



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

ANDERSON CHAGAS COELHO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CLORETO DE LÍTIO E MONENSINA NA
PERDA ÓSSEA INFLAMATÓRIA DE RATOS SUBMETIDOS A
PERIODONTITE EXPERIMENTAL**

FORTALEZA

2023

ANDERSON CHAGAS COELHO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CLORETO DE LÍTIO E MONENSINA NA
PERDA ÓSSEA INFLAMATÓRIA DE RATOS SUBMETIDOS A
PERIODONTITE EXPERIMENTAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Morfofuncionais

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. PAULA GOES PINHEIRO
DUTRA

FORTALEZA
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C614a Coelho, Anderson Chagas.

Avaliação do efeito do cloreto de lítio e monensina na perda óssea inflamatória de ratos submetidos a periodontite experimental / Anderson Chagas Coelho. – 2023.
53 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Paula Goes Pinheiro Dutra.

1. Lítio . 2. Monensin. 3. Proteínas WNT . 4. Periodontite . 5. Reabsorção óssea . I. Título.

CDD 611

ANDERSON CHAGAS COELHO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO CLORETO DE LÍTIO E MONENSINA NA
PERDA ÓSSEA INFLAMATÓRIA DE RATOS SUBMETIDOS A
PERIODONTITE EXPERIMENTAL

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de mestre em Ciências Morfofuncionais pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Área de concentração: Morfologia Óssea e Articular.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Paula Goes Pinheiro Dutra (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Roberta Jeane Bezerra Jorge
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Ana Patrícia Souza Lima
Universidade de Fortaleza

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter iluminado sempre os meus caminhos e mostrado como posso ser forte para alcançar os objetivos que acredito e almejo;

Aos meus pais, **Darkson e Gelma**, pelos eternos ensinamentos e por estarem diretamente relacionados com a pessoa que me tornei;

A minha esposa, **Camila Carvalho de Oliveira Coelho**, por estar ao meu lado nesta caminhada e ter meu maior incentivo no seu ventre, nossa primeira filha, Maria Fernanda, que traz uma alegria imensa no meu coração;

A minha irmã, **Andressa Chagas Coelho**, por ser presente e sempre dar apoio na vida dos nossos pais quando não pude comparecer;

A minha orientadora, **Professora Paula Goes**, por ter apoiado este sonho e ter dedicado seus ensinamentos e disponibilidade da melhor maneira possível. Serei sempre grato por proporcionar e buscar sempre o meu engrandecimento científico desde a especialização em periodontia, sendo desta maneira, uma pessoa com influência direta na minha vida;

A **Gisele, Vanessa, Conceição (Josi) e Khalil**. Em especial ao casal **Denis e Sthefane** que foram incrivelmente acolhedores e incentivadores para que conseguisse realizar os experimentos da melhor maneira. Aos alunos de iniciação científica, **Romero e Sislana** que foram meus fiéis escudeiros;

Aos colegas do NEPDIO e as professoras **Delane e Karuza** pelo compartilhamento de conhecimentos científicos.

Muito Obrigado!!!!!!

RESUMO

Periodontite é uma doença crônica marcada pela liberação de mediadores inflamatórios que alteram o metabolismo e arquitetura óssea levando à destruição de estruturas de suporte periodontal. Diversas vias estão envolvidas no processo de perda óssea inflamatória, com destaque mais recentemente para a via WNT canônica, que, quando ativada, estimula diferenciação de osteoblastos. Em condições inflamatórias, o aumento de Dickkopf 1 (DKK-1), induz bloqueio do sítio de ligação de WNT, reduzindo a osteoblastogênese. Reconhecendo a importância da via WNT canônica no metabolismo ósseo torna-se interessante avaliar o efeito de moduladores, tais como Cloreto de Lítio (LiCl) e a Monesina (Mon). O LiCl é indicado para o tratamento de transtornos mentais e tem como mecanismo de ação a inibição de glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3b), o que ativa a via WNT canônica. A Mon tem se destacado como fármaco anti-câncer por inibir beta-catenina, causando, portanto, inibição da via WNT. Sabendo da importância da via WNT para o metabolismo ósseo nos parece razoável investigar o efeito do LiCl e Mon na perda óssea inflamatória em ratos submetidos à periodontite experimental (PE). A PE foi induzida em todos os animais (exceto no grupo Naive) através da inserção do fio de nylon 3.0 em torno do 2° molar superior esquerdo. Foram utilizados 90 ratos machos da linhagem Wistar, divididos em 5 grupos (n=6): Naive (N); Periodontite Experimental (PE), recebendo 0,1ml/200g de óleo de milho diariamente; Monensina (Mon) recebendo 10 mg/kg de Mon diariamente; Cloreto de Lítio (LiCl) recebendo 150mg/kg de LiCl em dias alternados; Mon+LiCl, recebendo 10 mg/kg de Mon diariamente + 150mg/kg de LiCl em dias alternados. Todos os agentes foram administrados por via oral. Foram realizados três sets de experimentos e as maxilas coletadas para análise macroscópica, histológica e expressão gênica de beta-catenina e marcadores ósseos. Amostras sanguíneas foram coletadas para dosagem de DKK1 e *C-telopeptide of collagen* (CTx). Estudos de *docking* molecular foram realizados para avaliar a afinidade de ligação entre os agentes farmacológicos e os componentes da via WNT. O modelo de PE causou perda óssea e inflamação importante no tecido periodontal. A Mon potencializou a perda óssea marcada pelo aumento do número e função de osteoclastos (p<0,05). O LiCl foi capaz de amenizar os danos ao tecido ósseo aumentando o número de osteoblastos (p<0,05). Quando em associação, o LiCl foi capaz de atenuar de forma significativa a ação reabsortiva da Mon. Analisando os efeitos desses agentes na via WNT, podemos destacar que LiCl e a Mon apresentaram forte interação com GSK3b e beta-catenina, sendo esse um possível mecanismo para explicar o efeito protetor do LiCl sobre a Mon. Em suma, os resultados deste estudo mostram que o LiCl previne a perda óssea potencializada pela Mon, possivelmente pelos efeitos direto e indireto em GSK3b.

Palavras-chave: Lítio. Monensina. Proteínas WNT. Periodontite. Reabsorção óssea.

ABSTRACT

Periodontitis is a chronic inflammatory disease marked by inflammatory mediators release, that affect bone metabolism and architecture, leading to destruction of periodontal supportive structures. Several pathways are involved in the process of inflammatory bone loss, standing out WNT pathway, that when ON induces osteoblast differentiation, but in inflammatory conditions, with increase of Dickkopf 1 (DKK-1), there is a blockage of WNT binding site, reducing osteoblastogenesis. Acknowledging the importance of WNT pathway on bone metabolism, it becomes interesting to evaluate the effect of WNT modulators, such as lithium chloride (LiCl) and Monensin (Mon). LiCl has been indicated to treat mental disorders and has a mechanism of action based on glycogen synthase kinase-3 beta (GSK3b) inhibition, which activates WNT pathway. On the other hand, Mon has stood out as an anti-cancer drug, through inhibition of beta-catenin, which causes WNT inhibition. Knowing that both agents affect WNT pathway, and that this pathway it is important for bone metabolism it seems reasonable to investigate the associated effect of LiCl and Mon on inflammatory bone loss in rats submitted to experimental periodontitis (EP). EP was induced in all animals (except in Naïve group) through the insertion of a nylon threat around the second upper left molar. It was used 90 male Wistar rats, divided into 5 groups (n=6/group): Naïve (N); Experimental Periodontitis (EP), receiving 0.1ml/200g of corn oil, daily; Monensin (Mon) receiving 10 mg/kg of Mon daily; Lithium chloride (LiCl) receiving 150mg/kg of LiCl every other day; Mon+LiCl, receiving 10 mg/kg of Mon daily + 150mg/kg of LiCl every other day. Both agents were administered by oral gavage. It was performed 3 sets of experiments, and the maxillae were collected for macroscopic, histological analyses, as well as genic expression for beta-catenin and bone markers. Blood samples were collected to DKK-1 and C-telopeptide of collagen (CTX) dosage. Molecular docking assays were done to evaluate the binding affinity between the LiCl and Mon with WNT pathway components. It was seen that EP caused bone loss and inflammation on periodontal tissue. Mon potentiated bone loss marked by the increase on osteoclast number and function ($p < 0.05$). LiCl was able to protect bone tissue, increasing the number of osteoblasts ($p < 0.05$). In association, LiCl mitigated, significantly, Mon resorptive action. Analyzing the effect of these two agents on WNT, we can highlight that LiCL and Mon showed strong interaction with GSK3b and beta-catenin, being this a possible mechanism to explain the bone protective effect of LiCl over Mon. In summary, the results of this study showed that LiCl mitigates bone loss potentiated by Mon, possibly due to its direct and indirect effects in GSK3b.

Keywords: Lithium. Monensin. WNT proteins. Periodontitis. Bone Resorption.

LISTA DE ABREVIÇÕES

Ctx	Teloepetídeo C terminal
DKK	Dickkopf 1
DP	Doença Periodontal
DVL	Dishevelled
(DLX)-5	Distal-Less Homeobox-5
FA	Fosfatase Alcalina
FZD	Frizzled
GSK3b	Glicogênio sintase quinase 3 β
LEF	Fator intensificador linfoide-1
LiCl	Cloreto de Lítio
LRP5/6	Proteína de baixa densidade 5/6
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MON	Monensina
OCN	Osteoclacina
OPG	Osteoprotegerina
PCP	Planar cell polarity
PE	Periodontite Experimental
RANK	Receptor ativador do fator de transcrição nuclear-k B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator de transcrição nuclear-k B
RUNX2	Fator de transcrição 2 relacionado a runt
SOST	Esclerostina
TCF	Fatores de transcrição da família fatores de célula T
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
WNT	Wingless

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	10
1.1 Doença Periodontal.....	10
1.2 Via de sinalização WNT.....	11
1.3 Doença Periodontal e via WNT.....	12
1.4 Moduladores da via WNT.....	14
2 PROPOSIÇÕES.....	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
3 CAPÍTULO.....	18
3.1 Capítulo 1:	19
4 CONCLUSÃO GERAL.....	44
REFERÊNCIAS.....	45
ANEXO A- Certificado de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC.....	53

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Doença Periodontal

A Doença Periodontal (DP) é uma doença infectoinflamatória crônica que resulta em destruição progressiva das estruturas de suporte dentais. Clinicamente, pode ser acompanhada de sangramento gengival, mobilidade dentária, e caso não seja tratada pode levar a perda dentária (KAPELLAS et al., 2018). Estudos epidemiológicos mostram que a DP é altamente prevalente, estimando-se ocorrer em mais de 50% dos adultos no mundo (SUN et al., 2018). No Brasil, de acordo com os últimos dados, 82,2% dos adultos entre 35-44 anos apresentam algum tipo de problema periodontal (BRASIL 2010).

A periodontite é em geral iniciada pela presença de biofilme bacteriano, que gera uma resposta inflamatória do hospedeiro a qual pode ser modificada pela interação de fatores intrínsecos e extrínsecos, tais como dieta, higiene bucal, suscetibilidade genética e por isso sua etiologia é entendida como sendo multifatorial (OFFENBACHER et al., 2016).

Dentre os fatores etiológicos citados previamente, a resposta do hospedeiro ocupa um papel central no início e desenvolvimento da doença periodontal. A ativação exacerbada da resposta imune do hospedeiro, estimula a liberação de vários mediadores inflamatórios, como por exemplo, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), prostaglandinas e metaloproteinases da matriz (MMPs) (YUCEL-LINDBERG; BAGE, 2013). Tais mediadores inflamatórios, no tecido ósseo, são capazes de provocar aumento do Ligante do Receptor Ativador do Fator de Transcrição Nuclear- κ B (RANKL) em outras células como linfócitos T e fibroblastos, induzindo uma maior interação com seu receptor RANK, encontrado na membrana dos osteoclastos. A maior interação de RANK-RANKL promove maior diferenciação de osteoclastos e conseqüentemente maior reabsorção óssea. Concomitante ao aumento da interação RANK-RANKL, há uma inibição de Osteoprotegerina (OPG) estimulando, assim, a perda óssea.

1.2 Via de sinalização WNT

Além do eixo RANK-RANKL-OPG, outras vias de sinalização têm sido estudadas com relação ao metabolismo ósseo, com destaque para a via WNT (KOYABASHI et al., 2016).

A WNT é uma família de proteínas codificadas por genes que resultam em produtos de transdução afetando a orientação e as características das células. Essas proteínas morfogênicas contêm de 350-400 resíduos de aminoácidos encontradas em diferentes tipos de animais. Fisiologicamente, esta via é responsável pela regulação de muitas funções em vertebrados, sendo importante na proliferação, migração, sobrevivência e diferenciação celular, além do processo de desenvolvimento do organismo (KAHN, 2014).

Dois vias de sinalização WNT têm sido descritas: a via não canônica, subdividida em *Planar cell Polarity* (PCP) e WNT/Ca²⁺; e a via canônica WNT/ β -catenina, sendo esta última a mais bem estudada especialmente no tecido ósseo (NIEHRS, 2012). A via WNT/ β -catenina se inicia quando as proteínas WNT se ligam aos receptores de transmembrana Frizzled (FZD) e ao co-receptor da proteína de baixa densidade 5/6 (LRP5/6). Esta ativação promove o deslocamento e interação da proteína Dishevelled (DVL) com os receptores de WNT, levando a inibição de glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β) (KUBOTA, MICHIGAMI, OZANO, 2009). Com isso a β -catenina se torna estável no citoplasma celular e passível de sofrer translocação nuclear (CHAIROUNGDUAN et al. 2010). No núcleo, a β -catenina interage com fatores de transcrição da família fatores de célula T (TCF)/fator intensificador linfóide-1 (LEF) (MAEDA, et al 2019), para iniciar a transcrição de genes alvos como o fator de transcrição 2 relacionado a runt (RUNX-2), *Distal-Less Homeobox* (DLX)-5, Fosfatase Alcalina (FA) e Osteocalcina (OCN) (LI et al., 2015), promovendo assim maior diferenciação dos osteoblastos (BARON & KNEISSEL, 2013). A regulação fisiológica da via WNT é realizada principalmente por meio da Esclerostina (SOST) e/ou Dickkopf (DKK) os quais bloqueiam o receptor da WNT, impedindo a entrada de beta-catenina no núcleo celular (ROSSINE et al., 2013) (Figura 1).

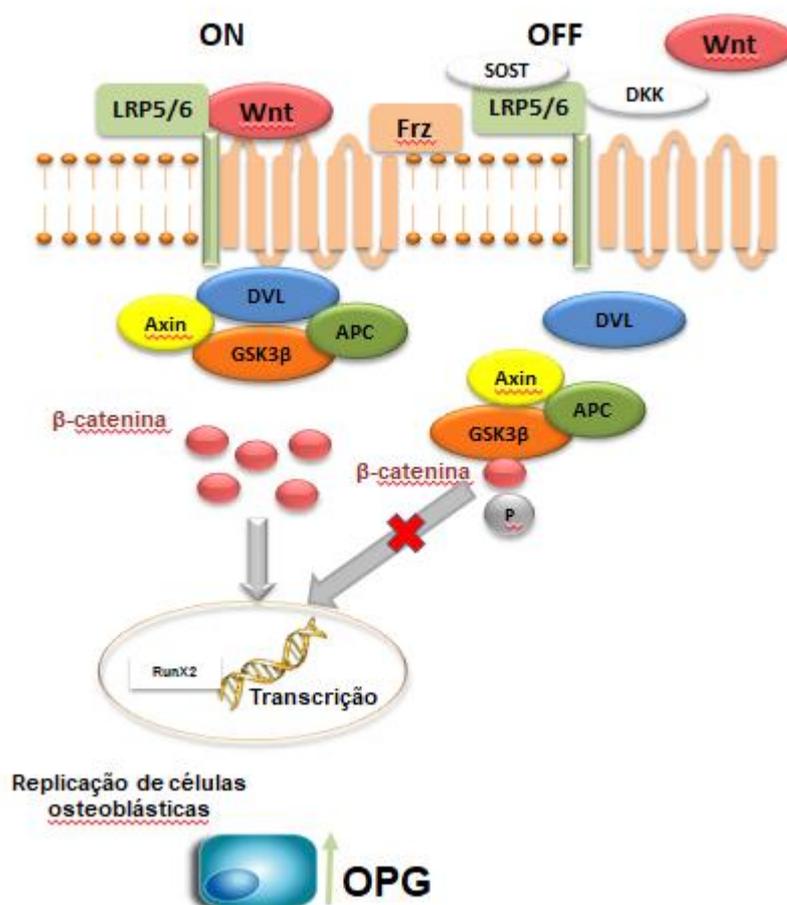


Figura 1: Via de sinalização WNT. A ativação da Via WNT se dá quando as proteínas WNT se ligam aos seus receptores, recrutando a proteína citoplasmática DVL a qual é fosforilada e ativada inibindo o complexo de destruição, permitindo assim, o deslocamento da β -catenina para o núcleo onde ocorre a ligação com fatores de transcrição TCF/LEF favorecendo a formação de genes que estimulam a diferenciação de osteoblastos com consequente aumento de OPG (Fonte: Próprio autor).

1.3 Doença periodontal e via WNT

No tecido ósseo, a via WNT/ β -catenina está relacionada com a regulação do processo de diferenciação e maturação dos osteoblastos (NAPIMOGA et al., 2014). A desregulação dessa via aparece, portanto, como fator chave de diversas doenças ósseas como a periodontite (BAO et al., 2021; LIM et al., 2014).

De fato, tem sido observado que inibidores da via WNT, tais como esclerostina e DKK-1, estavam marcadamente aumentados em animais com periodontite experimental (KIM et al., 2015; KIM et al., 2017; LIMA et al., 2017; KIM et al., 2014; LIU et al., 2017). Estudos do nosso grupo mostram que

animais submetidos a periodontite induzida por ligadura apresentaram aumento significativo de DKK-1 (LIMA et al., 2017), e que a deleção osteocítica de DKK-1 foi importante para atenuar a perda óssea em animais submetidos a periodontite (GOES et al., 2019).

Um outro estudo, mostrou que a administração sistêmica de anticorpo anti-esclerostina foi capaz de reverter a perda óssea em ratas ovariectomizadas (LIU et al., 2018) e que tal efeito foi potencializado após a associação com anticorpo anti-DKK-1. Por outro lado, o uso de WNT3A promoveu aceleração do reparo ósseo (LIU et al., 2017). Juntos estes achados confirmam que a ativação da via de sinalização WNT contribui para o reparo da perda óssea alveolar causada pela periodontite.

Sabe-se que o eixo RANK-RANKL-OPG é o ponto de interseção entre a osteoclastogênese e a osteogênese. Interessantemente, a ativação de osteoclastos pode ser controlada pela via WNT, uma vez que esta atua sobre o eixo RANK-RANKL-OPG (BAO et al., 2021). Osteoprotegerina (OPG), uma proteína que bloqueia a interação entre RANK-RANKL, se mostrou reduzida quando após a utilização de um siRNA para beta-catenina em fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal (SUDA et al., 2009). Em modelo de periodontite usando animais knockout para DKK-1, houve aumento da expressão gênica de Runx2 e osteocalcina, associado a redução da expressão gênica de RANKL (GOES et al., 2019). Além disso, foi observado que o uso de antagonistas da via WNT aumentaram a osteoclastogênese em cultura de células RAW264.7, enquanto os agonistas de WNT atenuaram esse processo (YANG et al., 2020). Desta forma, esses achados confirmam que a ativação da via WNT promove osteogênese, uma vez que suprime a osteoclastogênese atuando indiretamente sobre o eixo RANK-RANKL-OPG (BAO et al., 2021). Portanto, reguladores da via WNT podem ter um importante papel terapêutico no reparo do osso alveolar. (Figura 2).

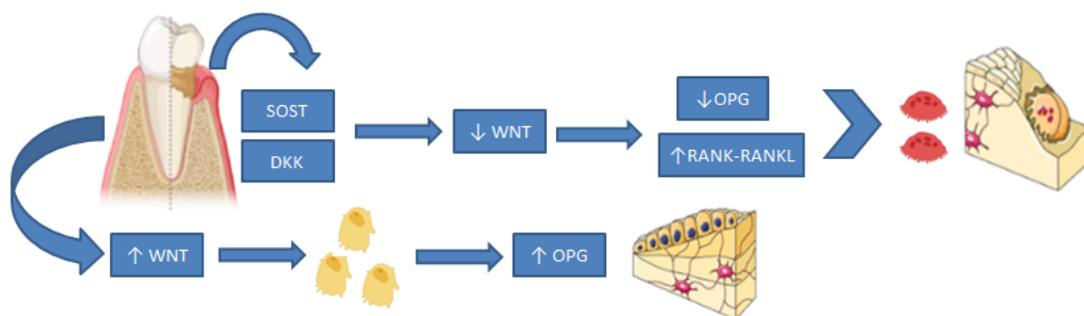


Figura 2: Via de sinalização WNT e periodontite. Diante da DP a via de sinalização WNT é inibida pelo aumento de SOST e DKK, ocasionando a diminuição de OPG e o aumento da ligação de RANK-RANKL culminando na maior ativação osteoclástica e reabsorção óssea aumentada. A via de sinalização WNT pode aumentar a osteoblastogênese por favorecer a diferenciação e replicação de osteoblastos com consequente aumento de OPG, reduzindo desta forma a osteoclastogênese. (Fonte: Próprio autor).

1.4 Moduladores da via WNT

Diversos estudos têm mostrado a importância da via de sinalização WNT no desenvolvimento, formação e reparo ósseo. Assim a modulação dessa via ganha destaque como uma alternativa terapêutica para distúrbios ósseos de forma geral (SCHUPBACH et al., 2020).

Sabendo que a via canônica da WNT é a mais estudada na homeostasia e lesões ósseas, os moduladores de WNT tem focado na via canônica e seu papel na regeneração óssea. Sendo assim, atualmente, LRP5/6, beta-catenina e especialmente a glicogênio sintase quinase 3 β (GSK-3b), são os principais alvos de modulação da via canônica considerando as terapias regenerativas do osso (SCHUPBACH et al., 2020).

GSK-3b é uma proteína citoplasmática ativa, constitutiva que atua como regulador negativo da formação óssea através da degradação de beta-catenina. Almoshari et al. (2020) e Adamowicz et al. (2012), após indução de periodontite em ratos, o primeiro por ligadura e o segundo por infecção através de *Porphyromonas gingivalis*, encontraram que o uso de inibidores de GSK3b diminuiu a perda óssea alveolar.

Dentre os inibidores de GSK-3b, destaca-se o cloreto de lítio (LiCl) o qual já se encontra em fase 2 de ensaios clínicos demonstrando sucesso em modelos pré-clínicos de fratura óssea (NAM et al., 2020). O LiCl promove a ativação da via WNT/ β -catenina, pois permite o acúmulo de β -catenina que é translocada

para o núcleo e estimulará a transcrição de fatores osteogênicos como OCN, FA e Runx2 (JIANG et al., 2020), resultando na diferenciação e proliferação dos osteoblastos (LOPEZ-HERRADON et al., 2013) levando a formação óssea (ZHU et al., 2014).

No osso alveolar foi observado que o LiCl reduziu a perda óssea induzida por ligadura em ratos deficientes em estrogênio, melhorando de forma geral a área trabecular e a elevada expressão de marcadores ósseos (DE SOUZA MALTA et al., 2020). LiCl também promoveu cicatrização óssea em modelo de periodontite apical estimulando a formação óssea e repostas imunes (NARUSE et al., 2021). Em estudos sobre movimentação dentária ortodôntica, o uso de lítio reduziu a reabsorção radicular através da supressão da morte de células do ligamento periodontal, bem como hialinização e formação de odontoclastos (UEDA-ICHINOSE et al., 2022). Além disso, LiCl aumentou a formação óssea, vista através do aumento da densidade do osso trabecular, da quantidade de osteoblastos e da expressão de marcadores osteogênicos como Runx2, Osterix (PAN et al., 2017). Portanto, a modulação da via WNT através do uso do LiCl pode ser uma opção terapêutica em potencial para a perda óssea.

Um outro modulador da via WNT/ β -catenina, ainda pouco estudado, é a Monensina, um antibiótico ionóforo carboxílico poliéter de sódio e potássio produzido pela fermentação da cepa *Streptomyces cinnamonensis* (MOLLENHAUER, MORRÉ, ROWE, 1990). Monensina tem sido comumente usada na prática veterinária para controle da coccidiose em aves (CHAPMAN et al., 2010). No entanto, um estudo recente vem mostrando que este fármaco também apresenta ação antineoplásica importante (URBANIÁK et al., 2022), em parte, devido à inibição da via de sinalização WNT (TUMOVA et al., 2014). Como mostrado por Tumova et al. (2014), a Monensina foi capaz de antagonizar a via de sinalização WNT em múltiplos *steps*, envolvendo tanto o receptor LRP6 quanto beta-catenina. Sendo assim, seu uso pode estar associado na inibição da osteoblastogênese. De forma controversa, Cowen et al. (1985) mostraram que a Monensina foi capaz inibir a produção de collagenase, bem como a osteoclastogênese induzida por hormônio da paratireoide (PTH). Neste contexto, o efeito da Monensina no tecido ósseo ainda permanece pouco conhecido.

Desta forma, sabendo da importância da via WNT no tecido ósseo torna-se interessante a observação do efeito destes dois moduladores, isoladamente ou em associação, diante da indução da perda óssea inflamatória induzida através do modelo de periodontite experimental em ratos.

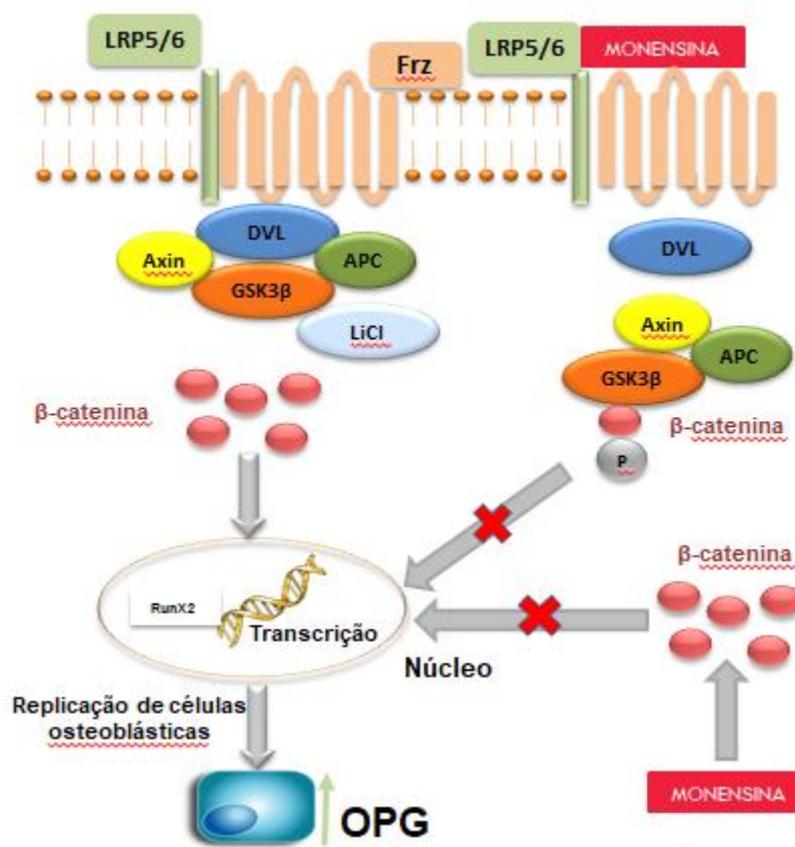


Figura 3: Moduladores da via canônica WNT/β-catenina. O LiCl atua inibindo GSK3b o que permite a entrada de β-catenina no núcleo celular, potencializando a ativação de WNT e favorecendo a diferenciação de osteoblastos. A Monsensina pode atuar tanto bloqueando o receptor LRP6, inibindo a transdução do sinal de ativação, como também pode bloquear β-catenina citoplasmática impedindo sua entrada no núcleo, podendo reduzir a formação de genes relacionados a osteoblastos. (Fonte: Próprio autor).

2- PROPOSIÇÕES

Este trabalho teve como objetivos:

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito associado de LiCl e Mon na perda óssea inflamatória em ratos submetidos a periodontite experimental (PE).

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a arquitetura óssea por meio de análises macroscópica;
- Analisar as alterações histológicas e histomorfométricas no tecido de suporte;
- Avaliar a remodelação óssea através das dosagens séricas de DKK e CTx;
- Avaliar a expressão gênica de marcadores do metabolismo ósseo (OPG, RUNX2, β -catenina);
- Avaliar através de *docking* molecular a afinidade de ligação entre os fármacos e os componentes da via WNT.

3- CAPÍTULO

REGIMENTO INTERNO

Por se tratar de pesquisa envolvendo animais, o projeto de pesquisa referente a esta dissertação foi submetido a Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, sendo aprovada sob número 7128020620 (Anexo A). Esta Dissertação de Mestrado baseia-se no artigo 37º do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para Dissertações de Mestrado e Teses de Doutorado. Os resultados obtidos estão apresentados no formato de 01 artigo científico, redigidos de acordo com as normas da revista científica escolhida para publicação.

ARTIGO: Cloreto de lítio atenua o efeito reabsortivo da monensina em ratos submetidos a perda óssea inflamatória

Periódico: *Archives of oral biology*

Qualis Capes: A2

Fator de impacto: 2.633

Normas das revistas disponíveis em:

https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/203?generatepdf=true

CLORETO DE LÍCIO ATENUA O EFEITO REABSORTIVO DA MONENSINA EM RATOS SUBMETIDOS A PERDA ÓSSEA INFLAMATÓRIA

Anderson Chagas¹, Sthefane Gomes², Denis Oliveira¹, Khalil Viana², Vanessa Costa¹, Gisele Angelino¹, Conceição Martins³, Sislana Azevedo⁴, Helyson Lucas¹, Roberta Jeanne³, Delane Gondim³, Karuza Alves³, Renata Leitão³, Paula Goes^{5,*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Departamento de Clínica Odontológica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

³ Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

⁴ Curso de Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

⁵ Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

Endereço: Departamento de Patologia e Medicina Legal. Rua Alexandre Baraúna, 949. Rodolfo Teófilo, Fortaleza-CE. CEP:60430-160.

* Autor correspondente: Profa Dra Paula Goes.

Email: paulagpinheiro@yahoo.com.br

RESUMO

A periodontite é uma doença crônica inflamatória que afeta o metabolismo ósseo e a via WNT está envolvida nesse processo. Portanto, se torna interessante avaliar o efeito de moduladores de WNT tais como o cloreto de lítio (LiCl), um inibidor de glicogênio sintase quinase 3-beta (GSK3b), e da Monensina, um inibidor de beta-catenina, na perda óssea inflamatória de ratos submetidos periodontite experimental (PE). PE foi induzida em todos os animais (exceto os do grupo Naive) por ligadura ao redor do segundo molar superior esquerdo. Foram utilizados 90 ratos Wistar machos, divididos em 5 grupos (n=6/grupo): Naive (N); PE, recebendo 0,1ml/200g óleo de milho, diariamente; Mon, recebendo 10 mg/kg de Mon diariamente; LiCl, recebendo 150mg/kg de LiCl em dias alternados; Mon+LiCl, recebendo 10 mg/kg de Mon diariamente + 150mg/kg de LiCl em dias alternados. Ambos os agentes foram administrados por gavagem. Por ocasião do sacrifício, as maxilas foram coletadas para análises macroscópica e histológica, bem como para análise da expressão gênica para beta-catenina e marcadores ósseos. Amostras de sangue foram coletadas para dosagem sérica de Dickkopf-1 (DKK-1) e *C-telopeptideo de colágeno* (CTx). Ensaios de *docking* molecular foram realizados para avaliar a afinidade de ligação entre o LiCl e Mon com componentes da via WNT. Foi visto que PE causou perda óssea e inflamação no tecido periodontal. Mon potencializou a perda óssea marcada pelo aumento no número e função de osteoclastos ($p < 0,05$). O LiCl foi capaz de proteger o tecido ósseo, aumentando o número de osteoblastos ($p < 0,05$). Em associação, o LiCl atenuou de forma significativa a ação reabsortiva da Mon. Considerando os componentes da via WNT, o LiCl e a Mon mostraram forte interação com GSK3b e beta-catenina, sendo este um possível mecanismo para explicar o efeito protetor do tecido ósseo LiCl sobre a Mon. Em suma, os resultados deste estudo mostraram que o LiCl atenuou a perda óssea potencializada pela Mon, possivelmente devido seu efeito direto e indireto em GSK3b.

Keywords: Lítio. Monensin. Proteínas WNT. Periodontite. Reabsorção óssea.

INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica de alta prevalência. Sua etiologia é multifatorial e complexa, onde bactérias periodontopatogênicas estimulam inflamação (Usui et al., 2021), levando à formação de um infiltrado inflamatório de células T e B, macrófagos, neutrófilos e diversas citocinas inflamatórias que aumentam a osteoclastogênese mediada por RANKL (Hienz et al., 2015).

A via WNT/beta-catenina é uma outra via de sinalização importante, bastante conhecida por atuar na proliferação celular e câncer, mas que também tem se destacado como um regulador do metabolismo ósseo, pois está envolvida com a diferenciação de osteoblastos (Napimoga et al., 2014). A interação entre proteínas WNT e seus receptores FZD e LRP5/6, inibe a ação de GSK3b favorecendo o acúmulo de β -catenina no citoplasma que pode então translocar para o núcleo, formando um complexo com TCF/LEF e estimulando a expressão de genes relacionados osteoblastogênese (LIU et al., 2008). Fisiologicamente esta via é regulada por Dickkopf-1 (DKK-1) e Esclerostina (SOST), os quais bloqueiam a interação de WNT com seus receptores o que permitem formação de um complexo integrado por APC, axina e GSK3b que por sua vez promovem a fosforilação e degradação de β -catenina (Baker et al., 2008). O processo inflamatório aumenta a expressão de DKK-1 reduzindo a formação de osso (Sousa et al., 2016; Lima et al., 2017; Goes et al., 2019)

Conhecendo, portanto, a importância da via WNT para o metabolismo ósseo torna-se interessante avaliar o efeito de fármacos moduladores dessa via. Neste contexto, se destaca o cloreto de lítio (LiCl), um fármaco utilizado para prevenir alterações de humor e suicídio, sendo também usado como adjunto no tratamento da depressão (Felber et al., 2018), se mostrou associado à formação de tecido ósseo (Posch et al., 2020), exatamente por inibir a ação de GSK3b favorecendo assim o acúmulo de β -catenina no núcleo e estimulando, por conseguinte, a osteoblastogênese (Leng et al., 2008).

A Monensina (Mon) é um composto natural isolado do *Streptomyces cinnamomensis* e pertence ao grupo de antibióticos ionóforos que se ligam a cátions como Na⁺, K⁺ e Li⁺. A Mon exibe um amplo espectro de atividades

biológicas tais como antimicrobiana, antiproliferativa, antiparasitária e anti-viral (Urbaniak et al., 2022). No entanto, mais recentemente, a Monensina tem sido estudada como fármaco com atividade anti-câncer (Urbaniak et al., 2022), mostrando efeito positivo tanto *in vitro* quanto *in vivo* contra células de melanoma (Xiu et al., 2019), leucemia mielóide aguda (Yusenko et al., 2020) e câncer de próstata (Vanneste et al., 2019). Tal efeito se deve ao bloqueio da fosforilação de LRP6 induzindo sua degradação, e mais especialmente a inibição da β -catenina, bloqueando desta forma a via WNT (Tumova et al., 2014).

Sendo assim, sabendo que a via WNT tem participação direta no metabolismo ósseo e que pode ser modulada por fármacos tais como Cloreto de lítio e a Monensina, nos parece interessante avaliar o efeito desses agentes, isoladamente e/ou em associação, na perda óssea inflamatória induzida em ratos por meio do modelo de periodontite induzida por ligadura.

MATERIAS E MÉTODOS

Desenho do estudo e aspectos éticos

Este é um estudo experimental utilizando modelos animais de ratos submetidos à periodontite. Os experimentos tiveram os seus protocolos realizados baseados nas recomendações apresentadas no ARRIVE *guidelines* (*Animal Research: Reporting In Vivo Experiments guidelines*) e se iniciaram logo após aprovação na Comissão de Ética para o Uso de Animais da UFC (CEUA nº7128020620) (ANEXO A), o qual é regido pela Declaração Universal de Direitos Animais (UNESCO – 27 de Janeiro 1978) e pelos Guias Éticos Internacionais para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (Conselho para Organizações Internacionais de Ciências Médicas – CIOMS).

Animais

Neste estudo foram utilizados 90 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com massa corpórea de aproximadamente 200 gramas na 12ª semana de vida. Esses animais foram procedentes do Biotério Central do Campus do Pici - UFC. Todos receberam ração comercial balanceada e água *ad libitum* e permaneceram nas mesmas condições ambientais de ciclos claro/escuro de 12 horas e temperatura ambiente de 22°C durante todo o experimento.

Modelo de Periodontite Experimental

A periodontite foi induzida por meio da inserção de um fio de sutura de náilon 3.0, em torno do 2º molar superior esquerdo (De lima et al., 2000) em um rato anestesiado com Ketamina e Xilazina (75 mg/kg de Ketamina + 8 mg/kg de Xilazina, IP). Após a passagem do fio, foi dado um nó cirúrgico voltado para a face vestibular da cavidade oral do animal. Ao final do experimento os animais foram eutanasiados por meio de overdose de Ketamina (225 mg/kg) e Xilazina (24 mg/kg) administrada por via IP no 11º dia, dia de pico das lesões ósseas (De lima et al., 2000).

Protocolo Experimental

Os animais foram inicialmente divididos em 5 grupos (n=6 por grupo):

- Grupo Naive (N), onde os animais não foram submetidos a nenhum tratamento nem procedimento
- Grupo periodontite experimental (PE), onde os animais receberam óleo de milho, por gavagem, 30 min antes da realização da indução da periodontite, e diariamente por 11 dias consecutivos, até a eutanásia;
- Grupo Monensina (Mon), onde os animais receberam 10mg/kg de Monensina (Sigma-Aldrich-San Luis, Missouri, EUA- No. M5273), por gavagem, 30 min antes da indução da realização da periodontite, e diariamente por 11 dias consecutivos, até a eutanásia (Tumova et al., 2014);
- Grupo Cloreto de Lítio (LiCl) (Cequímica-Fortaleza, Ceará, Brasil- Cloreto de lítio anidro 98% PA), onde os animais receberam 150mg/kg de LiCl em dias alternados por gavagem durante 11 dias até a eutanásia) (De Souza Malta et al., 2020);
- Grupo Monensina+Cloreto de Lítio (Mon+LiCl), recebeu diariamente 10mg/kg de Mon e 150 mg/kg de LiCl em dias alternados por gavagem durante 11 dias até a eutanásia.

Para este estudo 3 sets de experimentos (n=30 animais/set) foram realizados para: 1) análise macroscópica; 2) estudo histopatológico, e histomorfométrico; 3) avaliação da expressão gênica de marcadores do metabolismo ósseo por PCR e dosagens séricas de DKK1 e CTx.

Análise macroscópica do osso alveolar

Após a eutanásia, as maxilas foram removidas e fixadas em formol tamponado 10% por 48 horas. Em seguida foram dissecadas e separadas em hemiarçadas, clarificadas em hipoclorito de sódio a 2,5% por 1 minuto e, coradas em azul de metileno a 1% por 10 segundos, a fim de diferenciar o tecido ósseo dos dentes (Adaptado de Goes et al., 2010).

Posteriormente, as hemimaxilas foram fixadas em massa de modelar e fotografadas. A reabsorção óssea foi medida considerando a área entre a

junção cimento-esmalte e crista óssea na região entre a mesial do primeiro molar e a distal do terceiro molar, comparando-se os grupos através do software Image J® (NIH, Bethesda, Maryland, EUA) (Adaptado Goes et al., 2010).

Análise histopatológica do periodonto

Para esta análise, um novo set de experimentos foi realizado. Após a eutanásia dos animais, as maxilas foram removidas e fixadas em formol neutro a 10% por 24 horas. Em seguida, foram descalcificadas em EDTA a 10%, pH neutro (Keklikoglu, 2004), por quatro semanas. Posteriormente, o material foi incluído em parafina e secções de 4 µm de espessura, foram coletadas, coradas por Hematoxilina-Eosina (HE).

Para a análise microscópica, foi considerada a região entre os 1º e 2º molares, atribuindo-se escores que variaram de 0-3, de acordo com a intensidade dos achados considerando os seguintes aspectos: presença/intensidade de infiltrado celular e estado de preservação do processo alveolar e cemento (Leitão et al., 2005). De forma que 0 foi classificado como ausente e 3 com elevada intensidade de alteração.

Análise histométrica do osso alveolar

As mesmas lâminas utilizadas para análise histológica foram usadas para a análise histométrica. Foram selecionadas as lâminas que apresentassem, na mesma secção histológica, raiz dental, papila interdentária e osso interproximal. Imagens foram obtidas dessa região em magnificação de 40x. As primeiras e últimas secções foram excluídas e 4 regiões igualmente distantes de cada dente foram selecionadas para avaliação histométrica (Goes et al., 2014). As imagens foram lançadas no software Image J® software (NIH, Bethesda, MD, EUA) e um observador cego para os grupos realizou a contagem de osteoblastos e osteoclastos por perímetro ósseo (N.Ob/B.Pm e N.Oc/B.Pm respectivamente) (Goes et al., 2019).

Coleta de sangue e análise bioquímica

Por ocasião da eutanásia, no dia 11° do experimento, após anestesia com xilazina (10mg/kg) e ketamina (80mg/kg) coletou-se 2ml de sangue de cada animal por punção da aorta abdominal para análise bioquímica de *Dickkopf protein 1* (DKK1) e *C-telopeptide of collagen* (CTx por meio de ELISA de acordo com as orientações do fabricante Abebio® (Wuhan, China).

Isolamento de mRNA e PCR quantitativo

No terceiro set dos experimentos, após eutanásia, as maxilas foram coletadas, o tecido gengival removido, e o tecido ósseo foi macerado em nitrogênio líquido através do uso de Trizol (Thermo Fischer- Waltham, Massachusetts, EUA). O mRNA extraído foi quantificado através de Nanodrop (Thermo Fischer- Waltham, Massachusetts, EUA) e em seguida transcrito, utilizando Superscript II (Invitrogen). Posteriormente foi realizado o ensaio de RT-PCR tendo como referencial SYBR_green (ABI 7500 Fast; Applied Biosystems). A condição para o PCR foi de 50°C por 2 minutos e 90°C por 10 minutos, posteriormente 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, onde foi utilizado o sistema RT-PCR a 7900HT da *Applied Biosystems*. Para cálculo dos resultados obtidos foi usado o método de ciclo de threshold (Livak & Schmittgen, 2001), onde foram apresentados como aumento x-fold relacionado à beta-actina. As sequências de *primers* foram:

Gene	Sequência
β -actina	3'TGAGCTGACCAGTTCCTCT5' 5'AAGCTCGCTCCTGTGAGTTC3'
Beta-catenina	3'TGAGCTGACCAGTTCCTCT5' 5'AAGCTCGCTCCTGTGAGTTC3'
Runx2	3'CCTTCCCTCCGAGACCCTAA5' 5'ATGGCTGCTCCCTTCTGAAC3'
OPG	3'CAAAGGCAGGGCATACTTCCT5' 5'CCAGTGCTAGGTGCTTCTCTG3'

Docking molecular com componentes da via WNT

A estrutura da Monensina (C₃₆H₆₂O₁₁) e do cristal de Cloreto de Lítio (LiCl) foram modeladas tridimensionalmente no software Avogadro 1.1.2 (Hanwell et al., 2012) e otimizadas geometricamente utilizando o método Teoria Funcional da Densidade (DFT) com funcional de correlação B3LYP e base 6-31G(d) presentes no software GAMESS (Barca et al., 2020). As estruturas proteicas (alvos) de Beta-catenina (PDB: 3OUX), GSK3b (PDB: 1I09) e o complexo LRP5/6 (PDB: 3S2K) de organismo *homo sapiens* foram obtidas no *Protein Data Bank* (PDB) (<https://www.rcsb.org/>), todas as estruturas foram definidas pela técnica de difração de raios-X e com resolução entre 1.20–2.10 Å. As posições dos encaixes do acoplamento foram baseadas no ligante nativo das macromoléculas disponíveis no PDB e com o uso do *Web Server Computed Atlas of Surface Topography of proteins - CASTp* (<http://sts.bioe.uic.edu/castp/calculation.html>). Para simulações de *docking* molecular foram utilizados o AutoDock tools (ADT) para preparação dos ligantes e alvos (Morris et al., 2009) e AutoDock Vina 1.1.2 para execução dos cálculos (Trott; Olson, 2010). A afinidade de ligação e as interações entre resíduos foi usada para determinar melhores interações moleculares. Os resultados foram visualizados usando ADT, Discovery Studio v4.5 (Biovia, 2020) e UCSF Chimera X (Pettersen et al., 2021).

Análise estatística

Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram submetidos ao teste ANOVA, seguido de Tukey e expressos em forma de Média±EPM. Os dados não-paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn e expressos em forma de mediana (mínima-máxima). Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* estatístico GraphPad Prism 6.0®, considerando um nível de significância de 95% (p<0,05).

RESULTADOS

Cloreto de lítio reduz a perda óssea potencializada pela Monensina

O modelo de periodontite experimental induzido por ligadura foi marcado por perda óssea, exposição radicular e lesão de furca (Figura 1A e B), associado a um importante infiltrado inflamatório, quando comparado ao grupo N (Figura 1B e Tabela 1). A Monensina potencializou a perda óssea em 28% comparado ao grupo PE (Figura 1A). Macroscópica e histologicamente foi possível observar maior reabsorção óssea e intensa destruição da arquitetura periodontal (Figura 1B e Tabela 1). O LiCl, por sua vez atenuou perda óssea em 28% comparado ao grupo PE (Figura 1A), preservando o osso alveolar e reduzindo a inflamação (Figura 1B; Tabela 1). A associação de Mon+LiCl foi capaz de prevenir a perda óssea em 29% ($p < 0,05$) e melhorar os aspectos histológicos do tecido (Figura 1B; Tabela 1), quando comparado a Monensina isoladamente.

Tabela 1: Análise histopatológica do periodonto.

Escore (0-3)	Grupos experimentais (n=6/grupo)				
	N	PE	Mon	LiCl	Mon+LiCl
(0) Ausência	0	0	0	0	0
(1) Discreta	0	0	0	4	1
(2) Moderada	0	2	1	2	4
(3) Intensa	0	4	5	0	1
Mediana (valores extremos)	0 (0-0)	3(2-3)^α	3(2-3)^α	1(1-2)^{*,#}	2(1-3)[#]

Valores apresentados número absoluto de animais/escore e em mediana (valores extremos).

N = Naive; PE = periodontite experimental; LiCl = Cloreto de lítio; Mon = Monensina

(α) indica a diferença estatística comparado ao grupo Naive (N);

(*) indica a diferença estatística comparado ao grupo periodontite experimental (PE);

(#) indica diferença estatística comparado a Monensina (Mon).

Teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn ($p < 0,05$).

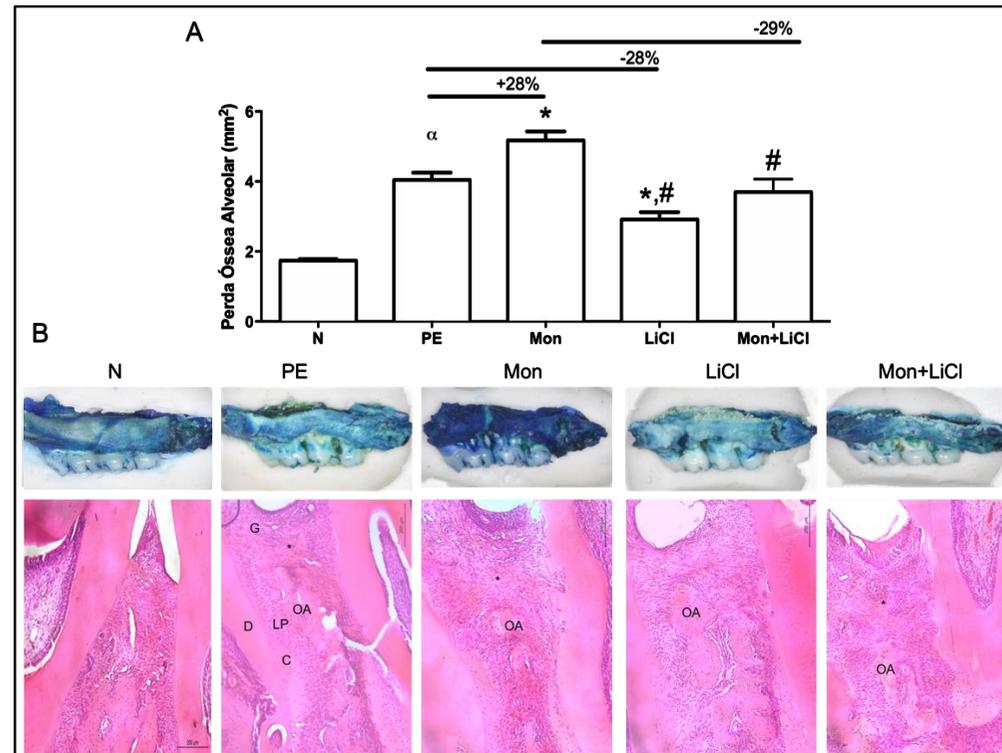


Figura 1. Efeito da associação de Monensina e Cloreto de Lítio na perda óssea alveolar. A) Perda óssea alveolar. B) Aspecto macroscópico e histológico do tecido periodontal. Barras representam a média±EPM de 6 animais por grupo. (α) indica a diferença estatística comparado ao grupo Naive (N); (*) indica a diferença estatística comparado ao grupo periodontite experimental (PE); (#) indica diferença estatística comparado a Monensina (Mon). Testes ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). OA=osso alveolar; G=gengiva; D=dentina; LP=ligamento periodontal; C=cimento; *=infiltrado inflamatório. Magnificação de 40X, coloração HE.

Cloreto de lítio reduz a osteoclastogênese causada pela Monensina

O modelo de periodontite aumentou o número de osteoclastos e a dosagem de CTx de forma significativa quando comparado ao grupo N. A Monensina potencializou o aumento em 58% do número de osteoclastos no tecido periodontal (Figura 2A e C). Tal efeito foi corroborado pelo aumento significativo de CTx (61%) quando comparado ao grupo PE (Figura 2B). O cloreto de lítio, por sua vez reduziu a contagem de osteoclastos em 39% bem como os níveis séricos de CTx (45%) quando comparado ao grupo PE. A associação de Mon+LiCl mostrou redução da quantidade de osteoclastos em 38% e dos níveis séricos de CTx em 27% quando comparado a Monensina isoladamente.

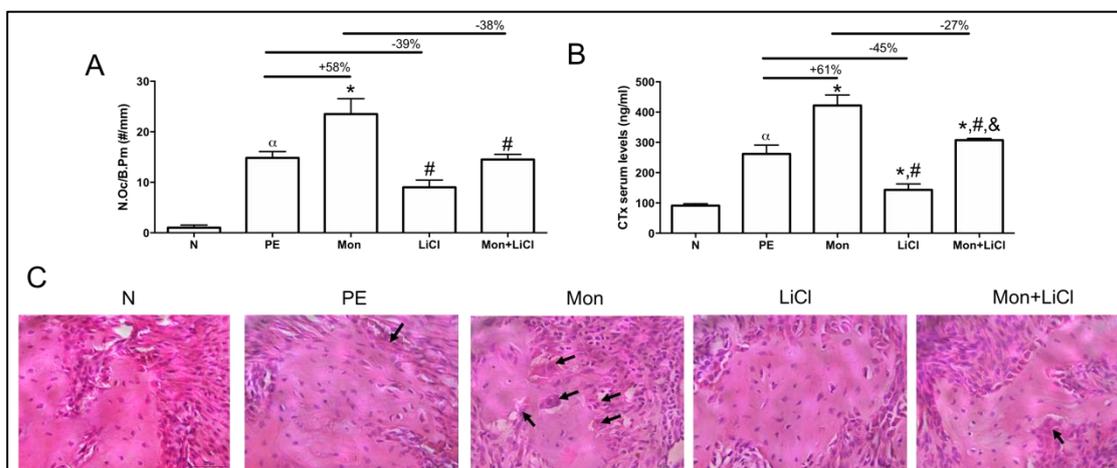


Figura 2: Efeito da associação de Monensina e Cloreto de Lítio sobre os osteoclastos. A) Contagem de osteoclastos/perímetro ósseo (N.Oc./B.Pm). B) Níveis séricos de CTx; C) Aspecto histológico do osso alveolar. Barras representam a média±EPM de 6 animais por grupo. (α) indica a diferença estatística comparado ao grupo Naive (N); (*) indica a diferença estatística comparado ao grupo periodontite experimental (PE); (#) indica diferença estatística comparado a Monensina (Mon); (&) indica a diferença estatística comparado ao Cloreto de Lítio (LiCl). Teste ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). Setas indicam osteoclastos. Magnificação de 400X, coloração HE.

Cloreto de lítio atenua efeito deletério da Monensina em osteoblastos

O modelo de periodontite causou uma redução significativa na contagem de osteoblastos quando comparado ao grupo N ($p < 0,05$). A Monensina reduz de forma significativa (57%) o número de osteoblastos no tecido ósseo periodontal comparado ao grupo PE (Figura 3A e 3B). A redução na expressão gênica de marcadores de osteoblastos, Runx2 (Figura 3C) e OPG (Figura 3D), corrobora os achados histomorfométricos observados no grupo Monensina. O tratamento com Cloreto de Litio, causou aumento da contagem de osteoblastos bem como da expressão gênica de RUNx2 e OPG. Os animais que receberam a associação de Mon+LiCl mostraram aumento significativo do número de osteoblastos (+103%) e da expressão de Runx2 (+288%) e OPG (+233%), quando comparado a Monensina isolada.

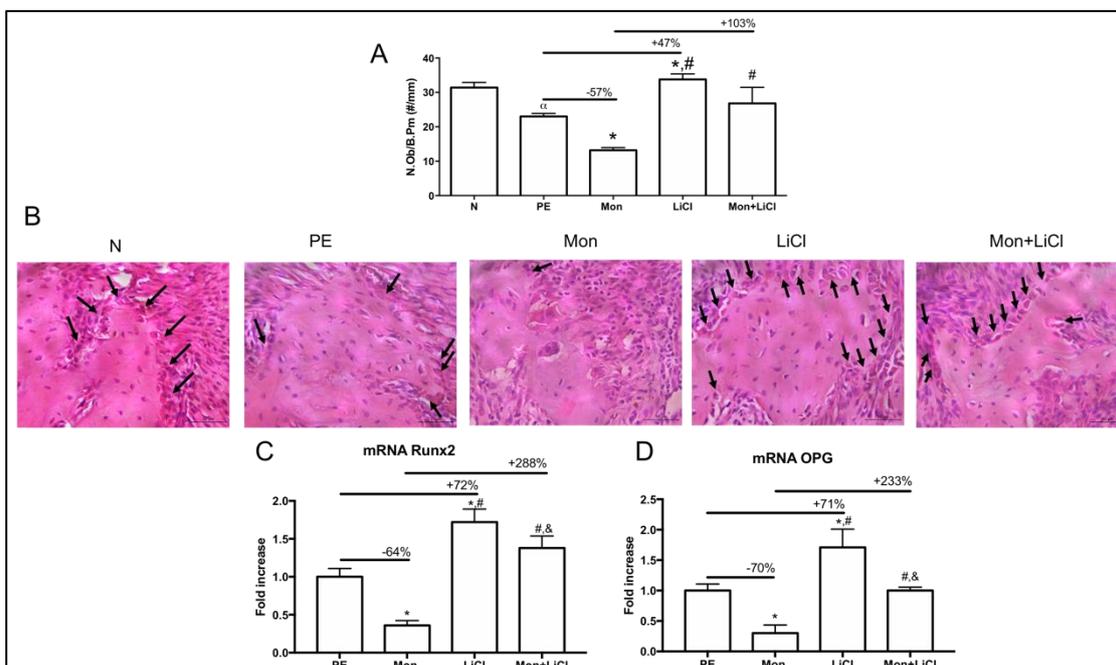


Figura 3: Efeito da associação de Monensina e Cloreto de Lítio sobre os osteoblastos. A) Contagem de osteoblastos/perímetro ósseo (N.Ob./B.Pm). B) Aspecto histológico do osso alveolar. C) Expressão gênica de Runx2 e D) OPG. Barras representam a média±EPM de 6 animais por grupo. Testes ANOVA e Tukey. ($p < 0,05$). (α) indica a diferença estatística comparado ao grupo Naive (N); (*) indica a diferença estatística comparado ao grupo periodontite experimental (PE); (#) indica diferença estatística comparado a Monensina (Mon); (&) indica a diferença estatística comparado ao Cloreto de Lítio (LiCl). Setas indicam osteoblastos. Magnificação de 400X, coloração HE.

Cloreto de lítio reduz o efeito da Monensina e ativa a via WNT

O efeito da associação da Monensina e Cloreto de Lítio sobre via WNT foi analisado em diferentes níveis a fim de explicar a ação destes moduladores no tecido ósseo. O DKK-1 é um dos principais antagonistas da WNT, mas parece não estar associado ao efeito osteoprotetor da associação Mon+LiCl, pois, nem a Monensina e/ou Cloreto de Lítio, foram capazes de alterar os níveis séricos de DKK (Figura 4A). LRP5/6 é o receptor para WNT, responsável por ativar esta via de sinalização. Estudos de *docking* molecular mostraram que a Monensina interage fortemente LRP5/6, com valor de afinidade de $-9,41 \text{ kcal/mol}^{-1}$. Não houve interação entre o Cloreto de Lítio e LRP5/6.

GSK3b é uma molecular chave da via WNT canônica, pois regula a quantidade de beta-catenina disponível no citoplasma. O Cloreto de Lítio, um inibidor de GSK3b, demonstrou forte afinidade ($-6,03 \text{ kcal/mol}^{-1}$) com essa molécula e enquanto a Monensina também apresentou duas ligações de hidrogênio nos resíduos TRP88 e GLY112 de GSK3b, com afinidade de interação ($-7,56 \text{ kcal/mol}^{-1}$) (Figura 4C).

A beta-catenina é a molécula efetora da via de sinalização WNT que sofre translocação para o núcleo estimulando a expressão genes osteoblastogênicos no osso, corroborando nossos achados. Foi observado que a Monensina, um inibidor de beta-catenina, causou redução significativa (-68%) da expressão gênica desta molécula, comparado ao grupo PE (Figura 4B). O Cloreto de lítio por sua vez, aumentou em 63% a expressão de beta-catenina. Interessantemente a associação de Mon+LiCl aumentou em 218% a expressão de beta-catenina comparado a Monensina isoladamente ($p < 0,05$) (Figura 4B). As análises de *docking* molecular mostraram uma forte afinidade de Monensina e beta-catenina ($-8,72 \text{ kcal/mol}^{-1}$) com ligações de hidrogênio com o aminoácido SER119 e diversas outras ligações hidrofóbicas. Adicionalmente, pela primeira vez foi observado uma interação entre Cloreto de Lítio e beta-catenina ($-8,95 \text{ kcal/mol}^{-1}$) com diversas ligações iônicas e de hidrogênio (Figura 4C).

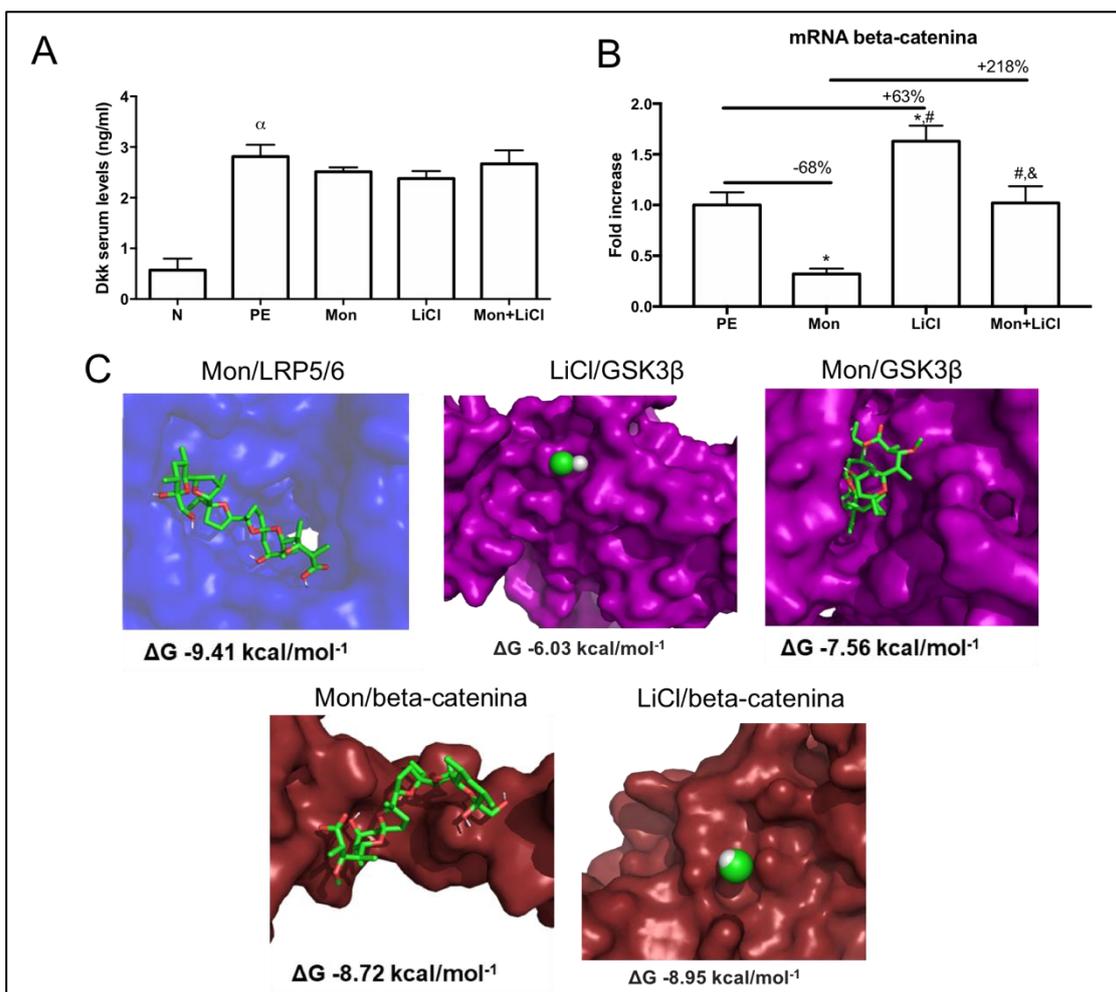


Figura 4: Efeito da associação de Monensina e Cloreto de Lítio em diferentes níveis da via WNT. A) Dosagem sérica de DKK-1; B) Expressão gênica de Beta-catenina; C) Afinidade de interação com LRP5/6, GSK3b e beta-catenina. Barras representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo. Testes ANOVA e Tukey. ($p < 0,05$) (α) indica a diferença estatística comparado ao grupo Naive (N); (*) indica a diferença estatística comparado ao grupo periodontite experimental (PE); (#) indica diferença estatística comparado a Monensina (Mon); (&) indica a diferença estatística comparado ao Cloreto de Lítio (LiCl).

DISCUSSÃO

Neste estudo foi demonstrado que a periodontite causou intensa reabsorção óssea, confirmando os achados prévios do nosso grupo sobre a efetividade do modelo de ligadura (Goes et al., 2014, 2016; Sousa et al., 2016, 2017; Alexandre et al., 2018; Goes et al., 2019; França et al., 2022). A Mon, um antagonista da via WNT, potencializou a perda óssea e a inflamação, aumentou o número de osteoclastos, enquanto causou redução na contagem de osteoblastos afetando também sua função. A Mon mostrou interação com diversos componentes da via WNT, e causou redução da expressão gênica de beta-catenina. Por outro lado, o LiCl, agonista da via, protegeu o tecido ósseo, reduziu a contagem de osteoclastos e aumentou o número de osteoblastos. Na via WNT canônica, LiCl mostrou interação com GSK3b e beta-catenina, e causou aumento da expressão gênica deste último. Quando LiCl foi administrado em associação com a Mon todos os efeitos reabsortivos causados pela Mon foram revertidos.

Os resultados deste estudo mostraram que a Mon apresentou efeito deletério no tecido ósseo, marcado pelo aumento de osteoclastos e redução de osteoblastos. A Mon é um antibiótico ionóforo que, apesar de ser utilizado há bastante tempo na medicina veterinária, recentemente tem sido indicada como fármaco com ação anti-câncer (Urbaniak et al., 2022), exatamente por inibir a via WNT canônica, através do bloqueio do receptor LRP5/6 e de beta-catenina (Tumova et al., 2014), o que foi confirmado pela forte afinidade nas análises de *docking* molecular. No tecido ósseo o bloqueio de WNT está relacionado ao aumento de osteoclastos (Goes et al., 2019).

O LiCl protegeu o tecido ósseo com redução de CTx, um marcador de osteoclastos, e aumento de Runx2 e OPG. Este agente tem sido usado para tratamento de transtornos mentais, mas que por atuar inibindo GSK3b (Wong et al., 2020; Naruse et al., 2021; Snitow et al., 2021), induz uma forte ativação da via WNT resultando em ativação de osteoblasto. No tecido ósseo, quando as proteínas WNT se ligam nos seus receptores LRP5/6 e Frizzled, uma cascata de sinalização se inicia culminando no bloqueio da ação do GSK3b, permitindo o acúmulo de beta-catenina no citoplasma, que então acessa o núcleo e estimula a expressão de genes como o Runx2, o principal fator de

transcrição de osteoblastos e OPG (Maeda et al., 2019). O aumento da expressão de OPG evita a interação entre RANK-RANKL, reduzindo, portanto, a osteoclastogênese.

Especificamente no periodonto estudos prévios confirmam nossos achados quanto ao efeito osteoprotetor do LiCl. Tem sido descrito que o LiCl reduz a perda óssea induzida por ligadura em ratas com deficiência de estrogênio, melhorando a área trabecular a elevada expressão de marcadores ósseos (De souza malta et al., 2020). Em modelo de movimentação ortodôntica, o LiCl reduziu a reabsorção radicular e minimiza a morte de células do ligamento periodontal (Ueda-ichinose et al., 2022). O lítio acelerou a cicatrização da periodontite apical em modelo animal (Naruse et al., 2021). Pan et al (2017) mostrou que o LiCl causou aumento de marcadores osteogênicos, Runx2 e Osterix. Em relação a Mon, à luz dos nossos conhecimentos, este é o primeiro estudo que mostra o efeito deste agente no tecido ósseo e periodontal.

Interessantemente, em associação, o LiCl foi capaz de atenuar o efeito reabsortivo da Mon em todos os parâmetros avaliados. Uma análise de *docking* molecular foi realizada para entender a ação desses agentes nos diversos níveis da via WNT. Dentre os achados podemos destacar que a Mon e o LiCl apresentaram forte associação com GSK3b e beta-catenina. Ainda são escassos estudos sobre o efeito direto destes agentes na beta-catenina. Apenas Isani et al. (2019) relataram que a Mon inibe beta-catenina. Quanto ao LiCl, não há qualquer relato na literatura sobre esta interação. Em relação ao GSK3, recentemente, foi mostrado que a Mon é capaz de reduzir a expressão de p-GSK3b (Ser9), ativando essa proteína e promovendo destruição de beta-catenina (Urbaniak et al., 2022). O LiCl, por sua vez, é um potente inibidor de GSK3b, que age tanto por competição direta com os íons magnésio pelo sítio de ligação desta proteína (Jopp, 2006), como indiretamente, através da fosforilação no aminoácido Ser9 atuando como um pseudosubstrato, inativando GSK3b e causando acúmulo de beta-catenina (Beurel et al., 2014). Portanto, os efeitos inibidores direto e indireto do cloreto de lítio em GSK3b podem ter contribuído de sobremaneira para reverter a ação inibitória da Mon na via WNT, protegendo, conseqüentemente, o tecido ósseo.

Vale salientar que este efeito protetor inibitório da monensina foi relacionado ao Cloreto de Lítio, uma vez que outros tipos de inibidores de

GSK3b, tais como BIO e CHIR99021, não conseguiram reverter a inibição da sinalização de WNT causada pela Mon (Tumova et al., 2014). A monensina é um ionóforo que se liga a Na⁺, K⁺ e Li⁺, facilitando sua entrada no interior da célula. Sabe-se que dentre estes íons, a Monensina tem uma forte ligação com Na⁺ (Prabhananda et al., 1998), porém, nós sugerimos que a grande oferta de Lítio, devido administração de LiCl, facilita sua ligação com a Mon, favorecendo a entrada desta molécula na célula e inibindo GSK3b de forma eficiente. Entretanto, mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

CONCLUSÃO

Em suma, os resultados deste estudo mostraram que a periodontite induz alteração do metabolismo ósseo a favor da osteoclastogênese. A Mon potencializa esta perda óssea enquanto o LiCl protege o tecido ósseo. Em associação foi observado que o LiCl foi capaz de atenuar os efeitos reabsortivos da Mon, mediado principalmente pela forte inibição em GSK3b.

REFERÊNCIAS

Alexandre, J. T. M., Sousa, L. H. T., Lisboa, M. R. P., Furlaneto, F. A., do Val, D. R., Marques, M., ... & Goes, P. (2018). Anti-inflammatory and antiresorptive effects of *Calendula officinalis* on inflammatory bone loss in rats. *Clinical oral investigations*, 22(6), 2175-2185. [https://doi: 10.1007/s00784-017-2308-7](https://doi.org/10.1007/s00784-017-2308-7).

Baker, P. J. (2005). Genetic control of the immune response in pathogenesis. *Journal of periodontology*, 76, 2042-2046. <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.11-S.2042>.

Barca, G. M., Bertoni, C., Carrington, L., Datta, D., De Silva, N., Deustua, J. E., & Gordon, M. S. (2020). Recent developments in the general atomic and molecular electronic structure system. *The Journal of chemical physics*, 152, article 154102. <https://doi.org/10.1063/5.0005188>.

Beurel, E., Grieco, S. F., & Jope, R. S. (2015). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. *Pharmacology & therapeutics*, 148, 114-131. [https://doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.016](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.016).

BIOVIA, Dassault Systèmes, BIOVIA Workbook, Release 2020.

De Lima, V., Bezerra, M. M., de Menezes Alencar, V. B., Daniel Portela Vidal, F., Da Rocha, F. A. C., de Castro Brito, G. A., & de Albuquerque Ribeiro, R. (2000). Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. *European journal of oral sciences*, 108(2), 123-129. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2000.00766.x>.

De Souza Malta, F., Napimoga, M. H., Marins, L. M., Miranda, T. S., de Oliveira, F. B., Posch, A. T., Feres, M. & Duarte, P. M. (2020). Lithium chloride assuages bone loss in experimental periodontitis in estrogen-deficient rats. *Clinical Oral Investigations*, 24(6), 2025-2036. [https://doi: 10.1007/s00784-019-03067-9](https://doi.org/10.1007/s00784-019-03067-9).

Felber, W., Bauer, M., Lewitzka, U., & Müller-Oerlinghausen, B. (2018). Lithium clinics in Berlin and Dresden: a 50-year experience. *Pharmacopsychiatry*, 51(05), 166-171. [https://doi: 10.1055/a-0633-3450](https://doi.org/10.1055/a-0633-3450).

França, A. L. D. Q., Chaves, H. V., Freire, J. M. D. O., de Sousa, L. H. T., Pimenta, A. T., Lima, M. A. S., ... & Bezerra, M. M. (2022). Molecular docking study and antireabsorptive activity of a semi-synthetic coumarin derivative from *Platymiscium floribundum* in the ligature-induced periodontitis in rats: The involvement of heme oxygenase-1. *Clinical Oral Investigations*, 26, 1701-1711. [https://doi: 10.1007/s00784-021-04143-9](https://doi.org/10.1007/s00784-021-04143-9).

Goes, P., Dutra, C. S., Lisboa, M. R., Gondim, D. V., Leitão, R., Brito, G. A., & Rego, R. O. (2016). Clinical efficacy of a 1% *Matricaria chamomile* L. mouthwash and 0.12% chlorhexidine for gingivitis control in patients undergoing orthodontic treatment with fixed appliances. *Journal of Oral Science*, 58, 569-574. <https://doi.org/10.2334/josnusd.16-0280>.

- Goes, P., Lima, A. P. S., Melo, I. M., Rêgo, R. O. C. C., & Lima, V. (2010). Effect of Atorvastatin in radiographic density on alveolar bone loss in wistar rats. *Brazilian Dental Journal*, *21*, 193-198. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402010000300003>.
- Goes, P., Melo, I. M., Silva, L. M. C. M., Benevides, N. M. B., Alencar, N. M. N., Ribeiro, R. A., & Lima, V. (2014). Low-dose combination of alendronate and atorvastatin reduces ligature-induced alveolar bone loss in rats. *Journal of periodontal research*, *49*, 45-54. <https://doi.org/10.1111/jre.12077>.
- Hanwell, M. D., Curtis, D. E., Lonie, D. C., Vandermeersch, T., Zurek, E., & Hutchison, G. R. (2012). Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of cheminformatics*, *4*, 1-17. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.
- Hienz, S.A., Paliwal, S. & Ivanovski, S. (2015). Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *Journal of Immunology Research*, *2015*, article 615486. <https://doi.org/10.1155/2015/615486>.
- Isani, M. A., Gee, K., Schall, K., Schlieve, C. R., Fode, A., Fowler, K. L., & Grikscheit, T. C. (2019). Wnt signaling inhibition by monensin results in a period of Hippo pathway activation during intestinal adaptation in zebrafish. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *316*(6), G679-G691. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00343.2018>.
- Jope, R. S. (2006). Lithium, the seminal GSK3 inhibitor. *Glycogen synthase kinase*, *3*, 223-242. <https://doi.org/10.1002/0470052171.ch12>.
- Keklikoglu, N. (2004). The localization of Fos B, a member of transcription factor AP-1 family, in rat odontoblasts and pulpal undifferentiated ectomesenchymal cells. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, *42*, 191-193.
- Leitão, R. F. C., Ribeiro, R. A., Chaves, H. V., Rocha, F. A. C., Lima, V., & Brito, G. A. C. (2005). Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *Journal of periodontology*, *76*, 956-963. <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.6.956>.
- Leng, Y., Liang, M. H., Ren, M., Marinova, Z., Leeds, P., & Chuang, D. M. (2008). Synergistic neuroprotective effects of lithium and valproic acid or other histone deacetylase inhibitors in neurons: roles of glycogen synthase kinase-3 inhibition. *Journal of Neuroscience*, *28*(10), 2576-2588. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5467-07.2008>.
- Lima, M. D. R., Lopes, A. P., Martins, C., Brito, G. A., Carneiro, V. C., & Goes, P. (2017). The effect of *Calendula officinalis* on oxidative stress and bone loss in experimental periodontitis. *Frontiers in physiology*, *8*, 440. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00440>.

Liu, F., Kohlmeier, S., & Wang, C. Y. (2008). Wnt signaling and skeletal development. *Cellular signalling*, *20*, 999-1009. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.11.011>.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*, *25*(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

Maeda, K., Kobayashi, Y., Koide, M., Uehara, S., Okamoto, M., Ishihara, A., ... & Marumo, K. (2019). The regulation of bone metabolism and disorders by Wnt signaling. *International journal of molecular sciences*, *20*, 5525. doi: 10.3390/ijms20225525.

Napimoga, M. H., Nametala, C., da Silva, F. L., Miranda, T. S., Bossonaro, J. P., Demasi, A. P. D., & Duarte, P. M. (2014). Involvement of the Wnt- β -catenin signalling antagonists, sclerostin and dickkopf-related protein 1, in chronic periodontitis. *Journal of clinical periodontology*, *41*, 550-557. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12245>.

Naruse, H., Itoh, S., Itoh, Y., Kagioka, T., Abe, M., & Hayashi, M. (2021). The Wnt/ β -catenin signaling pathway has a healing ability for periapical periodontitis. *Scientific reports*, *11*, 1-9. doi: 10.1038/s41598-021-99231-x.

Pan, J., He, S., Yin, X., Li, Y., Zhou, C., & Zou, S. (2017). Lithium enhances alveolar bone formation during orthodontic retention in rats. *Orthodontics & craniofacial research*, *20*, 146-151. <https://doi.org/10.1111/ocr.12190>.

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., ... & Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, *30*, 70-82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>.

Pitman, A., Suleman, S., Hyde, N., & Hodgkiss, A. (2018). Depression and anxiety in patients with cancer. *Bmj*, *361*. <https://doi.org/10.1136/bmj.k1415>.

Posch, A. T., de Avellar-Pinto, J. F., Malta, F. S., Marins, L. M., Teixeira, L. N., Peruzzo, D. C., & Napimoga, M. H. (2020). Lithium chloride improves bone filling around implants placed in estrogen-deficient rats. *Archives of Oral Biology*, *111*, article 104644. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104644>

Prabhananda, B. S., & Kombrabail, M. H. (1998). Relative magnitudes of the rate constants associated with monensin-mediated H⁺, Na⁺ and K⁺ translocations across phospholipid vesicular membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1370*, 41-50. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(97\)00243-5](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(97)00243-5).

Snitow, M. E., Bhansali, R. S., & Klein, P. S. (2021). Lithium and therapeutic targeting of GSK-3. *Cells*, *10*, 255. <https://doi.org/10.3390/cells10020255>.

Sousa, L. H. T., Moura, E. V., Queiroz, A. L., Val, D., Chaves, H., Lisboa, M., & Goes, P. (2017). Effects of glucocorticoid-induced osteoporosis on bone tissue of rats with experimental periodontitis. *Archives of Oral Biology*, *77*, 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.01.014>.

Sousa, L. H., Linhares, E. V., Alexandre, J. T., Lisboa, M. R., Furlaneto, F., Freitas, R., & Goes, P. (2016). Effects of atorvastatin on periodontitis of rats subjected to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Journal of periodontology*, *87*, 1206-1216. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.160075>.

Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of computational chemistry*, *31*(2), 455-461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.

Tumova, L., Pombinho, A. R., Vojtechova, M., Stancikova, J., Gradl, D., Krausova, M., & Korinek, V. (2014). Monensin Inhibits Canonical Wnt Signaling in Human Colorectal Cancer Cells and Suppresses Tumor Growth in Multiple Intestinal Neoplasia Mice Monensin Inhibits Wnt/ β -Catenin Signaling. *Molecular cancer therapeutics*, *13*, 812-822. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0625>.

Ueda-Ichinose, Y., Hotokezaka, H., Miyazaki, T., Moriishi, T., Hotokezaka, Y., Arizono, K., & Yoshida, N. (2022). Lithium reduces orthodontically induced root resorption by suppressing cell death, hyalinization, and odontoclast formation in rats. *The Angle Orthodontist*. <https://doi.org/10.2319/072221-578.2>.

Urbaniak, A., Reed, M. R., Heflin, B., Gaydos, J., Piña-Oviedo, S., Jędrzejczyk, M., & MacNicol, A. M. (2022). Anti-glioblastoma activity of monensin and its analogs in an organoid model of cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *153*, article113440. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113440>.

Usui, M., Onizuka, S., Sato, T., Kokabu S., Ariyoshi, W., Nakashima, K. (2021). Mechanism of alveolar bone destruction in periodontitis - Periodontal bacteria and inflammation. *Japanese Dental Science Review*, *57*, 201-208. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2021.09.005>.

Vanneste, M., Huang, Q., Li, M., Moose, D., Zhao, L., Stamnes, M. A., & Henry, M. D. (2019). High content screening identifies monensin as an EMT-selective cytotoxic compound. *Scientific reports*, *9*(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38019-y>.

Wong, S. K., Chin, K. Y., & Ima-Nirwana, S. (2020). The skeletal-protecting action and mechanisms of action for mood-stabilizing drug lithium chloride: current evidence and future potential research areas. *Frontiers in pharmacology*, *11*, 430. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.0043>.

Xin, H., Li, J., Zhang, H., Li, Y., Zeng, S., Wang, Z., & Deng, F. (2019). Monensin may inhibit melanoma by regulating the selection between differentiation and

stemness of melanoma stem cells. *PeerJ*, 7, e7354. <https://doi.org/10.7717/peerj.7354>.

Yusenko, M. V., Trentmann, A., Andersson, M. K., Ghani, L. A., Jakobs, A., Paz, M. F. A., & Klempnauer, K. H. (2020). Monensin, a novel potent MYB inhibitor, suppresses proliferation of acute myeloid leukemia and adenoid cystic carcinoma cells. *Cancer Letters*, 479, 61-70. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.01.039>.

4 CONCLUSÃO GERAL

Com base nos achados deste estudo, podemos concluir que a periodontite estimula a osteoclastogênese causando um desequilíbrio no metabolismo ósseo. Isoladamente a Monensina potencializa a perda óssea enquanto o LiCl protege o tecido ósseo. Em associação, o Cloreto de Lítio atenua a perda óssea periodontal potencializada pela Monensina, devido a maior ativação da via WNT canônica, mediada pela forte inibição de GSK3b, levando ao conseqüente aumento do estímulo da ação dos osteoblastos em relação aos osteoclastos.

REFERÊNCIAS

ADAMOWICZ, K.; WANG, H.; JOTWANI, R.; ZELLER, I.; POTEMPA, J.; SCOTT, D. A. Inhibition of GSK3 abolishes bacterial-induced periodontal bone loss in mice. **Molecular Medicine**, v. 18, n. 8, p. 1190-1196, 2012. <https://doi:10.2119/molmed.2012.00180>.

ALEXANDRE, J.T.M; SOUSA, L.H.T; LISBOA, M.R.P; FURLANETO, F.A.C; DO VAL, D.R; MARQUES, M.; VASCONCELOS, H.C; DE MELO, I.M; LEITÃO, R.; CASTRO, B.G.A; GOES, P. Anti-inflammatory and antiresorptive effects of *Calendula officinalis* on inflammatory bone loss in rats. **Clin Oral Investig**. v.22, n.6, p.2175-2185, 2018. <https://doi: 10.1007/s00784-017-2308-7>.

ALMOSHARI, Y.; REN, R.; ZHANG, H.; JIA, Z.; WEI, X.; CHEN, N.; WANG, D. GSK3 inhibitor-loaded osteotropic Pluronic hydrogel effectively mitigates periodontal tissue damage associated with experimental periodontitis. **Biomaterials**, v. 261, p. 120293, 2020. <https://doi:10.1016/j.biomaterials.2020.120293>.

BAKER, P.J. Genetic Control of the Immune Response in Pathogenesis. *Journal of Periodontology*, v.76, n. Supl 11, p. 2042-2046, 2005. <https://doi:10.1902/jop.2005.76.11-S.2042>.

BAO, J.; YANG, Y.; XIA, M.; SUN, W.; CHEN, L. Wnt signaling: An attractive target for periodontitis treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 133, p. 110935, 2021. <https://doi:10.1016/j.biopha.2020.110935>.

BARCA, G. M.; BERTONI, C.; CARRINGTON, L.; DATTA, D.; DE SILVA, N.; DEUSTUA, J. E.; ... GORDON, M. S. Recent developments in the general atomic and molecular electronic structure system. **The Journal of chemical physics**, v. 152, n. 15, p. 154102, 2020. <https://doi:10.1063/5.0005188>.

BARON, R.; KNEISSEL, M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. **Nature Medicine**, v. 19, n. 2, p. 179-192, 2013. <https://doi:10.1038/nm.3074>.

BEUREL, E.; GRIECO, S.F.; JOPE, R.S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases. **Pharmacol Ther**. v.148, p.114-31, 2015. <https://doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.016>.

BIOVIA, Dassault Systèmes, **BIOVIA Workbook**, Release 2020.

BRASIL. **Pesquisa Nacional de Saúde Bucal**: resultados principais. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: 2012. 116 p. ISBN 978-85-334-1987-2. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pesquisa_nacional_saude_bucal.pdf.

CHAIROUNGDU, A.; SMITH, D.L.; POCHARD, P.; HULL, M.; CAPLAN, M.J. Exosome release of β -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt

signaling. **Journal of Cell Biology**, v. 190, n. 6, p. 1079-1091, 2010. [https://doi: 10.1083/jcb.201002049](https://doi.org/10.1083/jcb.201002049).

CHAPMAN, H. D.; JEFFER, T. K.; WILLIAMS, R. B. Forty years of monensin for the control of coccidiosis in poultry. **Poultry Science**. v. 89, n. 9, p. 1788-1801, 2010. [https://doi: 10.3382/ps.2010-00931](https://doi.org/10.3382/ps.2010-00931).

COWEN, K.S.; SAKAMOTO, M.; SAKAMOTO, S. Monensin inhibits collagenase production in osteoblastic cell cultures and also inhibits both collagenase release and bone resorption in mouse calvaria cultures. **Biochemistry International**, v. 11, n. 3, p. 273-280, 1985.

DE LIMA, V.; BEZERRA, M. M.; DE MENEZES ALENCAR, V. B.; VIDAL, D. P.; DA ROCHA, F. A. C., DE CASTRO BRITO, G. A.; DE ALBUQUERQUE RIBEIRO, R. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **European Journal of Oral Science**, v. 108, n. 2, p. 123-129, 2000. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2000.00766.x>.

DE SOUZA MALTA, F.; NAPIMOGA, M. H.; MARINS, L. M.; MIRANDA, T. S.; DE OLIVEIRA, F. B.; POSCH, A. T.; FERES, M.; DUARTE, P. M. Lithium chloride assuages bone loss in experimental periodontitis in estrogen-deficient rats. **Clinical Oral Investigations**, v. 24, n. 6, p. 2025-2036, 2020. [https://doi: 10.1007/s00784-019-03067-9](https://doi.org/10.1007/s00784-019-03067-9).

FELBER W, BAUER M, LEWITZKA U, MÜLLER-OERLINGHAUSEN B. Lithium clinics in Berlin and Dresden: a 50-year experience. **Pharmacopsychiatry**, v. 51, n. 05, p. 166-171, 2018. [https://doi: 10.1055/a-0633-3450](https://doi.org/10.1055/a-0633-3450).

FRANÇA, A.L.Q.; CHAVES, H.V.; FREIRE, J.M.O.; DE SOUSA, L.H.T.; PIMENTA, A.T.A.; LIMA, M.A.S.; DE OLIVEIRA, B.R.; DE MATTOS, M.C.; PINTO, V.P.T.; PORTELA, A.M.L.R.; PEREIRA, K.M.A.; COSTA, J.J.D.N.; GOES, P.; JORGE, R.J.B.; SILVEIRA, J.A.M.; BRAZ, H.L.B.; DE MORAES, M.E.A.; BEZERRA, M.M. Molecular docking study and antireabsorptive activity of a semi-synthetic coumarin derivative from *Platymiscium floribundum* in the ligature-induced periodontitis in rats: The involvement of heme oxygenase-1. **Clinical Oral Investigations**, v. 26, n. 2, p. 1701-1711, 2022. [https://doi: 10.1007/s00784-021-04143-9](https://doi.org/10.1007/s00784-021-04143-9).

GOES, P.; LIMA, A. P. S.; MELO, I. M.; RÊGO, R. O. C. C.; LIMA, V. Effect of Atorvastatin in radiographic density on alveolar bone loss in wistar rats. **Brazilian Dental Journal**, v. 21, p. 193-198, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402010000300003>.

GOES, P.; MELO, I. M.; SILVA, L. M. C. M.; BENEVIDES, N. M. B.; ALENCAR, N. M. N.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, V. Low-dose combination of alendronate and atorvastatin reduces ligature-induced alveolar bone loss in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 49, n. 1, p. 45-54, 2014. <https://doi.org/10.1111/jre.12077>.

GOES, P.; DUTRA, C. S.; LISBOA, M. R.; GONDIM, D. V.; LEITÃO, R.; BRITO, G. A.; REGO, R. O. Clinical efficacy of a 1% Matricaria chamomile L. mouthwash and 0.12% chlorhexidine for gingivitis control in patients undergoing orthodontic treatment with fixed appliances. **Journal of Oral Science**, v. 58, n. 4, p. 569-574, 2016. <https://doi.org/10.2334/josnurd.16-0280>.

GOES, P.; DUTRA, C.; LOSSER, L.; HOFBAUER, L. C.; RAUNER, M.; THIELE, S. Loss of Dkk-1 in osteocytes mitigates alveolar bone loss in mice with periodontitis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2924, 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02924>.

HANWELL, M. D.; CURTIS, D. E.; LONIE, D. C.; VANDERMEERSCH, T.; ZUREK, E.; HUTCHISON, G. R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 1-17, 2012. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.

HIENZ, S.A.; PALIWAL, S.; IVANOVKI, S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. **Journal of Immunology Research**. v. 2015, p. 615486, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/615486>.

ISANI, M.A.; GEE, K.; SCHALL, K.; SCHLIEVE, C.R.; FODE, A.; FOWLER, K.L.; GRIKSCHIT, T.C.; Wnt signaling inhibition by monensin results in a period of Hippo pathway activation during intestinal adaptation in zebrafish. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. v.316 n.6 p.G679-G691, 2019. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00343.2018>.

JIANG, H.; ZHONG, J.; LI, W.; DONG, J.; XIAN, C.G.; SHEN, Y.K.; YAO, L.; WU, Q.; WANG, L. Gentiopicroside promotes osteogenesis and prevents bone loss in ovariectomized mice by modulation of β -catenin-BMP2 signaling pathway. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 25, n. 23, 2021. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-50702/v1>.

JOPE, R.S. Lithium, the seminal GSK3 inhibitor. In: MARTINEZ, A.; CASTRO A.; MEDINA, M. editors. **Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) and its inhibitors**. JOHN WILEY AND SONS. v.3 p.223-242, 2006. <https://doi.org/10.1002/0470052171.ch12>.

KAHN, M. Can we safely target the WNT pathway? **Nature reviews Drug discovery**, v. 13, n. 7, p. 513-532, 2014. <https://doi.org/10.1038/nrd4233>.

KAPELLAS, K., SINGH, A., BERTOTTI, M., NASCIMENTO, G. G., JAMIESON, L. M. Periodontal and chronic kidney disease association: A systematic review and meta-analysis. **Nephrology**, v. 24, n. 2, p. 202-212, 2019. <https://doi.org/10.1111/nep.13225>.

KEKLIKOGLU, N. The localization of Fos B, a member of transcription factor AP-1 family, in rat odontoblasts and pulpal undifferentiated ectomesenchymal cells. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 42, n. 3, p. 191-193, 2004. <https://doi.org/10.5603/4642>.

- KIM, S. E.; YUN, Y. P.; HAN, Y. K.; LEE, D. W.; OHE, J. Y.; LEE, B. S.; ... CHOI, B. J. Osteogenesis induction of periodontal ligament cells onto bone morphogenic protein-2 immobilized PCL fibers. **Carbohydrate polymers**, v. 99, p. 700-709, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.053>.
- KIM, P. D.; XIA-JUAN, X.; CRUMP, K. E.; ABE, T.; HAJISHENGALLIS, G.; SAHINGUR, S. E. Toll-like receptor 9-mediated inflammation triggers alveolar bone loss in experimental murine periodontitis. **Infection and immunity**, v. 83, n. 7, p. 2992-3002, 2015. <https://doi.org/10.1128/IAI.00424-15>.
- KIM, J. H.; KOO, K. T.; CAPETILLO, J.; KIM, J. J.; YOO, J. M.; AMARA, H. B.; ... & WIKESJÖ, U. M. Periodontal and endodontic pathology delays extraction socket healing in a canine model. **Journal of Periodontal & Implant Science**, v. 47, n. 3, p. 143-153, 2017. <https://doi.org/10.5051/jpis.2017.47.3.143>.
- KOBAYASHI, Y.; UEHARA, S.; UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N. Regulation of bone metabolism by Wnt signals. **The Journal of Biochemistry**, v.159, n.4, p.387-392, 2016. <https://doi.org/10.1093/jb/mvv124>.
- KUBOTA, T.; MICHIGAMI, T.; OZONO, K. Wnt signaling in bone metabolism. **Journal of bone and mineral metabolism**, v. 27, n. 3, p. 265-271, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00774-009-0064-8>.
- LENG, Y.; LIANG, M.; REN, M.; MARINOVA, Z., LEEDS, P.; CHUANG, D. Synergistic Neuroprotective Effects of Lithium and Valproic Acid or Other Histone Deacetylase Inhibitors in Neurons: Roles of Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibition. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 10, p. 2576-2588, 2008. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5467-07.2008>.
- LEITÃO, R.F. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v. 76, n. 6, p. 956-963, 2005. <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.6.956>.
- LI, J.; ZHANG, Y.; ZHAO, Q.; WANG, J.; HE, X. MicroRNA-10a influences osteoblast differentiation and angiogenesis by regulating β -catenin expression. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 6, p. 2194-2208, 2015. <https://doi.org/10.1159/000438576>.
- LIM, W. H.; LIU, B.; CHENG, D.; WILLIAMS, B. O.; MAH, S. J.; HELMS, J. A. Wnt signaling regulates homeostasis of the periodontal ligament. **Journal Of Periodontal Research**, v. 49, n. 6, p. 751-759, 2014.
- LIM, E.K.; KEEM, J.O.; YUN, H.S.; JUNG, J.; CHUNG, B. H. Smart nanoprobe for the detection of alkaline phosphatase activity during osteoblast differentiation. **Chem Commun.**, v. 51, n.15, p. 3270–3272, 2015. <https://doi.org/10.1039/c4cc09620g>.
- LIMA, M. R.; LOPES, A. M.; MARTINS, C.; BRITO, G. A. C.; CARNEIRO, V. C.; GOES, P. The effect of *Calendula officinalis* on oxidative stress and bone

loss in experimental periodontitis. **Frontiers in Physiology**, v. 8, p. 440, 2017. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00440>.

LIU, F.; KOHLMEIER, S.; WANG, C. Y. SEAN; WANG, CUN-YU. Wnt signaling and skeletal development. **Cellular signalling**, v. 20, n. 6, p. 999-1009, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.11.011>.

LIU, J.; REN, X.; ZHANG, M.; LEI, Y.; CHEN, Y.; HE, H. Roles of Wnt3a and Dkk1 in experimental periodontitis. **Journal of dental sciences**, v. 12, n. 3, p. 220-225, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2016.11.006>.

LIU, Q.; LI, M.; WANG, S.; XIAO, Z.; XIONG, Y.; WANG, G. Recent advances of osterix transcription factor in osteoblast differentiation and bone formation. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 601224, 2020. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.601224>.

LIU, J.; XIAO, Q.; XIAO, J.; NIU, C.; LI, Y., ZHANG, X.; ZHOU, Z.; SHU, G.; YIN, G. Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 7, n. 1, p. 3, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00762-6>.

LIVAK, K.J. SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) **Method. Methods**. v.25, p. 402-408, 2001. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

LÓPEZ-HERRADÓN, A.; PORTAL-NÚÑEZ, S.; GARCÍA-MARTÍN, A.; LOZANO, D.; PÉREZ-MARTÍNEZ, F. C.; CEÑA, V.; ESBRIT, P. Inhibition of the canonical Wnt pathway by high glucose can be reversed by parathyroid hormone-related protein in osteoblastic cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 8, p. 1908-1916, 2013. <https://doi.org/10.1002/jcb.24535>.

MAEDA K, KOBAYASHI Y, KOIDE M, UEHARA S, OKAMOTO M, ISHIHARA A, KAYAMA T, SAITO M, MARUMO K. The Regulation of Bone Metabolism and Disorders by Wnt Signaling. **Int J Mol Sci**. v.20 n.22 p.5525, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20225525>.

MOLLENHAUER, H. H.; MORRÉ, D. J.; ROWE, L. D. Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, v. 1031, n. 2, p. 225-246, 1990. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(90\)90008-z](https://doi.org/10.1016/0304-4157(90)90008-z).

NAM, D.; BALASUBERAMANIAM, P.; MILNER, K.; KUNZ, M.; VACHHANI, K.; KISS, A.; WHYNE, C. Lithium for Fracture Treatment (LiFT): a double-blind randomised control trial protocol. **BMJ open**, v. 10, n. 1, p. e031545, 2020. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-031545>.

NAPIMOGA M.H; NAMETALA C, S. F. L; MIRANDA T.S; BOSSONARO J.P; DEMASIAP, D. P. M. Involvement of the Wnt- β -catenin signalling antagonists, sclerostin and dickkopf-related protein 1, in chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 41, n. 6, p. 550-557, 2014. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12245>

NARUSE, H.; ITOH, S.; ITOH, Y.; KAGIOKA, T.; ABE, M.; HAYASHI, M. The Wnt/ β -catenin signaling pathway has a healing ability for periapical periodontitis. **Sci Rep**. v.11 n.1 p.19673, 2021. <https://doi:10.1038/s41598-021-99231-x>.

NIEHRS C. The complex world of WNT receptor signalling. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 13, n. 12, p. 767, 2012. <https://doi:10.1038/nrm3470>.

OFFENBACHER, S.; DIVARIS, K.; BARROS, S. P.; MOSS, K. L.; MARCHESAN, J. T.; MORELLI, T.; LAUDES, M. Genome-wide association study of biologically informed periodontal complex traits offers novel insights into the genetic basis of periodontal disease. **Human molecular genetics**, v. 25, n. 10, p. 2113-2129, 2016. <https://doi:10.1093/hmg/ddw069>.

PAN, J.; HE, S.; YIN, X.; LI, Y.; ZHOU, C.; ZOU, S. Lithium enhances alveolar bone formation during orthodontic retention in rats. **Orthodontics & craniofacial research**, v. 20, n. 3, p. 146-151, 2017. <https://doi:10.1111/ocr.12190>.

PETTERSEN, E.F.; GODDARD, T.D.; HUANG, C.C.;...FERRIN, T.E. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein Science**. v.30, p.70-82, 2021. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>.

PITMAN, A.; SULEMAN, S.; HYDE, N.; HODGKISS, A. Depression and anxiety in patients with cancer. **Bmj**, v. 361, 2018.. <https://doi:10.1136/bmj.k1415>.

POSCH, A. T.; DE AVELLAR-PINTO, J. F.; MALTA, F. S.; MARINS, L. M.; TEIXEIRA, L. N.; PERUZZO, D. C.; MARTINEZ, E. F.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; DUARTE, P. M.; NAPIMOGA, M. H. Lithium chloride improves bone filling around implants placed in estrogen-deficient rats. **Archives of Oral Biology**, v. 111, p. 104644, 2020. <https://doi:10.1016/j.archoralbio.2019.104644>.

PRABHANANDA, B.S.; KOMBRABAIL, M.H. Relative magnitudes of the rate constants associated with monensin-mediated H⁺, Na⁺ and K⁺ translocations across phospholipid vesicular membranes. **Biochim Biophys Acta**. V.1370 n.1 p.41-50, 1998. [https://doi:10.1016/s0005-2736\(97\)00243-5](https://doi:10.1016/s0005-2736(97)00243-5).

PRESSMAN, B.C. Biological applications of ionophores. **Annals Revision Biochemical**. v. 45, p. 501-513, 1976. <https://doi:10.1146/annurev.bi.45.070176.002441>.

ROSSINI M; GATTI D; ADAMI S. Involvement of WNT/ β -catenin signaling in the treatment of osteoporosis. **Calcified tissue international**, v. 93, n. 2, p. 121-132, 2013. [https://doi: 10.1007/s00223-013-9749-z](https://doi.org/10.1007/s00223-013-9749-z).

SCHUPBACH, D.; COMEAU-GAUTHIER, M.; HARVEY, E.; MERLE, G. Drew et al. Wnt modulation in bone healing. **Bone**, v.138, p.115491, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115491>.

SNITOW, M. E.; BHANSALI, R. S.; KLEIN, P. S. Lithium and therapeutic targeting of GSK-3. **Cells**, v. 10, n. 2, p. 255, 2021. [https://doi: 10.1016/j.bone.2020.115491](https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115491).

SOUSA, L.H.; LINHARES, E.V.; ALEXANDRE, J.T.; LISBOA, M.R.; FURLANETO, F.; FREITAS, R.; ... GOES, P. Effects of atorvastatin on periodontitis of rats subjected to glucocorticoid-induced osteoporosis. **Journal of periodontology**, v. 87, n. 10, p. 1206-1216, 2016. [https://doi:10.1902/jop.2016.160075](https://doi.org/10.1902/jop.2016.160075).

SOUSA, L. H. T.; MOURA, E. V.; QUEIROZ, A. L.; VAL, D.; CHAVES, H.; LISBOA, M.; ... GOES, P. Effects of glucocorticoid-induced osteoporosis on bone tissue of rats with experimental periodontitis. **Archives of Oral Biology**, v. 77, p. 55-61, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.01.014>.

SUDA, T.; NAGASAWA, T.; WARA-ASWAPATI, N.; KOBAYASHI, H.; IWASAKI, K.; YASHIRO, R.; ... IZUMI, Y. Regulatory roles of β -catenin and AP-1 on osteoprotegerin production in interleukin-1 α -stimulated periodontal ligament cells. **Oral microbiology and immunology**, v. 24, n. 5, p. 384-389, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2009.00529.x>.

TROTT, O.; OLSON, A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J Comput Chem**. v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010. [https://doi:10.1002/jcc.21334](https://doi.org/10.1002/jcc.21334).

TUMOVA, L.; POMBINHO, A. R.; VOJTECHOVA, M.; STANCIKOVA, J.; GRADL, D.; KRAUSOVA, M.; ... & JINDRICH, J. Monensin inhibits canonical Wnt signaling in human colorectal cancer cells and suppresses tumor growth in multiple intestinal neoplasia mice. **Molecular cancer therapeutics**, v. 13, n. 4, p. 812-822, 2014. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0625>.

UEDA-ICHINOSE, Y.; HOTOKEZAKA, H.; MIYAZAKI, T.; MORIISHI, T.; HOTOKEZAKA, Y.; ARIZONO, K.; NAKAMURA, T.; YOSHIDA, N. Lithium reduces orthodontically induced root resorption by suppressing cell death, hyalinization, and odontoclast formation in rats. **Angle Orthod**. v.92, n.4, p.547-54, 2022. [https://doi:10.2319/072221-578.2](https://doi.org/10.2319/072221-578.2).

URBANIĄK, A.; REED, M.R.; HEFLIN, B.; GAYDOS, J.; PIÑA-OVIEDO S.; JĘDRZEJCZYK, M.; KLEJBOROWSKA, G.; STĘPCZYŃSKA, N.; CHAMBERS

T.C.; TACKETT, A.J.; RODRIGUEZ, A.; HUCZYŃSKI, A.; EOFF, R.L.; MACNICOL, A.M. Anti-glioblastoma activity of monensin and its analogs in an organoid model of cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 153, p. 113440, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113440>.

USUI M; ONIZUKA S; SATO T; KOKABU S; ARIYOSHI W; NAKASHIMA K. Mechanism of alveolar bone destruction in periodontitis - Periodontal bacteria and inflammation. **Jpn Dent Sci Rev**. 2021 Nov;57:201-208. [https://doi: 10.1016/j.jdsr.2021.09.005](https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2021.09.005).

VANNESTE, M.; HUANG, Q.; LI M.; MOOSE, D.; ZHAO, L.; STAMNES, M.A.; SCHULTZ M, W.U. M.; HENRY, M.D.; CARVER, L.A.; High content screening identifies monensin as an EMT-selective cytotoxic compound. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38019-y>.

WONG, S. K.; CHIN, K. Y.; IMA-NIRWANA, S. The skeletal-protecting action and mechanisms of action for mood-stabilizing drug lithium chloride: current evidence and future potential research areas. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 430, 2020. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.0043>.

YANG, B.; LI, S.; CHEN, Z.; FENG, F.; HE, L.; LIU, B.; ... RONG, L. Amyloid β peptide promotes bone formation by regulating Wnt/ β -catenin signaling and the OPG/RANKL/RANK system. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 3, p. 3583-3593, 2020. <https://doi.org/10.1096/fj.201901550R>.

YUCEL-LINDBERG, T.; BAGE, T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 15, p. e7, 2013. [https://doi: 10.1017/erm.2013.8](https://doi.org/10.1017/erm.2013.8).

YUSENKO, M.V.; TRENTMANN, A; ANDERSSON, M.K.; GHANI, L.A.; JAKOBS, A.; ARTEAGA, M.F.; MIKESCH, J.H.; PETER, V. K. J.; STENMAN G.; KLEMPNAUER, K.H. Monensin, a novel potent MYB inhibitor, suppresses proliferation of acute myeloid leukemia and adenoid cystic carcinoma cells. **Cancer Letters**, v. 479, p. 61-70, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.01.039>.

ZHANG, Z.; XIN, H.; LI, J.; ZHANG, H.; LI, Y.; ZENG S.; WANG, Z.; DENG F. Monensin may inhibit melanoma by regulating the selection between differentiation and stemness of melanoma stem cells. **PeerJ**, v. 7, p. e7354, 2019. [https://doi: 10.7717/peerj.7354](https://doi.org/10.7717/peerj.7354).

ZHU, Z.; YIN, J.; GUAN, J.; HU, B.; NIU, X.; JIN, D.; ... ZHANG, C. Lithium stimulates human bone marrow derived mesenchymal stem cell proliferation through GSK-3 β -dependent β -catenin/Wnt pathway activation. **The FEBS journal**, v. 281, n. 23, p. 5371-5389, 2014. [https://doi: 10.1111/febs.13081](https://doi.org/10.1111/febs.13081).

ANEXO A

Certificado de aprovação na Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) DA Universidade Federal do Ceará (UFC)



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da participação da via de sinalização WNT no efeito antireabsortivo dos sais de lítio em modelo de periodontite experimental em ratos.", protocolada sob o CEUA nº 7128020620 (0 001642), sob a responsabilidade de **Paula Goes Pinheiro Dutra** e equipe; Anderson Chagas Coelho; Diego Thiers Oliveira Carneiro; Bárbara Gressy Duarte Souza Carneiro; Gisele Barreto Angelino; Delane Viana Gondim - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilio Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 16/06/2020.

We certify that the proposal "Evaluation of the participation of the WNT signaling pathway in the lithium salts antireabsortive effect in the model of experimental periodontitis in rats.", utilizing 90 Heterogenics rats (90 males), protocol number CEUA 7128020620 (0 001642), under the responsibility of **Paula Goes Pinheiro Dutra** and team; Anderson Chagas Coelho; Diego Thiers Oliveira Carneiro; Bárbara Gressy Duarte Souza Carneiro; Gisele Barreto Angelino; Delane Viana Gondim - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 06/16/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de 06/2020 a 02/2022

Área: [Departamento de Patologia E Medicina Legal](#)

Origem: [Biotério Central da UFC](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [4 a 6 semanas](#)

N: [90](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [180 a 200 g](#)

Local do experimento: Sala de experimentação do biotério.

Fortaleza, 03 de setembro de 2020

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Camila Ferreira Roncari

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará