a eficácia de Montelukaste sobre a atividade colagenocítica, os dados são controversos. Em estudo conduzido em ratos, com o objetivo de analisar a eficácia de Montelukaste sobre a cicatrização de tendão, foi observado que o fármaco esteve relacionado com a presença de fibras colágenas bem orientadas. No entanto, esse resultado pode ser explicado devido ao fármaco promover uma diminuição do turnover, e não uma indução da formação de novas fibras colágenas (Polat et al., 2013). Estudos conduzidos por Tolazzi et al. (2009) e Peters-Golden e Brock (2000) afirmam que o Montelukaste tem efeito inibidor sobre a maturação de colágeno. Ainda, concordando com essa afirmação, estudo conduzido em camundongos demonstrou que o bloqueio de leucotrienos devido ao uso de Montelukaste, administrado juntamente com a ração na concentração de 50 µg/g por peso do animal/dia, durante 6 semanas, esteve relacionado com uma diminuição da deposição de colágeno na região de pulmão (Ochkur et al., 2013). Desta forma, pode-se sugerir que o uso de Montelukaste pode interferir de maneira negativa sobre a produção e maturação de colágeno.

A partir da colocação da ligadura na região dos primeiros molares inferiores, uma resposta inflamatória é ativada. Dentre as células de defesa, os neutrófilos são os primeiros a chegar na região em que ocorreu o processo infeccioso. Para exercer sua função protetora, o neutrófilo apresenta a enzima mieloperoxidase, a qual tem importante função antibacteriana, além de contribuir para seu melhor funcionamento celular em situações de agressão (Reber et al., 2017). Porém, sabe-se que embora o neutrófilo apresente importante mecanismo protetor, o mesmo acaba provocando, de maneira indireta, destruição tecidual (Reber et al., 2017). Neste sentido, o trabalho avaliou a infiltração granulocítica pela atividade de MPO no tecido gengival dos animais. Em todos os períodos experimentais, houve um aumento da expressão da enzima no grupo Periodontite em comparação ao grupo Sham, comprovando mais uma vez a eficácia do método de ligadura para indução da periodontite experimental. O Montelukaste foi efetivo na redução da expressão da enzima no período experimental de 7 dias e no período de 14 dias quando administrada a dose de 30 mg/kg.

Em estudo de isquemia testicular aguda conduzido em ratos, o uso de Montelukaste foi capaz de inibir a infiltração granulocítica nos períodos iniciais no processo inflamatório (Silay et al., 2014). Ainda, outro estudo conduzido em ratos demonstrou que o uso de Montelukaste,

na dose de 10 mg/kg, foi capaz de impedir o dano renal agudo provocado por fármaco específico devido a redução de mieloperoxidase (Abdel-Raheem et al., 2014). Desta forma, torna-se possível afirmar a efetividade de Montelukaste na redução da atividade granulocítica de neutrófilos no início do processo inflamatório.

De maneira interessante, em nenhum período experimental o uso de Montelukaste foi capaz de promover alteração significativa sobre os marcadores relacionados com o estresse oxidativo analisados no estudo (glutathione, proteínas carboniladas e proteínas modificadas por 4HNE). A glutathione foi escolhida como um marcador para avaliar o estresse oxidativo pois autores apontam que há um aumento de sua expressão na periodontite experimental (de Araújo et al., 2013), além de participar da formação de espécies reativas de oxigênio (Schupp et al., 2008). No que se refere a escolha da análise de proteínas carboniladas, foi demonstrado que suas altas concentrações na saliva se relacionam com um alto índice de lesão oxidativa. Além disso, ao analisar sua expressão na presença de doença periodontal, os indivíduos doentes apresentaram níveis elevados de proteínas carboniladas (Sculley; Langley-Evans, 2003). Outro estudo demonstrou que a presença de *P. gingivalis* induziu a produção de EROs na corrente sanguínea associados a um aumento da expressão de proteínas carboniladas (Bengtsson et al., 2008). Ainda, foi demonstrado que a carbonilação de proteínas pode ser gerada devido a formação de produtos aldeídos reativos, como 4HNE (Bengtsson et al., 2008).

Neste sentido, no presente estudo também buscou-se analisar a expressão de 4HNE. A peroxidação lipídica está sempre associada com a formação de aldeídos reativos (Onder et al., 2017). Dentre esses aldeídos, o 4HNE está relacionado com a peroxidação do ácido araquidônico, o qual origina o LT, alvo de estudo do trabalho em questão (Onder et al., 2017). Ao analisar a saliva de pacientes com doença periodontal, foi encontrado um aumento da expressão de 4HNE quando comparado com indivíduos saudáveis (Hendek et al., 2015). Ainda, outro estudo demonstrou um aumento de sua expressão no soro sanguíneo de pacientes com doença periodontal (Onder et al., 2017).

Em estudo conduzido por Barin et al. (2017), o grupo constatou que apenas no período experimental de 15 dias após a colocação da ligadura era possível identificar uma diferença na expressão de glutathione entre o grupo controle e o grupo submetido à periodontite experimental. Porém, diferenças entre os níveis de peroxidação lipídica já foram identificadas a partir do sétimo dia, as quais foram mantidas até o último período experimental analisado (30 dias). Em contrapartida, os dados do estudo atual concordam com os resultados encontrados no estudo de Kirzioglu et al. (2017), o qual também não encontrou diferença significativa na expressão de glutathione e da enzima superóxido dismutase entre o grupo submetido à periodontite

experimental e o grupo controle, independente do período analisado. Assim, embora grande parte dos estudos disponíveis na literatura tenham sugerido que a periodontite está relacionada com um aumento da expressão de marcadores associados ao estresse oxidativo, o estudo em questão não encontrou tal alteração.

No que se refere à segurança clínica do Montelukaste, nenhum animal do estudo apresentou efeito colateral em decorrência do uso do medicamento. Todos ganharam peso no decorrer do experimento e mantiveram seus comportamentos inalterados. Uma revisão sistemática realizada com estudos clínicos randomizados concluiu que a ocorrência de efeitos colaterais consequentes ao uso do Montelukaste é semelhante ao grupo controle, demonstrando assim a segurança clínica do fármaco (Joos et al., 2008).

Diante dos resultados do presente estudo, é importante salientar suas limitações. O trabalho foi conduzido em ratos Wistar machos e, apesar da grande semelhança fisiológica, celular e molecular entre estes roedores e os humanos, a extrapolação dos resultados deve ser realizada com cautela. Além disso, a dose de 30 mg/kg foi testada apenas em um período experimental. Neste sentido, estudos futuros são necessários para testar o uso do antagonista de leucotrienos em diferentes doses e períodos experimentais, bem como testar o mesmo em outras formulações e em outros modelos experimentais. Por fim, para que o Montelukaste possa ser utilizado como modulador da resposta do hospedeiro em pacientes com doença periodontal, mais estudos devem ser conduzidos.

7 CONCLUSÃO

O uso de antagonista do receptor de leucotrienos em ratos submetidos à periodontite experimental levou a uma redução significativa da perda óssea alveolar, sendo esse efeito possivelmente explicado pela redução do infiltrado granulocítico e pelo aumento da expressão gênica de RUNX2 nos tecidos periodontais. Conclui-se assim que a utilização de antagonista do receptor de leucotrienos modulou o desenvolvimento da periodontite induzida pelo método da ligadura em ratos.

REFERÊNCIAS¹

- Abdel-Raheem IT, Khedr NF. Renoprotective effects of montelukast, a cysteinyl leukotriene receptor antagonist, against methotrexate-induced kidney damage in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2014 Apr;387(4):341-53. doi: 10.1007/s00210-013-0949-x.
- Agarwal VK, Mchutchison JG, Hoofnagle JH, et al. Important elements for the diagnosis of drug-induced liver injury. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010 May;8:463–70. doi: 10.1016/j.cgh.2010.02.008.
- Akino K, Mineda T, Mori N, et al. Attenuation of cysteinyl leukotrienes induces human mesenchymal stem cell differentiation. *Wound Repair Regen*. 2006 May-Jun;14(3):343-49.
- Albandar JM, Rams TE. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontol 2000*. 2002;29:7-10.
- Anderson R, Theron AJ, Gravett CM, et al. Montelukast inhibits neutrophil pro-inflammatory activity by a cyclic AMP-dependent mechanism. *Br J Pharmacol*. 2009 Jan;156(1):105-15. doi: 10.1111/j.1476-5381.2008.00012.x.
- Arabaci T, Kermen E, Ozkanlar S, et al. Therapeutic Effects of Melatonin on Alveolar Bone Resorption After Experimental Periodontitis in Rats: A Biochemical and Immunohistochemical Study. *J Periodontol*. 2015 Jul;86(7):874-81. doi: 10.1902/jop.2015.140599.
- Armitage GC, Robertson PB. The biology, prevention, diagnosis and treatment of periodontal diseases: scientific advances in the United States. *J Am Dent Assoc*. 2009 Sep;140 Suppl 1:36S-43S.
- Asaad H, Al-Sabbagh R, Al-Tabba D, et al. Effect of the leukotriene receptor antagonist montelukast on orthodontic tooth movement. *J Oral Sci*. 2017;59(2):297-302. doi: 10.2334/josnusd.16-0482.
- Back M, Airila-Mansson S, Jogestrand T, Soder B, Soder PO. Increased leukotriene concentrations in gingival crevicular fluid from subjects with periodontal disease and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2007 Aug;193(2):389-94.
- Barbosa JS, Almeida Paz FA, Braga SS. Montelukast medicines of today and tomorrow: from molecular pharmaceuticals to technological formulations. *Drug Deliv*. 2016;23(9):3257-65.
- Barin LM, Barcelos RCS, Vey LT, et al. Role of the adjunctive antimicrobial photodynamic therapy to periodontal treatment at plasmatic oxidative stress and vascular behavior. *J Photochem Photobiol B*. 2017 Aug;173:538-44.
- Bengtsson T, Karlsson H, Gunnarsson P, et al. The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* cleaves apoB-100 and increases the expression of apoM in LDL in whole blood leading to cell proliferation. *J Intern Med*. 2008 May;263(5):558-71. doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01917.x.

¹De acordo com estilo Vancouver.

Bentli R, Ciftci O, Cetin A, et al. Anti-inflammatory Montelukast prevents toxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: Oxidative stress, histological alterations in liver, and serum cytokine levels. *Toxicol Ind Health*. 2016 May;32(5):769-76. doi: 10.1177/0748233713505894.

Bertolini A, Ottani A, Sandrini M. Selective COX-2 inhibitors and dual acting anti-inflammatory drugs: critical remarks. *Curr Med Chem*. 2002 May;9(10):1033-43.

Bezerra MM, de Lima V, Alencar VB, et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2000 Jun;71(6):1009-14.

Bitencourt CS, Bessi VL, Huynh DN, et al. Cooperative role of endogenous leucotrienes and platelet-activating factor in ischaemia-reperfusion-mediated tissue injury. *J Cell Mol Med*. 2013 Dec;17(12):1554-65. doi: 10.1111/jcmm.12118.

Boillot A, Demmer RT, Mallat Z, et al. Periodontal microbiota and phospholipases: The Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *Atherosclerosis*. 2015 Oct;242(2):418-23. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.07.039.

Bonewald LF, Flynn M, Qiao M, et al. Mice lacking 5-lipoxygenase have increased cortical bone thickness. *Adv Exp Med Biol*. 1997;433:299-302.

Borrell LN, Burt BA, Taylor GW. Prevalence and trends in periodontitis in the USA: the NHANES, 1988 to 2000. *J Dent Res*. 2005 Oct;84(10):924-30.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May;72:248-54.

Bragger U, Muhle T, Fourmoussis I, et al. Effect of the NSAID flurbiprofen on remodelling after periodontal surgery. *J Periodontal Res*. 1997 Oct;32(7):575-82.

Brunsvold MA, Chaves ES, Kornman KS, et al. Effects of a bisphosphonate on experimental periodontitis in monkeys. *J Periodontol*. 1992 Oct;63(10):825-30.

Buck ML. Montelukast: A review of recent studies in pediatric asthma and allergic rhinitis. *Pediatr Pharmacother*. 2015;21.

Burns FR, Stack MS, Gray RD, et al. Inhibition of purified collagenase from alkali-burned rabbit corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1989 Jul;30(7):1569-75.

Cakici H, Hapa O, Gideroglu K, et al. The effects of leukotriene receptor antagonist montelukast on histological, radiological and densitometric parameters of fracture healing. *Ekleml Hastaliklari Cerrahisi*. 2011;22(1):43-7.

Calapai G, Casciaro M, Miroddi M, et al. Montelukast-induced adverse drug reactions: a review of case reports in the literature. *Pharmacol*. 2014;94(1-2):60-70. doi: 10.1159/000366164.

Caton J, Ryan ME. Clinical studies on the management of periodontal diseases utilizing subantimicrobial dose doxycycline (SDD). *Pharmacol Res.* 2011 Feb;63(2):114-20. doi: 10.1016/j.phrs.2010.12.003.

Caton JG, Armitage G, Berglundh T, et al. A new classification scheme for periodontal and periimplant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol.* 2018 Jun;89 Suppl 1:S1-S8. doi: 10.1002/JPER.18-0157.

Caton JG, Ciancio SG, Blieden TM, et al. Treatment with subantimicrobial dose doxycycline improves the efficacy of scaling and root planing in patients with adult periodontitis. *J Periodontol.* 2000 Apr;71(4):521-32.

Caton JG, Ciancio SG, Blieden TM, et al. Subantimicrobial dose doxycycline as an adjunct to scaling and root planing: post-treatment effects. *J Clin Periodontol.* 2001 Aug;28(8):782-9.

Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, et al. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2014 Feb (1);64:57-80. doi: 10.1111/prd.12002.

Chang PC, Liang K, Lim JC, et al. A comparison of the thresholding strategies of micro-CT for periodontal bone loss: a pilot study. *Dentomaxillofac Radiol.* 2013;42(2):66925194. doi: 10.1259/dmfr/66925194.

Coskun AK, Yigiter M, Oral A, et al. The effects of montelukast on antioxidant enzymes and proinflammatory cytokines on the heart, liver, lungs, and kidneys in a rat model of cecal ligation and puncture-induced sepsis. *ScientificWorldJournal.* 2011 Jul;11:1341-56. doi: 10.1100/tsw.2011.122.

Cottrell JA, O'Connor JP. Pharmacological inhibition of 5-lipoxygenase accelerates and enhances fracture-healing. *Journal Bone Joint Surg Am.* 2009 Nov;91(11):2653-65. doi: 10.2106/JBJS.H.01844.

Crout RJ, Lee HM, Schroeder K, et al. The "cyclic" regimen of low-dose doxycycline for adult periodontitis: a preliminary study. *J Periodontol.* 1996 May;67(5):506-14.

de Almeida JM, Ervolino E, Bonfietti LH, et al. Adjuvant Therapy With Sodium Alendronate for the Treatment of Experimental Periodontitis in Rats. *J Periodontol.* 2015 Oct;86(10):1-18. doi: 10.1902/jop.2015.150166.

de Araújo RF Jr, Souza TO, de Moura LM, et al. Atorvastatin decreases bone loss, inflammation and oxidative stress in experimental periodontitis. *PLoS One.* 2013 Oct;8:e75322. doi: 10.1371/journal.pone.0075322.

Dengiz GO, Odabasoglu F, Halici Z, et al. Gastroprotective and antioxidant effects of montelukast on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J Pharmacol Sci.* 2007 Sep;105(1):94-102.

Dentino A, Lee S, Mailhot J, et al. Principles of periodontology. *Periodontol 2000.* 2013 Feb;61(1):16-53. doi: 10.1111/j.1600-0757.2011.00397.x.

- Dixit N, Wu DJ, Belgacem YH, et al. Leukotriene B4 activates intracellular calcium and augments human osteoclastogenesis. *Arthritis Res Ther*. 2014 Dec;16(6):496. doi: 10.1186/s13075-014-0496-y.
- ElAttar TM. Prostaglandin E2 in human gingiva in health and disease and its stimulation by female sex steroids. *Prostaglandins*. 1976 Feb;11(2):331-41.
- El-Swefy S, Hassanen SI. Improvement of hepatic fibrosis by leukotriene inhibition in cholestatic rats. *Ann Hepatol*. 2009 Jan-Mar;8(1):41-9.
- Emingil G, Cinarcik S, Baylas H, et al. Levels of leukotriene B4 in gingival crevicular fluid and gingival tissue in specific periodontal diseases. *J Periodontol*. 2001 Aug;72(8):1025-31.
- Ersahin M, Cevik O, Akakin D, et al. Montelukast inhibits caspase-3 activity and ameliorates oxidative damage in the spinal cord and urinary bladder of rats with spinal cord injury. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2012 Dec;99(3-4):131-9. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2012.09.002.
- Ersoy Y, Cikler E, Cetinel S, et al. Leukotriene D4 receptor antagonist montelukast alleviates water avoidance stress-induced degeneration of the gastrointestinal mucosa. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2008 Mar;78(3):189-97. doi: 10.1016/j.plefa.2008.01.007.
- FitzGerald GA, Patrono C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med*. 2001 Aug;345(6):433-42.
- Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action and clinical use in osteoporosis--an update. *Horm Metab Res*. 1997 Mar;29(3):145-50.
- Fredman G, Oh SF, Ayilavarapu S, et al. Impaired phagocytosis in localized aggressive periodontitis: rescue by Resolvin E1. *PloS One*. 2011;6(9):e24422. doi: 10.1371/journal.pone.0024422.
- Gapski R, Barr JL, Sarment DP, et al. Effect of systemic matrix metalloproteinase inhibition on periodontal wound repair: a proof of concept trial. *J Periodontol*. 2004 Mar;75(3):441-52.
- Garcia VG, Gualberto Junior EC, Fernandes LA, et al. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *J Periodontol*. 2013 Apr;84(4):556-65. doi: 10.1902/jop.2012.120163.
- Giannobile WV. Host-response therapeutics for periodontal diseases. *J Periodontol*. 2008 Aug;79(8 Suppl):1592-600. doi: 10.1902/jop.2008.080174.
- Goes P, Melo IM, Silva LM, et al. Low-dose combination of alendronate and atorvastatin reduces ligature-induced alveolar bone loss in rats. *J Periodont Res*. 2014 Feb;49(1):45-54. doi: 10.1111/jre.12077.
- Gokhale SR, Padhye AM. Future prospects of systemic host modulatory agents in periodontal therapy. *Br Dent J*. 2013 May;214(9):467-71. doi: 10.1038/sj.bdj.2013.432.

Goldhaber P. Tissue culture studies of bone as a model system for periodontal research. *J Dent Res.* 1971 Mar-Apr;50(2):278-87.

Goldhaber P, Rabadjija L, Beyer WR, et al. Bone resorption in tissue culture and its relevance to periodontal disease. *J Am Dent Assoc.* 1973 Oct;87(5):1027-33.

Golub LM, Ciancio S, Ramamamurthy NS, et al. Low-dose doxycycline therapy: effect on gingival and crevicular fluid collagenase activity in humans. *J Periodontal Res.* 1990 Nov;25(6):321-30.

Golub LM, Elburki MS, Walker C, et al. Non-antibacterial tetracycline formulations: host-modulators in the treatment of periodontitis and relevant systemic diseases. *Int Dent J.* 2016 Jun;66(3):127-35. doi: 10.1111/idj.12221.

Golub LM, Lee HM, Lehrer G, et al. Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action. *J Periodontal Res.* 1983 Sep;18(5):516-26.

Golub LM, Lee HM, Greenwald RA, et al. A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult periodontitis. *Inflamm Res.* 1997 Aug;46(8):310-9.

Golub LM, Lee HM, Ryan ME, et al. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res.* 1998 Nov;12(2):12-26.

Golub LM, McNamara TF, Ryan ME, et al. Adjunctive treatment with subantimicrobial doses of doxycycline: effects on gingival fluid collagenase activity and attachment loss in adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2001 Feb;28(2):146-56.

Golub LM, Ramamurthy NS, McNamara TF, et al. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991;2(3):297-321.

Golub LM, Ramamurthy N, McNamara TF, et al. Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1984 Nov;19(6):651-5.

Golub LM, Sorsa T, Lee HM, et al. Doxycycline inhibits neutrophil (PMN)-type matrix metalloproteinases in human adult periodontitis gingiva. *J Clin Periodontol.* 1995 Feb;22(2):100-9.

Golub LM, Wolff M, Roberts S, et al. Treating periodontal diseases by blocking tissue-destructive enzymes. *J Am Dent Assoc.* 1994 Feb;125(2):163-9.

Gomes BD, Hausmann E, Wienfeld N, et al. Prostaglandins: bone resorption stimulating factors released from monkey gingiva. *Calcif Tissue Res.* 1976 Mar;19(4):285-93.

Goodson JM, Dewhirst FE, Brunetti A. Prostaglandin E2 levels and human periodontal disease. *Prostaglandins.* 1974 Apr;6(1):81-5.

- Goodson JM, Tanner AC, Haffajee AD, et al. Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1982 Nov;9(6):472-81.
- Haffajee AD, Dibart S, Kent RL, et al. Clinical and microbiological changes associated with the use of 4 adjunctive systemically administered agents in the treatment of periodontal infections. *J Clin Periodontol*. 1995 Aug;22(8):618-27.
- Hansen AK, Indrevik JT, Figenschau Y, et al. Human articular chondrocytes express functional leukotriene B4 receptors. *J Anat*. 2015 Mar;226(3):268-77. doi: 10.1111/joa.12275.
- He P, Laidlaw T, Maekawa A, et al. Oxidative stress suppresses cysteinyl leukotriene generation by mouse bone marrow-derived mast cells. *J Biol Chem*. 2011 Mar;286(10):8277-86. doi: 10.1074/jbc.M110.205567.
- Hemmati AA, Ghorbanzadeh B, Behmanesh MA. Potentiation of indomethacin-induced anti-inflammatory response by montelukast in formalin-induced inflammation in rats. *Acta Med Iran*. 2013;51(10):675-80.
- Hendek MK, Erdemir EO, Kisa U, et al. Effect of initial periodontal therapy on oxidative stress markers in gingival crevicular fluid, saliva, and serum in smokers and non-smokers with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2015 Feb;86(2):273-82. doi: 10.1902/jop.2014.140338.
- Herrera BS, Coimbra LS, da Silva AR, et al. The H2S-releasing naproxen derivative, ATB-346, inhibits alveolar bone loss and inflammation in rats with ligature-induced periodontitis. *Med Gas Res*. 2015 Feb;5:4. doi: 10.1186/s13618-015-0025-3.
- Herrera BS, Martins-Porto R, Campi P, et al. Local and cardiorenal effects of periodontitis in nitric oxide-deficient hypertensive rats. *Arch Oral Biol*. 2011 Jan;56(1):41-7. doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.08.011.
- Holzhausen M, Balejo RD, Lara GM, et al. Nafamostat mesilate, a potent tryptase inhibitor, modulates periodontitis in rats. *Clin Oral Investig*. 2011 Dec;15(6):967-73. doi: 10.1007/s00784-010-0463-1.
- Holzhausen M, Rossa Junior C, Marcantonio Junior E, et al. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2002 Sep;73(9):1030-6.
- Holzhausen M, Spolidorio LC, Vergnolle N. Proteinase-activated receptor-2 (PAR2) agonist causes periodontitis in rats. *J Dent Res*. 2005 Feb;84(2):154-9.
- Houshmand M, Holtfreter B, Berg MH, et al. Refining definitions of periodontal disease and caries for prediction models of incident tooth loss. *J Clin Periodontol*. 2012 Jul;39(7):635-44. doi: 10.1111/j.1600-051X.2012.01892.x.
- Hui Y, Cheng Y, Smalera I, et al. Directed vascular expression of human cysteinyl leukotriene 2 receptor modulates endothelial permeability and systemic blood pressure. *Circulation*. 2004 Nov;110(21):3360-66.

Hung SL, Lin YJ, Chien EJ, et al. Areca nut extracts-activated secretion of leukotriene B₄, and phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase and elevated intracellular calcium concentrations in human polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontal Res.* 2007 Oct;42(5):393-401.

Ibrahim MA, Amin EF, Ibrahim SA, et al. Montelukast and irbesartan ameliorate metabolic and hepatic disorders in fructose-induced metabolic syndrome in rats. *Eur J Pharmacol.* 2014 Feb;724:204-10. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.12.024.

Jeffcoat MK, Page R, Reddy M, et al. Use of digital radiography to demonstrate the potential of naproxen as an adjunct in the treatment of rapidly progressive periodontitis. *J Periodontal Res.* 1991 Sep;26(5):415-21.

Joos S, Miksch A, Szecsenyi J, et al. Montelukast as add-on therapy to inhaled corticosteroids in the treatment of mild to moderate asthma: a systematic review. *Thorax.* 2008 May;63(5):453-62. doi: 10.1136/thx.2007.081596.

Jozefowski S, Biedron R, Bobek M, et al. Leukotrienes modulate cytokine release from dendritic cells. *Immunol.* 2005 Dec;116(4):418-28.

Kang JH, Lim H, Lee DS, et al. Montelukast inhibits RANKL-induced osteoclast formation and bone loss via CysLTR1 and P2Y12. *Mol Med Rep.* 2018 Aug;18(2):2387-98. doi: 10.3892/mmr.2018.9179.

Kang JH, Ting Z, Moon MR, et al. 5-Lipoxygenase inhibitors suppress RANKL-induced osteoclast formation via NFATc1 expression. *Bioorg Med Chem.* 2015 Nov;23(21):7069-78. doi: 10.1016/j.bmc.2015.09.025.

Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, et al. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med.* 2007 May;13(5):552-9.

Karatas O, Balci Yuce H, Taskan MM, et al. The effect of vanillic acid on ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Arch Oral Biol.* 2019 May;103:1-7. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.05.010.

Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, et al. Global Burden of Severe Tooth Loss: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Dent Res.* 2014 Nov;93(11):20S-28S. doi: 10.1177/0022034514552491.

Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol.* 2006 Sep;169(3):987-98.

Kearns GL, Lu SS, Maganti L, et al. Pharmacokinetics and safety of montelukast oral granules in children 1 to 3 months of age with bronchiolitis. *J Clin Pharmacol.* 2008 Apr;48:502-11. doi: 10.1177/0091270008314251.

Khodir AE, Ghoneim HA, Rahim MA, et al. Montelukast attenuates lipopolysaccharide-induced cardiac injury in rats. *Hum Exp Toxicol.* 2016 Apr;35(4):388-97. doi: 10.1177/0960327115591372.

- Khodir AE, Ghoneim HA, Rahim MA, et al. Montelukast reduces sepsis-induced lung and renal injury in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2014 Oct;92(10):839-47. doi: 10.1139/cjpp-2014-0191.
- Kirzioglu FY, Tozum Bulut M, Dogan B, et al. Anti-inflammatory effect of rosuvastatin decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis. *J Oral Sci*. 2017;59(2):247-55. doi: 10.2334/josnuds.16-0398.
- Kittana N, Hattab S, Ziyadeh-Isleem A, et al. Montelukast, current indications and prospective future applications. *Expert Rev Respir Med*. 2016 Sep;10(9):943-56. doi: 10.1080/17476348.2016.1207533.
- Klein DC, Raisz LG. Prostaglandins: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinol*. 1970 Jun;86(6):1436-40.
- Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr., Rickard AH, et al. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000*. 2006;42:47-79.
- Kornman KS, Karl EH. The effect of long-term low-dose tetracycline therapy on the subgingival microflora in refractory adult periodontitis. *J Periodontol*. 1982 Oct;53(10):604-10.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug;227(5259):680-5.
- Lee JM, Park H, Noh AL, et al. 5-Lipoxygenase mediates RANKL-induced osteoclast formation via the cysteinyl leukotriene receptor 1. *J Immunol*. 2012 Dec;189(11):5284-92. doi: 10.4049/jimmunol.1003738.
- Lee W, Su Kim H, Lee GR. Leukotrienes induce the migration of Th17 cells. *Immunol Cell Biol*. 2015 May-Jun;93(5):472-9. doi: 10.1038/icb.2014.104.
- Li CH, Amar S. Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in a murine model. *J Periodontol*. 2007 Jun;78(6):1120-8.
- Liu D, Xu JK, Figliomeni L, et al. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med*. 2003 Jan;11(1):17-21.
- Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*. 1965 May-Jun;36:177-87.
- Madeira MFM, Queiroz-Junior CM, Corrêa JD, et al. The role of 5-lipoxygenase in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced alveolar bone loss. *J Clin Periodontol*. 2017 Aug;44(8):793-802. doi: 10.1111/jcpe.12755.
- Mamedova L, Capra V, Accomazzo MR, et al. CysLT1 leukotriene receptor antagonists inhibit the effects of nucleotides acting at P2Y receptors. *Biochem Pharmacol*. 2005 Dec;71(1-2):115-25.

- Manigrasso MB, O'Connor JP. Accelerated fracture healing in mice lacking the 5-lipoxygenase gene. *Acta Orthop*. 2010 Dec;81(6):748-55. doi: 10.3109/17453674.2010.533931.
- Mariotti A. Dental plaque-induced gingival diseases. *Ann Periodontol*. 1999 Dec;4(1):7-19.
- Martinez-Herrera M, López-Domenech S, Silvestre FJ, et al. Chronic periodontitis impairs polymorphonuclear leucocyte-endothelium cell interactions and oxidative stress in humans. *J Clin Periodontol*. 2018 Dec; 45(12):1429-39. doi: 10.1111/jcpe.13027.
- Meng T, Zhou Y, Li J, et al. Azithromycin Promotes the Osteogenic Differentiation of Human Periodontal Ligament Stem Cells after Stimulation with TNF- α . *Stem Cells Int*. 2018 Oct;2018:7961962. doi: 10.1155/2018/7961962.
- Milano S, Arcoleo F, D'Agostino P, et al. Intraperitoneal injection of tetracyclines protects mice from lethal endotoxemia downregulating inducible nitric oxide synthase in various organs and cytokine and nitrate secretion in blood. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997 Jan;41(1):117-21.
- Mohamadin AM, Elberry AA, Elkablawy MA, et al. Montelukast, a leukotriene receptor antagonist abrogates lipopolysaccharide-induced toxicity and oxidative stress in rat liver. *Pathophysiol*. 2011 Jun;18(3):235-42. doi: 10.1016/j.pathophys.2011.02.003.
- Molloy ES, McCarthy GM. Eicosanoids, osteoarthritis, and crystal deposition diseases. *Curr Opin Rheumatol*. 2005 May;17(3):346-50.
- Moura AP, Taddei SR, Queiroz-Junior CM, et al. The relevance of leukotrienes for bone resorption induced by mechanical loading. *Bone*. 2014 Dec;69:133-8. doi: 10.1016/j.bone.2014.09.019.
- Nakaya H, Osawa G, Iwasaki N, et al. Effects of bisphosphonate on matrix metalloproteinase enzymes in human periodontal ligament cells. *J Periodontol*. 2000 Jul;71(7):1158-66.
- Nip LH, Uitto VJ, Golub LM. Inhibition of epithelial cell matrix metalloproteinases by tetracyclines. *J Periodontal Res*. 1993 Sep;28(5):379-85.
- Novak MJ, Johns LP, Miller RC, et al. Adjunctive benefits of subantimicrobial dose doxycycline in the management of severe, generalized, chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2002 Jul;73(7):762-9.
- Nyman S, Schroeder HE, Lindhe J. Suppression of inflammation and bone resorption by indomethacin during experimental periodontitis in dogs. *J Periodontol*. 1979 Sep;50(9):450-61.
- Ochkur SI, Protheroe CA, Li W, et al. Cys-leukotrienes promote fibrosis in a mouse model of eosinophil-mediated respiratory inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013 Dec;49(6):1074-84. doi: 10.1165/rcmb.2013-0009OC.
- Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol*. 1996 Nov;1(1):821-78.

Onder C, Kurgan S, Altingoz SM, et al. Impact of non-surgical periodontal therapy on saliva and serum levels of markers of oxidative stress. *Clin Oral Investig*. 2017 Jul;21(6):1961-9. doi: 10.1007/s00784-016-1984-z.

Paula-Silva FW, Petean IB, da Silva LA, et al. Dual Role of 5-Lipoxygenase in Osteoclastogenesis in Bacterial-induced Apical Periodontitis. *J Endod*. 2016 Mar;42(3):447-54. doi: 10.1016/j.joen.2015.12.003.

Paster BJ, Olsen I, Aas JA, et al. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000*. 2006;42:80-7.

Peters-Golden M, Brock TG. Intracellular compartmentalization of leukotriene biosynthesis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Feb;161(2):S36-40.

Peters-Golden M, Henderson WR, Jr. Leukotrienes. *New Engl J Med*. 2007 Nov;357:1841-54.

Polat A, Canbora MK, Akakin D, et al. Effects of montelukast sodium on tendon healing: An experimental study. *Indian J Orthop*. 2013 Sep;47(5):500-4. doi: 10.4103/0019-5413.118207.

Pouliot M, Clish CB, Petasis NA, et al. Lipoxin A(4) analogues inhibit leukocyte recruitment to *Porphyromonas gingivalis*: a role for cyclooxygenase-2 and lipoxins in periodontal disease. *Biochemistry*. 2000 Apr;39(16):4761-8.

Pradeep AR, Manjunath SG, Swati PP, et al. Gingival crevicular fluid levels of leukotriene B4 in periodontal health and disease. *J Periodontol*. 2007 Dec;78(12):2325-30.

Preshaw PM, Hefti AF, Jepsen S, et al. Subantimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis. A review. *J Clin Periodontol*. 2004 Sep;31(9):697-707.

Preshaw PM. Host response modulation in periodontics. *Periodontol 2000*. 2008;48:92-110. doi: 10.1111/j.1600-0757.2008.00252.x.

Ramamurthy NS, Vernillo AT, Greenwald RA, et al. Reactive oxygen species activate and tetracyclines inhibit rat osteoblast collagenase. *J Bone Min Res*. 1993 Oct;8(10):1247-53.

Ramires R, Caiaffa MF, Tursi A, et al. Novel inhibitory effect on 5-lipoxygenase activity by the anti-asthma drug montelukast. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Nov;324(2):815-21.

Reber LL, Gillis CM, Starkl P, et al. Neutrophil myeloperoxidase diminishes the toxic effects and mortality induced by lipopolysaccharide. *J Exp Med*. 2017 May;214(5):1249-58. doi: 10.1084/jem.20161238.

Reddy MS, Weatherford TW 3rd, Smith CA, et al. Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in beagle dogs. *J Periodontol*. 1995 Mar;66(3):211-7.

Riccioni G, Bucciarelli T, Mancini B, et al. Antileukotriene drugs: clinical application, effectiveness and safety. *Curr Med Chem*. 2007;14(18):1966-77.

Rimon G, Sidhu RS, Lauver DA, et al. Coxibs interfere with the action of aspirin by binding tightly to one monomer of cyclooxygenase-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Jan;107(1):28-33. doi: 10.1073/pnas.0909765106.

Robinson CE, Keshavarzian A, Pasco DS, et al. Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting. *Anal Biochem*. 1999 Jan; 266(1):48-57.

Rodan GA. Mechanisms of action of bisphosphonates. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998;38:375-88.

Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer*. 2000 Jun;88(12 Suppl):2961-78.

Ryan ME, Ashley RA. How do tetracyclines work? *Adv Dent Res*. 1998 Nov;12(2):149-51.

Salvi GE, Lang NP. The effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (selective and non-selective) on the treatment of periodontal diseases. *Curr Pharm Des*. 2005a;11(14):1757-69.

Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2005b;32 Suppl 6:108-29.

Sanchez GA, Miozza VA, Delgado A, et al. Relationship between salivary leukotriene B4 levels and salivary mucin or alveolar bone resorption, in subjects with periodontal health and disease. *J Periodont Res*. 2013 Dec;48(6):810-4. doi: 10.1111/jre.12070.

Schupp N, Schmid U, Heidland A, et al. Rosuvastatin protects against oxidative stress and DNA damage in vitro via upregulation of glutathione synthesis. *Atherosclerosis*. 2008 Aug;199:278-87

Sculley DV, Langley-Evans SC. Periodontal disease is associated with lower antioxidant capacity in whole saliva and evidence of increased protein oxidation. *Clin Sci*. 2003 Aug;105(2):167-72.

Sener G, Sehirli O, Cetinel S, et al. Amelioration of sepsis-induced hepatic and ileal injury in rats by the leukotriene receptor blocker montelukast. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005 Dec;73(6):453-62.

Seymour GJ, Taylor JJ. Shouts and whispers: An introduction to immunoregulation in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2004;35:9-13.

Silay MS, Toklu H, Ozagari A, et al. Montelukast prevents testes against ischemia-reperfusion injury through suppression of iNOS expression. *Turk J Urol*. 2014 Dec;40(4):221-7. doi: 10.5152/tud.2014.61587.

Smith GN, Jr. Mickler EA, Hasty KA, et al. Specificity of inhibition of matrix metalloproteinase activity by doxycycline: relationship to structure of the enzyme. *Arthritis Rheum*. 1999 Jun;42(6):1140-6.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, et al. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):134-44.

Sorsa T, Gursoy UK, Nwhator S, et al. Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2016 Feb;70(1):142-63. doi: 10.1111/prd.12101.

Spolidorio LC, Lucas PD, Steffens JP, et al. Influence of parstatin on experimental periodontal disease and repair in rats. *J Periodontol*. 2014 Sep;85(9):1266-74. doi: 10.1902/jop.2014.130619.

Spolidorio LC, Spolidorio DM, Nassar PO, et al. Influence of age on combined effects of cyclosporin and nifedipine on rat alveolar bone. *J Periodontol*. 2004 Feb;75(2):268-72.

Susin C, Dalla Vecchia CF, Oppermann RV, et al. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. *J Periodontol*. 2004 Jul;75(7):1033-41.

Tahan F, Jazrawi E, Moodley T, et al. Montelukast inhibits tumour necrosis factor-alpha-mediated interleukin-8 expression through inhibition of nuclear factor-kappaB p65-associated histone acetyltransferase activity. *Clin Exp Allergy*. 2008 May;38(5):805-11. doi: 10.1111/j.1365-2222.2008.02963.x.

Teronen O, Heikkila P, Kontinen YT, et al. MMP inhibition and downregulation by bisphosphonates. *Ann NY Acad Sci*. 1999 Jun;878:453-65.

Theron AJ, Gravett CM, Steel HC, et al. Leukotrienes C4 and D4 sensitize human neutrophils for hyperreactivity to chemoattractants. *Inflamm Res*. 2009 May;58(5):263-8. doi: 10.1007/s00011-008-8049-y.

Thomas JG, Metheny RJ, Karakiozis JM, et al. Long-term sub-antimicrobial doxycycline (Periostat) as adjunctive management in adult periodontitis: effects on subgingival bacterial population dynamics. *Adv Dent Res*. 1998 Nov;12(2):32-9.

Tintinger GR, Feldman C, Theron AJ, et al. Montelukast: more than a cysteinyl leukotriene receptor antagonist? *ScientificWorldJournal*. 2010 Dec;10:2403-13. doi: 10.1100/tsw.2010.229.

Tobon-Arroyave SI, Isaza-Guzman DM, Restrepo-Cadavid EM, et al. Association of salivary levels of the bone remodelling regulators sRANKL and OPG with periodontal clinical status. *J Clin Periodontol*. 2012 Dec;39(12):1132-40. doi: 10.1111/jcpe.12012.

Tolazzi AR, Tolazzi KD, Garcia M, et al. Influence of leukotriene inhibitor montelukast on wound contraction and cutaneous healing process in rats. *Aesthetic Plast Surg*. 2009 Jan;33(1):84-9. doi: 10.1007/s00266-008-9241-8.

Tothova L, Celec P. Oxidative Stress and Antioxidants in the Diagnosis and Therapy of Periodontitis. *Front Physiol*. 2017 Dec;8:1055. doi: 10.3389/fphys.2017.01055.

Tugtepe H, Sener G, Cetinel S, et al. Oxidative renal damage in pyelonephritic rats is ameliorated by montelukast, a selective leukotriene CysLT1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol*. 2007 Feb;557(1):69-75.

- Uzonyi B, Lotzer K, Jahn S, et al. Cysteinyl leukotriene 2 receptor and protease-activated receptor 1 activate strongly correlated early genes in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Apr;103(16):6326-31.
- Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res*. 2003 Feb;82(2):82-90.
- Van Dyke TE, Warbington M, Gardner M, et al. Neutrophil surface protein markers as indicators of defective chemotaxis in LJP. *J Periodontol*. 1990 Mar;61(3):180-4.
- Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biol*. 1971 Jun;231(25):232-5.
- Varani J, Ward PA. Mechanisms of endothelial cell injury in acute inflammation. *Shock*. 1994 Nov;2(5):311-9.
- Vargas-Sanchez PK, Moro MG, Santos FAD, et al. Agreement, correlation, and kinetics of the alveolar bone-loss measurement methodologies in a ligature-induced periodontitis animal model. *J Appl Oral Sci*. 2017 Sep-Oct;25(5):490-7. doi: 10.1590/1678-7757-2016-0517.
- Vaucher J, Marques-Vidal P, Waeber G, et al. Cytokines and hs-CRP levels in individuals treated with low-dose aspirin for cardiovascular prevention: a population-based study (CoLaus Study). *Cytokine*. 2014 Apr;66(2):95-100. doi: 10.1016/j.cyto.2014.01.003.
- Waite IM, Saxton CA, Young A, et al. The periodontal status of subjects receiving non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Periodontal Res*. 1981 Jan;16(1):100-8.
- Walker C, Thomas J, Nango S, et al. Long-term treatment with subantimicrobial dose doxycycline exerts no antibacterial effect on the subgingival microflora associated with adult periodontitis. *J Periodontol*. 2000 Sep;71(9):1465-71.
- Wang J, Xiong X, Feng B. Aspirin resistance and promoting blood circulation and removing blood stasis: current situation and prospectives. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:954863. doi: 10.1155/2014/954863.
- Wasil M, Halliwell B, Moorhouse CP. Scavenging of hypochlorous acid by tetracycline, rifampicin and some other antibiotics: a possible antioxidant action of rifampicin and tetracycline? *Biochem Pharmacol*. 1988 Feb;37(4):775-8.
- Weeks-Dybvig M, Sanavi F, Zander H, et al. The effect of indomethacin on alveolar bone loss in experimental periodontitis. *J Periodontal Res*. 1982 Jan;17(1):90-100.
- Wei J, Chen S, Huang C, et al. The cysteinyl leukotriene receptor 1 (CysLT1R) antagonist montelukast suppresses matrix metalloproteinase-13 expression induced by lipopolysaccharide. *Int Immunopharmacol*. 2018 Feb;55:193-7. doi: 10.1016/j.intimp.2017.11.020.
- Weiner GS, DeMarco TJ, Bissada NF. Long term effect of systemic tetracycline administration on the severity of induced periodontitis in the rat. *J Periodontol*. 1979 Dec;50(12):619-23.

Williams RC, Jeffcoat MK, Kaplan ML, et al. Flurbiprofen: a potent inhibitor of alveolar bone resorption in beagles. *Sci*. 1985 Feb;227(4687):640-2.

Williams RC, Jeffcoat MK, Wechter WJ, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drug treatment of periodontitis in beagles. *J Periodontal Res*. 1984 Nov;19(6):633-7.

Williams RC, Jeffcoat MK, Howell TH, et al. Altering the progression of human alveolar bone loss with the non-steroidal anti-inflammatory drug flurbiprofen. *J Periodontol*. 1989 Sep;60(9):485-90.

Wixted JJ, Fanning PJ, Gaur T, et al. Enhanced fracture repair by leukotriene antagonism is characterized by increased chondrocyte proliferation and early bone formation: a novel role of the cysteinyl LT-1 receptor. *J Cell Physiol*. 2009 Oct;221(1):31-9. doi: 10.1002/jcp.21809.

Woszczek G, Chen LY, Alsaaty S, Nagineni S, Shelhamer JH. Concentration-dependent noncysteinyl leukotriene type 1 receptor-mediated inhibitory activity of leukotriene receptor antagonists. *J Immunol*. 2010;184(4):2219-2225.

Wu S, Zhu X, Jin Z, et al. The protective role of montelukast against intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Sci Rep*. 2015 Oct;26;5:15787. doi: 10.1038/srep15787.

Yang D, Liu R, Liu L, et al. Involvement of CD147 in alveolar bone remodeling and soft tissue degradation in experimental periodontitis. *J Periodontal Res*. 2017 Aug;52(4):704-12. doi: 10.1111/jre.12435.

Yuan YM, Fang SH, Qian XD, et al. Leukotriene D4 stimulates the migration but not proliferation of endothelial cells mediated by the cysteinyl leukotriene cyslt(1) receptor via the extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Pharmacol Sci*. 2009 Feb;109(2):285-92.

Zenobia C, Hajishengallis G. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol* 2000. 2015 Oct;69(1):142-59. doi: 10.1111/prd.12083.

Zheng C, Shi X. Cysteinyl leukotriene receptor 1 (cysLT1R) regulates osteoclast differentiation and bone resorption. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018 Sep;5:1-7. doi: 10.1080/21691401.2018.1489264.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Fundada em 1900
"Em constante busca da excelência"

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais
 Tel. (11) 3091 7842
 ceuafo@usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito do Montelukaste, antagonista do receptor de leucotrienos, sobre a perda óssea alveolar induzida pelo método da ligadura em ratos", registrada com o nº 038/2015, sob a responsabilidade de Marinella Holzhausen Caldeira, Gilson Cesar Nobre Franco, Marcelo Nicolás Muscará, e Marcella Goets Moro, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Odontologia da USP, em reunião de 09/05/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	09/05/2016 a 08/05/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato Heterogênico, Wistar
Nº de animais	36
Peso/idade	200-250g / 6-8 semanas
Sexo	Masculino
Origem	Biotério do ICB/USP

São Paulo, 12 de maio de 2016.

 Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
 Coordenador da CEUA-FOUSP

Fundada em 1900
"Em constante busca da excelência"

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais
Tel. (11) 3091 7842
ceuafo@usp.br

Of. CEUA nº 021/2016

São Paulo, 07 de junho de 2016.

Prezada Professora,

Em resposta à solicitação de adendo ao Protocolo CEUA 038/2015 aprovado em 19 de maio de 2015 pela CEUA/FOUSP, para inclusão de 36 ratos Wistar machos ao projeto intitulado "Avaliação do efeito do Montelukaste, antagonista do receptor de leucotrienos, sobre a perda óssea alveolar induzida pelo método da ligadura em ratos", informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia da USP, aprovou sua solicitação em reunião ordinária realizada em 06 de junho de 2016.

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
Coordenador da CEUA-FOUSP

Ilma. Senhora
Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira
Departamento de Estomatologia da
Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**AValiação DO EFEITO DE MONTELUCASTE, ANTAGONISTA DO RECEPTOR DE LEUCOTRIENOS, SOBRE A PERDA ÓSSEA ALVEOLAR INDUZIDA PELO MÉTODO DA LIGADURA EM RATOS**", registrado sob o protocolo nº **81/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **26/08/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Marcelo Nicolas Muscará**

- Departamento: *Farmacologia*

- Membros da Equipe: *Gilson Cesar Nobre Franco (Pesquisador colaborador), Marcella Goetz Moro (Pós-graduando), Marinella Holzhausen Caldeira (Investigador principal), Flávia Neto de Jesus, Emmanuel Albuquerque*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "**EFFECTS OF MONTELUKAST, A LEUKOTRIENE RECEPTOR ANTAGONIST, ON ALVEOLAR BONE LOSS INDUCED BY LIGATURE IN RATS**", protocol nº **81/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **8/26/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Marcelo Nicolas Muscará**

- Team members: *Gilson Cesar Nobre Franco (Collaborator Researcher), Marcella Goetz Moro (Graduate Student), Marinella Holzhausen Caldeira (Principal Investigator), Flávia Neto de Jesus, Emmanuel Albuquerque.*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a *final report* of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Rattus norvegicus</i>	Wistar	Macho/Male	6 semanas/weeks	72

São Paulo, 29 de agosto de 2016.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.029.2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado nº 081/2016/CEUA, de 26/08/2016, aprovo a inclusão dos animais abaixo indicados ao Protocolo "*Avaliação do efeito de Montelukaste, antagonista do receptor de leucotrienos, sobre a perda óssea alveolar induzida pelo método da ligadura em ratos*", de responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará, do Departamento de Farmacologia, para continuidade do estudo:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Rattus norvegicus	Wistar	Macho	6-8 semanas	264

São Paulo, 07 de março de 2017.

Luciane Valéria Sita
Prof. Dra. Luciane Valéria Sita
Vice-coordenadora da CEUA-ICB/USP