

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MARIANA SOARES PENA RIBEIRO

Papel da AMPK α 1 sobre a osteoclastogênese e reabsorção óssea na osteoporose experimental

**Ribeirão Preto
2021**

MARIANA SOARES PENA RIBEIRO

Papel da AMPK α 1 sobre a osteoclastogênese e reabsorção óssea na osteoporose experimental

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Programa: Imunologia Básica e Aplicada

Área de Concentração: Imunologia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sandra Yasuyo Fukada

**Ribeirão Preto
2021**

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Soares, Mariana Ribeiro Pena

Papel da AMPK α 1 sobre a osteoclastogênese e reabsorção óssea na osteoporose experimental. Ribeirão Preto, 2021.

57 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Imunologia.

Orientadora: Fukada, Sandra Yasuyo

1. Osteoclastogênese. 2. Osteoporose. 3. AMPK α 1. 4. Reabsorção óssea.

Soares, MRP. Papel da AMPK α 1 sobre a osteoclastogênese e reabsorção óssea na osteoporose experimental.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Aprovada em: __ / __ / __

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a).

_____ Instituição: _____

Julgamento:

_____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).

_____ Instituição: _____

Julgamento:

_____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).

_____ Instituição: _____

Julgamento:

_____ Assinatura: _____

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Ricardo Pena e Márcia Soares Pena**, que nunca mediram esforços e recursos na minha formação pessoal e profissional. Sou muito grata pela dedicação e amor.

Ao meu marido, **Fernando Oliveira Lima Ribeiro**, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

Ao meu filho, **Gabriel**, que está a caminho, com gratidão porque trazer ainda mais alegrias, amor e felicidades no meu caminho.

À minha sogra, **Vera Lúcia de Oliveira Lima Ribeiro**, que hoje está no céu, pelo seu apoio e carinho de sempre. Sei que de onde você estiver, estará torcendo por nós.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço à minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Sandra Yasuyo Fukada Alves** pela ajuda durante a execução desse trabalho, pela confiança e dedicação para que este trabalho fosse executado. Muito obrigada por todo aprendizado, compreensão, atenção e pela amizade.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual Diretor Prof. Dr. Rui Alberto Ferriani e do Vice-diretor Prof. Dr. Jorge Elias Júnior e à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da coordenadora, Profa. Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato.

Aos professores da Pós Graduação em Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pelos valiosos ensinamentos durante minha formação acadêmica e científica e pela oportunidade de conviver com vocês.

Aos professores do Laboratório de Inflamação e Dor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, Prof. Dr. José Carlos Alves Filho e Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha, pela cordialidade e pela cooperação durante a realização desta pesquisa.

Ao professor Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade de São Paulo pelo apoio ao projeto com os animais CreLox para AMPK α 1.

Aos professores da banca e suplentes, por terem aceito o convite e pela atenção dispensada na leitura da dissertação.

Aos pós-graduandos em Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela convivência, trocas de experiências, por todo apoio e amizade.

Às técnicas Mayara Santos Gomes, Juliana Rodrigues, Dimitrius e Nilza Letícia Magalhães, por todo auxílio e ensinamento durante a realização dos experimentos laboratoriais.

Aos meus colegas de laboratório, João Luiz Guilherme Neto, Letícia Fernanda Duffles Rodrigues, Lucas Gabriel Venturini, Paulo Alabarse, Thaise Mayumi Taira, Thais Aparecida Xavier e Vilma Lima por toda ajuda durante a execução laboratorial desse projeto e pela amizade.

A todos os funcionários da Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e aos funcionários da Faculdade de Odontologia e Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela disponibilidade, pela atenção e por toda a ajuda durante este período.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil pelo apoio e suporte financeiro.

À CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil pela bolsa concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro para que esse projeto fosse executado.

RESUMO

Soares, MRP. **Papel da AMPK α 1 sobre a osteoclastogênese e reabsorção óssea na osteoporose experimental.** [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2021.

Os osteoclastos são as únicas células que desempenham a função de reabsorção óssea. Esta função demanda alta carga energética, por isso acredita-se que a proteína AMPK, um sensor energético expresso em osteoclastos, participa da reconfiguração metabólica que ocorre durante os processos de diferenciação e de ativação celular. A ativação de AMPK ocorre quando há um aumento da razão entre AMP/ATP no citoplasma. A AMPK é um complexo proteico heterotrimérico de serina/treonina quinase composta por três subunidades α , β e γ e, de acordo com suas combinações, dão origem a AMPK α 1 e AMPK α 2, sendo que AMPK α 1 tem maior expressão do que AMPK α 2 no tecido ósseo. Portanto, o objetivo desse trabalho é avaliar o mecanismo pelo qual a AMPK α 1 estimula a osteoclastogênese *in vitro* e a sua participação na perda óssea *in vivo*. Para isso, utilizamos animais LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff}, e seus respectivos controles LysM^{cre/0} para avaliar como a AMPK α 1 interfere na osteoclastogênese e na atividade de reabsorção óssea *in vitro*. Foi avaliado ainda o efeito da depleção de AMPK α 1 em osteoclastos (Ctsk^{cre/0}AMPK α 1^{ff}) em animais saudáveis e em modelo experimental de osteoporose. Nossos dados mostraram que a expressão proteica de AMPK α 1 e da sua forma ativa (pAMPK α 1) está aumentada no tempo de 24h e que gradativamente é reduzida nos tempos de 48 e 72h após estímulo com RANKL. A depleção de AMPK α 1 aumenta a expressão gênica de marcadores de diferenciação e fusão de osteoclastos como *Nfatc1*, *Itgb3*, *Dstamp*. Além disso, as células LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff} apresentaram um maior número e tamanho, assim como levou a maior fusão e multinucleação dos osteoclastos. A ausência de AMPK α 1 aumenta ainda a área do anel de actina, o que sugere uma maior adesão à matriz extracelular. Como esperado, AMPK α 1 regula negativamente a reabsorção óssea *in vitro*, pois a expressão de *Ctsk* e *Mmp9*, bem como a taxa de reabsorção óssea está aumentada em osteoclastos LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff}. Nossos dados demonstraram ainda, que AMPK α 1 regula os marcadores de fusão mitocondrial *Mnf1* e *Mnf2*, além de verificar que as células LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff} apresentaram maior área mitocondrial. Em estudo *in vivo*, a análise de fêmures dos animais Ctsk^{cre/0}AMPK α 1^{ff} apresentaram menores parâmetros ósseos, confirmando uma perda óssea associada com o aumento de células TRAP positivas por histologia. Ainda foi observado que nos animais Ctsk^{cre/0}AMPK α 1^{ff} ovariectomizados a perda óssea não foi exacerbada comparados com o grupo controle SHAM. Nossos dados sugerem que a deficiência seletiva de AMPK α 1 levou a uma maior formação e atividade dos osteoclastos, bem como uma maior perda óssea *in vitro* e *in vivo*. Portanto, a AMPK α 1 é um regulador negativo da osteoclastogênese, da fusão celular e da atividade dos osteoclastos. Além disso, AMPK α 1 controla a perda óssea, podendo proteger o aumento de osteoclastos na medula óssea e o desenvolvimento da osteoporose.

Palavras-chave: osteoclastogênese, osteoporose, AMPK α 1, reabsorção óssea.

ABSTRACT

Soares, MRP. **Role of AMPK α 1 on osteoclastogenesis and bone resorption in experimental osteoporosis.** [thesis]. Ribeirão Preto: University of São Paulo. School of Medicine of Ribeirão Preto; 2021.

Osteoclasts are the only cells that perform the function of bone resorption. This function demands a high energy load, so it is believed that AMPK protein, an energy sensor expressed in osteoclasts, participates in the metabolic reconfiguration that occurs during the processes of cell differentiation and activation. Activation of AMPK occurs when there is an increase in the ratio of AMP/ATP in the cytoplasm. AMPK is a heterotrimeric serine/threonine kinase protein complex composed of three subunits α , β and γ and, according to their combinations, give rise to AMPK α 1 and AMPK α 2, with AMPK α 1 having higher expression than AMPK α 2 in bone tissue. Therefore, the aim of this work is to evaluate the mechanism by which AMPK α 1 stimulates osteoclastogenesis *in vitro* and its participation in bone loss *in vivo*. Therefore, we used LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff} animals, and their respective LysM^{cre/0} controls to evaluate how AMPK α 1 interferes with osteoclastogenesis and bone resorption activity *in vitro*. The effect of AMPK α 1 depletion on osteoclasts (Ctsk^{cre/0}AMPK α 1^{ff}) in healthy animals and in an experimental osteoporosis model was also evaluated. Our data showed that protein expression of AMPK α 1 and its active form (pAMPK α 1) reaches its peak in 24 hours, and that it is gradually reduced in the consecutive 48 to 72 hour-period after stimulation with RANKL. Depletion of AMPK α 1 increases gene expression of osteoclast differentiation and fusion markers such as *Nfatc1*, *Itgb3*, *Dcstamp*. In addition, LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff} cells showed a greater number and size, as well as led to greater fusion and multinucleation of osteoclasts. The absence of AMPK α 1 further increased the area of the actin ring, suggesting greater adhesion to the extracellular matrix. As expected, AMPK α 1 negatively regulates bone resorption *in vitro*, as the expression of *Ctsk* and *Mmp9* as well as the rate of bone resorption is increased in LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff} osteoclasts. Our data further demonstrated, that AMPK α 1 regulates mitochondrial fusion markers *Mnf1* and *Mnf2*, as well as finding that LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff} cells showed greater mitochondrial area. As for the *in vivo* study, femurs from Ctsk^{cre/0}AMPK α 1^{ff} animals showed lower bone parameters, confirming a bone loss associated with the increase of TRAP positive cells by histology. It was also observed that in the Ctsk^{cre/0}AMPK α 1^{ff} ovariectomized animals, the bone loss was not exacerbated compared to the SHAM control group. Our data suggest that selective AMPK α 1 deficiency led to increased osteoclast formation and activity as well as greater bone loss *in vitro* and *in vivo*. Therefore, AMPK α 1 is a negative regulator of osteoclastogenesis, cell fusion, and osteoclast activity. In addition, AMPK α 1 controls bone loss by protecting the increase of osteoclasts in the bone marrow and the development of osteoporosis.

Keywords: osteoclastogenesis, osteoporosis, AMPK α 1, bone resorption.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- α :** Alfa
- α -MEM:** Minimum Essential Medium Eagle- Alpha Modification
- AMPK:** Adenosina Monofosfato Quinase
- AMP:** Adenosina Monofosfato
- ANOVA:** análise de variância
- ATP:** Adenosina trifosfato
- Atp6v0d2:** d2 isoform of vacuolar ATPase V0 domain
- β :** Beta
- C:** Celsius
- CaCl₂:** cloreto de cálcio
- cdNA:** ácido desoxirribonucleico complementar (complementar deoxyribonucleic acid)
- c-fms:** macrophage colony stimulating factor receptor
- c-fos:** fosfolipase C
- CSF1R:** colony stimulating factor receptor
- CT:** cycle threshold
- CTR:** calcitonin receptor
- Ctsk:** catepsina K
- DAMPs:** padrões moleculares associados ao dano
- DC-STAMP:** dendritic cell-specific transmembrane protein
- EDTA:** Ethylenediamine Tetracetic Acid
- g:** grama (s)
- °:** Graus
- HE:** hematoxilina e eosina
- IFN- γ :** interferon-gamma
- IkBs:** nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
- IKK α :** inhibitor of κ B kinase alpha
- IL- :** interleucina-
- kDA:** Kilodalton
- LysM:** Lisosima
- M-CSF:** Fator estimulador de colônia de macrófagos
- MC3T3-E1:** Linhagem de células osteoblásticas de camundongos
- MITF:** fator de transcrição associado a microftalmia
- MMPs:** metaloproteinases da matriz
- μ CT:** Microtomografia
- μ m:** micrometro (s)
- μ g:** micrograma (s)
- μ L:** microlitro (s)

mA: Miliampere
mg: miligrama (s)
min: minuto (s)
mL: mililitro (s)
mm²: milímetro(s) quadrado (s)
NFAT: NF of activated T-cell
NF-κB: fator de transcrição nuclear kappa B (nuclear factor kappa B)
NLRs: receptores tipo NOD (Nod-like receptors)
OPG: Osteoprotegerina
OSCAR: osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor
%: por cento
PAMPs: padrões moleculares associados ao patógeno
PBS: tampão fosfato salina
PLCγ1: Fosfolipase Cγ1
Prkaa: animais knockouts para a subunidade α do AMPK
PRRs: receptores de reconhecimento de padrões moleculares
pH: potencial hidrogeniônico
qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa (quantitative polymerase chain reaction)
RANK: receptor ativador de NF-κB
RANKL: ligante do receptor ativador de NF-κB
RelB: Reticuloendotelios Viral Oncogene Homolog B
RIPA: radio immunoprecipitation assay
RNA: ácido ribonucleico (ribonucleic acid)
RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro
rpm: rotações por minuto
s: segundo (s)
TNF-α: Fator-alfa de necrose tumoral (tumor necrosis factor)
TRAF6: fator 6 associado ao receptor de TNF (TNF receptor-associated factor 6)
TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato (tartrate-resistant acid phosphatase)
Treg: T reguladoras
WT: wild-type
V-ATPase: vacuolar-type H⁺ -ATPase
V: Volts

Sumário

1 Introdução	16
1.1 Os osteoclastos e o remodelamento ósseo	16
1.2 AMPK e o tecido ósseo	18
2. Proposição	23
3. Material e métodos	25
3.1 Animais	25
3.2 Genotipagem dos animais por PCR convencional	25
3.3 Cultura de osteoclastos murinos	25
3.4 Determinação do número de osteoclastos pela reação de TRAP	26
3.5 Microtomografia computadorizada	27
3.6 Modelo experimental de osteoporose induzido por ovariectomia	27
3.7 Histologia	27
4 Resultados	29
4.1 Avaliação in vitro da proteína AMPKα1 na osteoclastogênese	29
4.1.1 Expressão gênica e proteica de AMPK α 1 aumenta em estágios iniciais de de diferenciação de osteoclastos.....	29
4.1.2 AMPK α 1 controla a expressão gênica dos marcadores de diferenciação dos osteoclastos in vitro	30
4.1.3 AMPK α 1 regula negativamente o tamanho dos osteoclastos in vitro	31
4.1.4 AMPK α 1 regula a quantidade de núcleos em osteoclastos gigantes e a área do anel de actina in vitro	33
4.1.5 A deleção de AMPK α 1 aumenta a expressão gênica e proteica dos marcadores osteoclastogênicos de reabsorção óssea in vitro.....	34
4.1.6 AMPK α 1 regula negativamente a atividade dos osteoclastos in vitro.....	36
4.1.7 AMPK α 1 controla a expressão gênica de marcadores da fusão mitocondrial <i>in vitro</i>	36
4.1.8 AMPK α 1 regula a área mitocondrial de osteoclastos <i>in vitro</i>	37
4.2 Avaliação da AMPKα1 em osteoclastos in vivo	38
4.2.1 Caracterização do fenótipo ósseo nos animais Ctsk^{Cre/0} e Ctsk^{cre/0} AMPKα1^{ff}	38
4.2.2 AMPK α 1 regula a perda óssea em animais saudáveis	39
4.2.3 AMPK α 1 regula negativamente a osteoclastogênese in vivo	41
4.2.4 A deleção de AMPK α 1 aumenta o número e a área de adipócitos da medula óssea.....	41
4.2.5 AMPK α 1 regula os níveis séricos de marcadores de perda óssea sistêmica.....	42
4.2.6 AMPK α 1 não exacerba a perda óssea patológica por ovariectomia	43
5. Discussão	46
6. Conclusão	53
7. Referências	55

Introdução

1 Introdução

1.1 Os osteoclastos e o remodelamento ósseo

O metabolismo ósseo ou osteometabolismo é uma área de estudo que compreende os processos de formação e de reabsorção óssea. Além de estudar os principais mecanismos pelos quais a massa, a estrutura e a qualidade do esqueleto são acumuladas e mantidas ao longo da vida para regular o equilíbrio do tecido ósseo. No esqueleto maduro, o equilíbrio do tecido ósseo depende da forte regulação da atividade das células formadoras de osso (osteoblastos) e das células que reabsorvem o osso (osteoclastos) por meio de hormônios osteotrópicos circulantes e de citocinas localmente ativas (PEDERSON et al., 2008).

Os osteoblastos são células de origem mesenquimal e responsáveis pela formação óssea, enquanto os osteoclastos são células multinucleadas de origem hematopoiética de linhagem mielóide e são as únicas células responsáveis pela reabsorção óssea. Alterações nesse equilíbrio, no sentido de favorecer a formação dos osteoclastos, podem resultar em um aumento da reabsorção óssea, o qual é observada em algumas doenças osteometabólicas como a osteoporose, a artrite reumatoide, as doenças periodontais (GUERRINI; TAKAYANAGI, 2014). O processo de formação de osteoclastos, denominado de osteoclastogênese, ocorre a partir de monócitos e/ou macrófagos que inicialmente são denominados células precursoras de osteoclastos ou preosteoclastos que, posteriormente, fundem-se e tornam-se células gigantes multinucleadas (GUERRINI; TAKAYANAGI, 2014; RODAN; MARTIN, 2000; TAKAYANAGI et al., 2002).

A osteoclastogênese depende essencialmente de duas citocinas: fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e o ligante de fator nuclear kappa B (RANKL). O M-CSF, também conhecido como CSF-1, atua no receptor c-fms (CSF1R/MCSFR) expresso em monócitos e macrófagos (HATTERSLEY et al., 1991) e regula sua sobrevivência e proliferação. A ativação do c-fms pode regular ainda a expressão de um receptor denominado RANK expresso pelas células monocíticas. Assim, a ativação do RANK pelo ligante RANKL promove o recrutamento da molécula adaptadora TRAF-6 (fator 6 associado ao receptor de TNF), a qual leva à ativação de várias vias de sinalização intracelular, incluindo as vias clássica e alternativa do NF- κ B, c-Fos, fosfolipase C, fator de transcrição associado microftalmia (MITF) e fator nuclear de

células T ativadas c1 (NFATc1), as quais são importantes para os diferentes estágios de diferenciação dos osteoclastos (BERTINI et al., 2001).

Dentre os diversos fatores de transcrição, o NFATc1 é considerado o principal regulador da diferenciação dos osteoclastos. Um estudo demonstrou que animais condicionalmente deficientes de NFATc1 em osteoclastos, desenvolvem osteopetrose (WINSLOW et al., 2006). Além disso, a expressão ectópica de NFATc1 em células monocíticas precursoras de osteoclastos induzem a formação de osteoclastos independentemente de RANKL (TAKAYANAGI et al., 2002). Um eixo secundário da osteoclastogênese, e que atua em cooperação com a via RANK-RANKL, é ativado por sinais coestimulatórios mediados por receptores por tirosina (ITAM) e pela ativação de fosfolipase C γ 1 (PLC γ 1), os quais estão envolvidos nas oscilações de cálcio intracelular [Ca²⁺]_i (MAO et al., 2006). [Ca²⁺]_i é um dos acontecimentos finais da ativação do eixo principal RANK/RANKL, o qual ativa calcineurina e finalmente NFATc1 (KOGA et al., 2004; MUN et al., 2010; TAKAYANAGI et al., 2002). O mecanismo pelo qual NFATc1 atua no processo de osteoclastogênese envolve a transcrição de inúmeros fatores relacionados com a diferenciação e a fusão de osteoclastos dentre eles destacam-se o receptor de calcitonina (CTR), *osteoclast-associated receptor* (OSCAR), *dendritic cell-specific transmembrane protein* (DC-STAMP) e *d2 isoform of vacuolar ATPase V0 domain* (Atp6v0d2), bem como genes relacionados a ativação dos osteoclastos como fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e catepsina K (YAVROPOULOU; YOVOS, 2008).

A fusão celular é um curto período de desenvolvimento celular, no qual monócitos/macrófagos fundem-se formando células multinucleadas, os osteoclastos. Um rearranjo ativo do citoesqueleto ocorre durante cada fusão célula a célula, que envolve a rede de sinalização do citoesqueleto dependente de actina (KODAMA; KAITO, 2020). Para formar osteoclastos multinucleados, os precursores de osteoclastos precisam passar por muitos ciclos de fusão célula-célula e conforme esse ciclo de fusão prossegue, o volume das células se expande e as superestruturas de actina tipo zíper aparecem temporariamente (JANSEN et al., 2012; XING et al., 2012). Esse processo de fusão depende de proteínas como a DC-STAMP que é essencial para a fusão célula-célula e que atua na multinucleação dos osteoclastos. A proteína DC-STAMP é expressa na superfície de osteoclastos e no retículo endoplasmático. Camundongos deficientes de DC-STAMP não apresentam fusão de celular em osteoclastos, porém a expressão dos

principais marcadores de osteoclastos e a estrutura de citoesqueleto serem normais (CHIU; RITCHLIN, 2016).

A reabsorção óssea exige uma série de modificações nos osteoclastos maduros que compreendem um intenso remodelamento citoesquelético, polarização da membrana plasmática, redistribuição de transportadores e organelas e um intenso tráfego endossomal. A reabsorção óssea inicia com a formação do anel de F-actina que circunda a borda enrugada das células formando a zona de selamento (HURST et al., 2004). Nessa área de selagem, formam-se lacunas de reabsorção, onde é secretado ácido e enzimas proteolíticas. Além da actina, a integrina tipo alfa v beta 3 (integrina $\alpha v\beta 3$) é importante para a adesão celular na superfície óssea mineralizada e para a emissão de sinais de alta afinidade nas lacunas de reabsorção. A manutenção do pH ácido, por H^+ ATPase vacuolares, nestas lacunas são importantes para amplificação da atividade das enzimas proteolíticas secretadas de vesículas, como o TRAP, catepsina K e matriz metaloproteinase-9 (MMP 9), permitindo assim a desmineralização e degradação de colágeno (VÄÄNÄNEN; LAITALA-LEINONEN, 2008).

1.2 AMPK e o tecido ósseo

A AMPK é uma proteína expressa em todos os eucariontes como um complexo proteico heterotrimérico de serina/treonina quinase composta por três subunidades: α que é uma subunidade catalítica e as subunidades β e γ que são regulatórias. A massa molecular da subunidade α é de 63 kDa (CARLING et al., 1989), enquanto dois polipeptídios adicionais de 38 e 35 kDa correspondem as subunidades β e γ e, estão presentes em uma razão molar de 1: 1: 1 (DAVIES et al., 1994). Em mamíferos, essa enzima possui sete genes que codificam as seguintes subunidades $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ e $\gamma 3$, que combinadas determinam as diferentes isoformas de AMPK (RICHTER; RUDERMAN, 2009).

A proteína AMPK é o maior regulador do metabolismo energético, que durante o estresse metabólico restaura os níveis energéticos tanto a nível celular quanto fisiológico. A AMPK é ativada por aumento nas concentrações de AMP e/ou ADP, ou pelo aumento da razão de AMP/ATP (RICHTER; RUDERMAN, 2009). Uma vez ativada, a AMPK reduz as despesas metabólicas das células e estimula a produção de energia, induzindo a biogênese mitocondrial e a oxidação de ácidos graxos (TIEDEMANN et al., 2017).

Em doenças metabólicas tais como diabetes e câncer, o estresse, a hipóxia, a privação de glicose ou fármacos utilizados na clínica ativam AMPK (CARLING, 2017). Coughlan e colaboradores (2014), demonstraram que em modelo animal de diabetes tipo 2, a ativação farmacológica de AMPK diminui os níveis de glicose no sangue. Em tecidos tumorais humanos, a ativação da AMPK confere um caráter agressivo e acelera a progressão da doença (ZADRA; BATISTA; LODA, 2015). Em conjunto, o papel da ativação de AMPK parece variar de acordo com o contexto patológico.

No tecido ósseo, as subunidades de AMPK (α , β e γ) são expressas em proporções diferentes. A expressão da subunidade $\alpha 1$ é maior que $\alpha 2$; $\beta 1$ e $\beta 2$ com expressões semelhantes, e dentre as subunidades γ , a $\gamma 1$ é mais expressa que $\gamma 2$ e $\gamma 3$ (AHN et al., 2008; KANG; VIOLLET; WU, 2013; KIM et al., 2016). A ativação de AMPK foi avaliada tanto farmacologicamente (AICAR, agonista de AMPK) ou por indução (baixas concentrações de glicose) nos osteoclastos *in vitro*. Nos dois tipos de ativação de AMPK observou-se uma redução da expressão de NFATc1, SYK, CTSK e TRAP em cultura de osteoclastos (RAW 264-7) (DONG et al., 2018). A adição do composto C, um inibidor de AMPK, em cultura de osteoclastos derivados de macrófagos da medula óssea, ativa múltiplos sinais *downstream* de RANK como NFATc1, NF-kB, AKT e JNK, estimulando a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea. Em conjunto, diversos estudos *in vitro* sugerem que a ativação de AMPK inibe a osteoclastogênese.

Por outro lado, a superexpressão de AMPK $\alpha 1$ ou $\alpha 2$ em linhagem osteoblástica (MC3T3-E1) quando em co-cultura com monócitos de medula óssea de camundongos reduzem a formação de osteoclastos e a expressão de marcadores osteoclastogênicos como NFATc1, TRAP, Catepsina K, receptor de calcitonina e $\beta 3$ -integrina (TONG et al., 2019). A metformina, um agonista de AMPK, estimula a produção de OPG e reduz a produção de RANKL, de maneira dose-dependente, em células MC3T3-E1 e em osteoblastos de calvária de camundongos. Esses estudos sugerem que a superexpressão de AMPK $\alpha 1$ ou $\alpha 2$, ou a ativação de AMPK em osteoblastos por fármacos, de uma forma indireta, também favorecem a inibição da diferenciação de osteoclastos. Em conjunto, fica claro que a literatura não apresenta informações suficientes de como as diferentes subunidades de AMPK nos osteoclastos atuam na osteoclastogênese e na perda óssea patológica.

Considerando que os osteoclastos são maiores que outros tipos celulares, e sua

intensa adaptação estrutural e bioquímica descritas acima, os osteoclastos demanda de altos níveis de ATP para a biossíntese de diferentes constituintes durante a diferenciação e a reabsorção óssea. Para isso, essas células sofrem adaptações metabólicas para realizar sua função (KIM et al., 2007). De fato, vários estudos demonstraram a importância dos processos metabólicos na função e diferenciação dos osteoclastos. Quando adiciona glicose no meio de cultura aumentam a diferenciação dos osteoclastos, enquanto a privação de glicose inibe a capacidade de reabsorção destas células (INDO et al., 2013). Além da glicose, outros substratos bioenergéticos, tais como o piruvato, induzem a diferenciação de osteoclastos. Demonstrando a importância do metabolismo energético para a diferenciação e função deste tipo celular (FONG et al., 2013).

Miyazaki e colaboradores (2012) demonstraram em modelo murino *in vivo* que os osteoclastos não são apenas células ricas em mitocôndrias, como dependem dessas mitocôndrias para exercer de forma competente sua função. De fato, inúmeros estudos demonstraram que AMPK regula a biogênese mitocondrial em vários tipos celulares, visto que AMPK participa do processo de fissão celular e mitofagia. Além disso, as mitocôndrias estão em constante equilíbrio entre fusão ou divisão para adequar a quantidade e a qualidade das mitocôndrias (KIM et al., 2007). Curiosamente, um estudo recente demonstrou que AMPK interage com a proteína de fusão a Mitofusina 2 (MNF2) em mioblastos (HU et al., 2021). No entanto, o papel de AMPK na dinâmica mitocondrial nos osteoclastos não está claro. O questionamento acerca de como é regulado o metabolismo energético durante a ativação e diferenciação de osteoclastos, conduziu a estudos que visaram compreender a AMPK, mitocôndria e osteoclastos.

A osteoporose é uma condição patológica proveniente de alterações osteometabólicas mais comum no mundo que acomete mulheres pós-menopausa e é caracterizada pela perda progressiva do volume ósseo, mudanças na microarquitetura trabecular, maior fragilidade óssea e risco de fraturas. As células do tecido ósseo expressam receptores de estrógeno e, a deficiência de estrógeno induzido pela ovariectomia leva a um quadro osteolítico que mimetiza a osteoporose, visto que em um curto intervalo de tempo há um aumento da reabsorção óssea devido ao aumento do número e função dos osteoclastos (DOBSON et al., 2020).

Os animais knockouts para AMPK α 1 (*Prkaa1^{-/-}*) submetidos a ovariectomia apresentaram menor perda óssea comparado com os animais selvagens (JEYABALAN et al., 2012). Por outro lado, em animais knockouts para a subunidade α 2 do AMPK (*Prkaa2^{-/-}*) não foi observada mudança na estrutura óssea, sugerindo que a subunidade α 2 apresenta papel menos relevante no processo de remodelamento óssea *in vivo*. O tratamento de ratas ovariectomizadas com metformina previne a perda óssea por induzir o aumento da expressão de OPG e diminuir RANKL em osteoblastos. Portanto, não está clara se a menor perda óssea em animais knockouts para AMPK α 1 ovariectomizadas ou pela ativação de fármacos, seja proveniente de osteoclastos, osteoblastos ou outros tipos celulares.

Nesse contexto, considerando a importância do processo de ativação de AMPK em relação ao processo de diferenciação de osteoclastos, torna-se importante aprofundar no conhecimento do papel dos diferentes subtipos de AMPK no processo de perda óssea patológica. Os trabalhos apresentados na literatura são baseados em estudos *in vitro*, nos quais utilizaram fármacos ativadores ou inibidores não-seletivos para as subunidades de AMPK ou ainda, estudaram animais com a deleção total de AMPK α 1 ou AMPK α 2. Sendo assim, o estudo da perda óssea patológica utilizando moduladores gerais ou animais com deleção total de AMPK não nos permite concluir se a perda óssea observada é decorrente da deficiência de ativação de AMPK em osteoclastos, osteoblastos ou ainda, em outro tipo celular. Torna-se importante esclarecer qual subunidade desta proteína está direta ou indiretamente ligada ao processo de osteoclastogênese e da reabsorção óssea, por meio da deleção seletiva desta proteína.

Proposição

2. Proposição

O objetivo do presente estudo foi avaliar o papel da AMPK α 1 na osteoclastogênese e na perda óssea induzida pelo modelo experimental de osteoporose em camundongos deficientes para AMPK α 1 em osteoclastos.

Material e Métodos

3. Material e métodos

3.1 Animais

Neste estudo foram utilizados camundongos C57BL6, $LysM^{cre/0}$, $LysM^{cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$, $Ctsk^{cre/0}$, $Ctsk^{cre/0}AMPK1^{ff}$. Foram utilizados animais com 8-10 semanas de vida e machos $LysM^{cre/0}$, $LysM^{cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$ e fêmeas de 12 a 16 semanas $Ctsk^{cre/0}$ e $Ctsk^{cre/0}AMPK1^{ff}$. Os animais foram mantidos no biotério da Farmácia durante o experimento, ciclo de 12 horas claro/escuro, temperatura e umidade controladas. A água e a ração serão administradas *ad libitum*.

3.2 Genotipagem dos animais por PCR convencional

Foi feita a extração do DNA utilizando as amostras animais as quais foram adicionados 75 μ l de tampão (NaOH 25 mM e EDTA 0,2 mM) em cada amostra, foram então levadas ao termociclador a 98°C por 1 hora. Em seguida, o DNA extraído foi quantificado no aparelho nanofotômetro (NanoPhotometer® P360, Implén, Inc., Califórnia, USA), onde posteriormente foi utilizados 20 ng total de DNA para a reação de PCR. Para esta reação foi utilizados os primers específicos para análise de Lisozima Cre, Catepsina K Cre e $AMPK\alpha1$ flox, juntamente com o Amplitaq Gold 360 Master MIX. As amostras foi aplicadas em gel 1,5% de agarose em cuba de eletroforese de 100V por 50 minutos, além do padrão molecular e o controle positivo e negativo.

3.3 Cultura de osteoclastos murinos

A diferenciação de osteoclastos murinos foi realizada a partir de cultura primária utilizando células da medula óssea. Para isso, fêmur e tíbia de camundongos $LysM^{cre/0}$ e $LysM^{cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$ foram assepticamente removidos e as medulas ósseas extraídas e mantidas por 3 dias em meio de cultura α -MEM (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementada com 10% soro fetal bovino, 100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (ThermoScientific, Carlsbad, CA, USA) na presença de 30 ng/mL de M-CSF (R&D Systems). As células não aderidas foram removidas e eliminadas, e as células aderidas (pré-osteoclastos) foram cultivadas em meio osteoclastogênico com 30 ng/mL de M-CSF e 10 ng/mL de RANKL (R&D Systems) por diferentes tempos, de acordo com o protocolo de estudo. Foram utilizadas as seguintes metodologias para avaliar a diferenciação dos osteoclastos:

- Para o ensaio de TRAP, 20.000 pré-osteoclastos foram plaqueados em placa de 96 poços e cultivadas na presença de M-CSF e de RANKL por 4 dias. Em

seguida foi realizado o ensaio histoquímico de coloração de células multinucleadas sensíveis ao TRAP.

- Para o ensaio de reabsorção óssea por osteassay, 15.000 pré-osteoclastos foram plaqueados em placa de 96 poços contendo hidroxiapatita e cultivadas na presença de M-CSF e de RANKL por 10 dias. Em seguida foi interrompida a reação, retiradas as células e analisada a percentagem de área de reabsorvida em relação ao total da área do poço.
- Para o ensaio de imunofluorescência, 20.000 pré-osteoclastos foram plaqueados em placa de 96 poços e cultivadas em meio osteoclastogênico por 3 dias. Em seguida foi realizado a marcação dos núcleos com DAPI e do anel de actina por Faloidina. A contagem dos osteoclastos por núcleo foi realizada utilizando uma máscara, que detectava a região delimitada por faloidina e a quantidade de marcações de núcleos por DAPI.
- Para o ensaio de qPCR, 200.000 pré-osteoclastos foram plaqueados em placa de 24 poços no meio osteoclastogênico. Foram coletadas amostras nos tempo 0h, 24h, 48h e 72h. Foram avaliados a expressão dos genes *Praak1* (AMPK α 1), *Itgb3* (β 3-integrina), *ctsk* (Catepsina K) e *Mmp9* (Metaloproteinase 9), *Mnfl* (Mitofusina1), *Mnf2* (Mitofusina2) e *Drp1* (Proteína relacionada a dinâmica 1).
- Para o ensaio de Western Blot, 200.000 pré-osteoclastos foram plaqueados em placa de 24 poços no meio osteoclastogênico por 3 dias. Foram avaliados a expressão proteica de AMPK, NFATc1, DC-STAMP e Catepsina K.
- Para o ensaio de Microscopia eletrônica de transmissão, 1.000.000 pré-osteoclastos foram plaqueados em placa de 6 poços em meio osteoclastogênico por 2 dias. As células foram fixadas por 2 horas em glutaraldeído (2% em tampão fosfato) e incluídas em Embed. Foi feita a preparação dos ultrafinos e a visualização via microscópio eletrônica de transmissão (Jeol JEM-100 CXII equipado com câmara digital Hamamatsu ORCA-HR). As imagens fotografadas foram no aumento de 40000x.

3.4 Determinação do número de osteoclastos pela reação de TRAP

A detecção de osteoclastos foi realizada pela reação de fosfatases ácidas

resistentes ao tartarato - TRAP (KIT SIGMA 387-A). As células foram primeiramente fixadas com tampão de citrato por 20 minutos, lavadas com PBS e incubadas a 37° C na solução corante contendo tartaratos por 40 minutos, ao abrigo da luz, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, os osteoclastos (células coradas e contendo 3 ou mais núcleos) foram fotografados e quantificados quanto ao número e tamanho das células utilizando o programa de imagens (ImageJ software).

3.5 Microtomografia computadorizada

As amostras dos fêmures esquerdos de animais $Ctsk^{cre/0}$ e $Ctsk^{cre/0}AMPK1^{ff}$ foram dissecadas, limpas, fixadas em formaldeído a 10% para padronização do posicionamento da mesma durante a realização da MicroCT. As mensurações dos padrões ósseos se darão utilizando os programas de imagens Data Viewer e CTAn (Bruker microCT).

As imagens dos fêmures, obtidas pela MicroCT, foram ajustadas para medição do tecido mineralizado que circunda a parte cortical. Para que seja medido apenas o osso, com exclusão da parte cortical, apenas a região de interesse será isolada utilizando-se a opção de contorno.

3.6 Modelo experimental de osteoporose induzido por ovariectomia

Os animais $Ctsk^{cre/0}$ e $Ctsk^{cre/0}AMPK1^{ff}$, primeiramente, foram anestesiados e posteriormente, foi realizada a incisão em cada flanco (direito e esquerdo). Após a identificação dos ovários foi feita a ligadura de seus pedúnculos e em seguida a ressecção dos tecidos ovarianos (19). A parede abdominal foi fechada em dois planos utilizando sutura contínua de fio de seda 4.0. Como controle, fêmeas igualmente manipuladas foram utilizadas, sem, entretanto, haver a ressecção do tecido ovariano (grupo Sham/OVX). Após um período de 30 dias, os animais foram eutanasiados e as amostras coletadas. Após eutanásia, foram coletados: sangue e fêmur.

3.7 Histologia

As amostras de tecido ósseo das tíbias e fêmures foram fixadas em formalina tamponada com fosfato (pH 7.4) por 2 dias, descalcificadas em 14% ácido fórmico por 45 dias, e embedadas em cera de parafina. As seções transversais das cápsulas articulares foram coradas com TRAP e contra-coradas com Hematoxilina.

Resultados

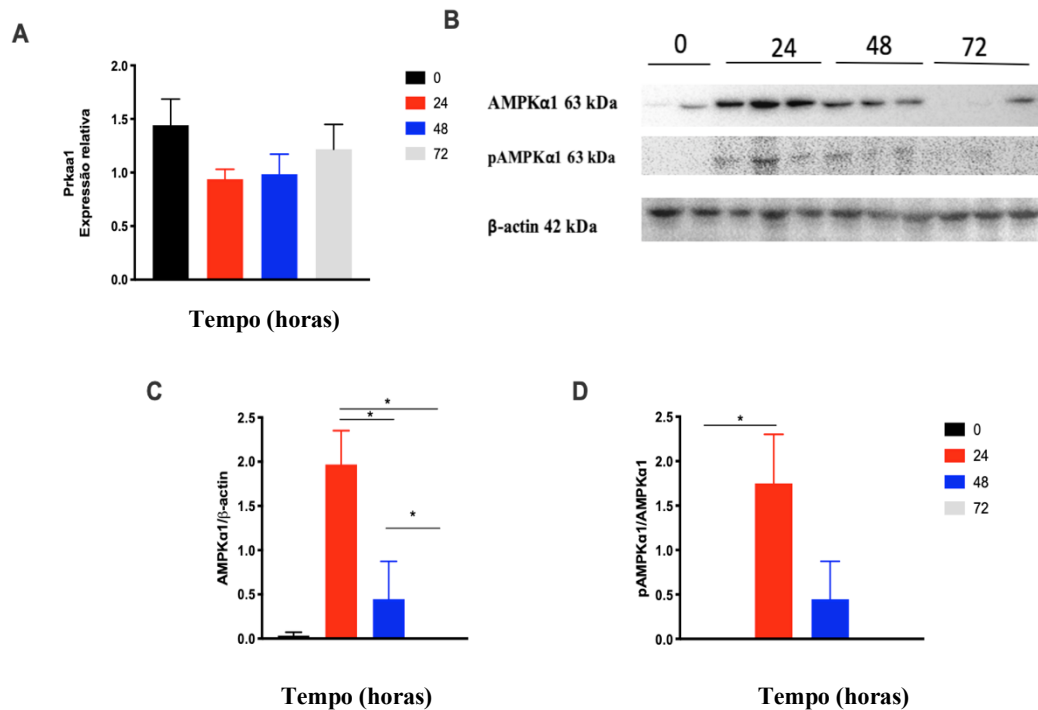
4 Resultados

4.1 Avaliação *in vitro* da proteína AMPK α 1 na osteoclastogênese

4.1.1 Expressão gênica e proteica de AMPK α 1 aumenta em estágios iniciais de diferenciação de osteoclastos

AMPK α 1 é a subunidade α com maior expressão no tecido ósseo e também é expressa nos osteoclastos (KANG; VIOLLET; WU, 2013). Sabendo disso, o primeiro passo desse estudo foi avaliar, durante a diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos, quando é que ocorre a expressão de AMPK α 1. Os pré-osteoclastos de animais WT foram cultivados em meio osteoclastogênico contendo M-CSF e RANKL. A expressão de AMPK α 1 foi avaliada nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas de cultura. Como pode ser observado na Figura 1A, não houve diferença na expressão gênica de AMPK α 1 (*Praak1*) em pré-osteoclastos estimulados com RANKL, ou seja, a expressão gênica de AMPK α 1 não se altera com a diferenciação dos osteoclastos. Entretanto, observa-se que o estímulo com RANKL leva a um aumento da expressão proteica de AMPK α 1 no tempo de 24 horas (Figura 1B) que foi reduzindo nos tempos de 48h e 72h. Da mesma forma, observamos que a forma ativa (pAMPK α 1) está aumentada no tempo de 24h e que gradativamente é reduzida nos tempos de 48 e 72h após estímulo com RANKL. Esses dados mostram que a expressão da proteína AMPK α 1, bem como sua forma ativa, estão elevados nos tempos iniciais de diferenciação osteoclastogênica e, conforme as células se diferenciam em osteoclastos maduros, ocorre a redução da expressão e fosforilação desta proteína.

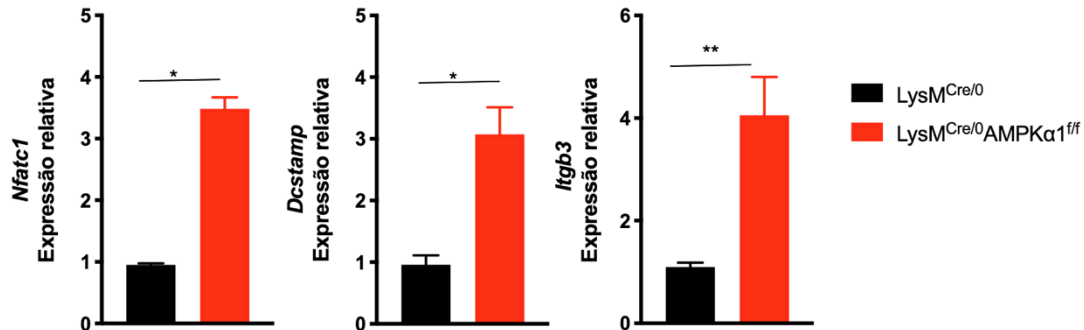
Figura 1. Expressão de AMPK α 1 aumenta em estágios iniciais de diferenciaao de osteoclastos. A expressão de AMPK α 1 foi avaliada em cultura de pr-osteoclastos cultivados em meio osteoclastogênico por diferentes tempos. As células foram submetidas a avaliação (A) da expressão gênica de AMPK α 1 (B) da expressão proteica de AMPK α 1 e pAMPK α 1. (C) Quantificação da expressão proteica AMPK α 1 em relação  expressão de β -actina. (D) Quantificação expressão de AMPK α 1 em relação a sua forma ativada pAMPK α . A barra indica média \pm erro padrão da média (n=3), de uma representação de 2 experimentos independentes. *p < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa, avaliado por One Way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni.



4.1.2 AMPK α 1 controla a expressão gênica dos marcadores de diferenciação dos osteoclastos in vitro

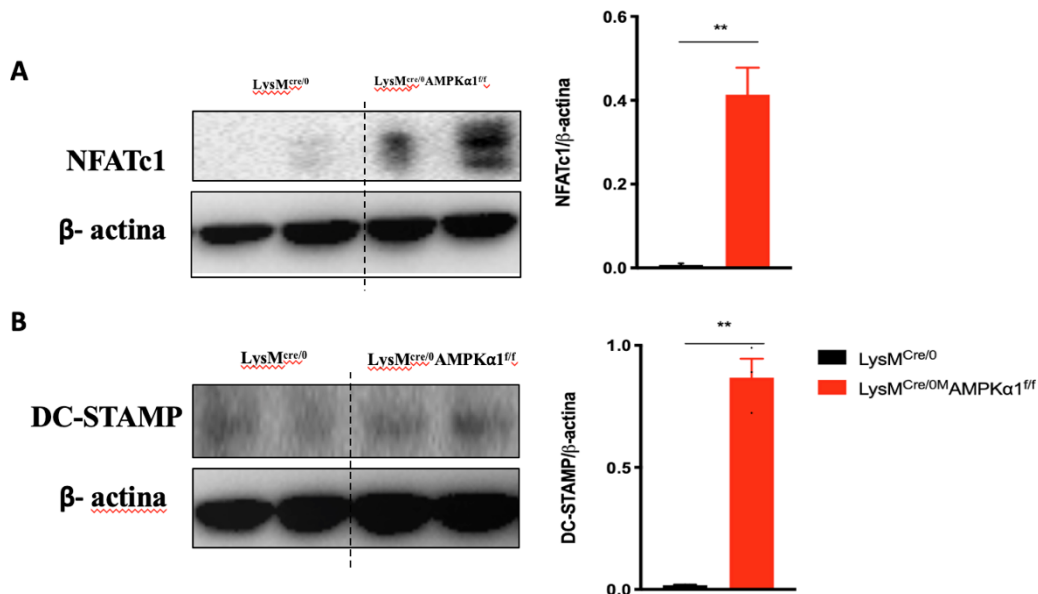
O NFATc1 é o principal fator de transcrição gênica na osteoclastogênese e uma vez ativado induz a transcrição e produção de proteínas importantes para a fusão celular como a DC-STAMP e a β ₃-integrina (BERTINI et al., 2001; XING et al., 2012). Com isso, o próximo passo foi analisar o efeito de AMPK α 1 nos principais marcadores de transcrição e de fusão de osteoclastos após 48h de diferenciação. Considerando ainda que a proteína AMPK α 1 apresenta uma maior expressão nas primeiras 24h de estímulo com RANKL, foi utilizado animais knockouts condicionais para AMPK α 1 em monócitos *LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff}* para inibir a expressão de AMPK α 1 durante todos os estágios de diferenciação de osteoclastos. Os dados desse experimento demonstraram que os osteoclastos do grupo *LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff}* apresentaram maior expressão gênica de *Nfatc1*, *Dcstamp* e *Itgb3* quando comparado ao grupo *LysM^{cre/0}* (Figura 2A-B). Portanto, a deleção de AMPK α 1 aumenta a expressão gênica dos marcadores de diferenciação e fusão de osteoclastos.

Figura 2. AMPK α 1 controla a expressão gênica de marcadores de diferenciação dos osteoclastos in vitro. Avaliação da expressão gênica de *Nfatc1*, *Dcstamp* e *Itgb3* após 48 horas de cultivo dos osteoclastos do grupo *LysM^{cre/0}* e *LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff}*. A barra indica média \pm desvio padrão da média (n=5), de uma representação de 2 experimentos independentes. *p < 0,01 indica diferença estatisticamente significativa, avaliados por teste t de Student.



Verificamos ainda que os osteoclastos *LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff}* apresentaram maior expressão proteica de NFATc1 e DC-STAMP em relação ao grupo *LysM^{cre/0}* (Figura 3A-B). Esses dados corroboram os resultados de análise de expressão gênica e AMPK α 1 possivelmente regula os marcadores de diferenciação e fusão de osteoclastos.

Figura 3. AMPK α 1 controla a expressão proteica de marcadores de diferenciação dos osteoclastos in vitro. Avaliação da expressão NFATc1 e DC-STAMP por western blot, após 48 horas de cultivo dos osteoclastos do grupo *LysM^{cre/0}* e *LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff}*. A barra indica média \pm desvio padrão da média (n=5), de uma representação de 2 experimentos independentes. **p < 0,01 indica diferença estatisticamente significativa, avaliados por teste t de Student.

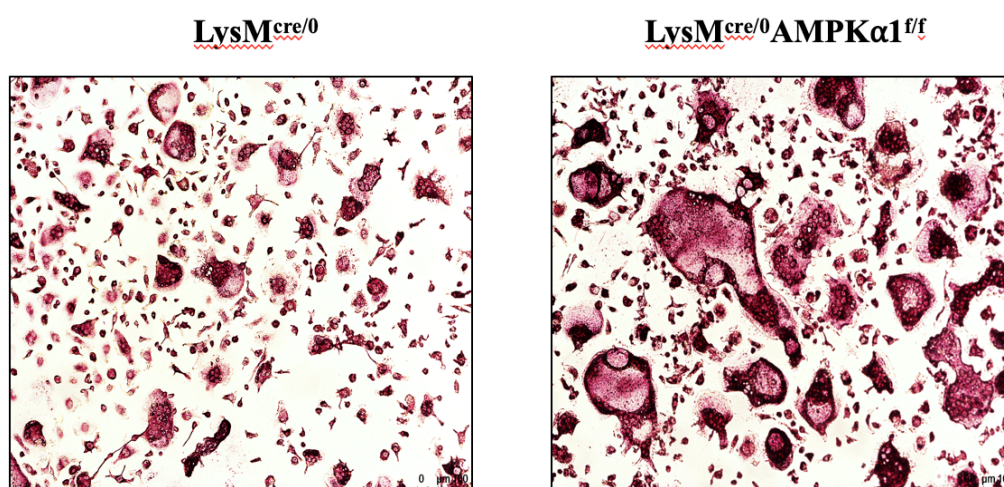


4.1.3 AMPK α 1 regula negativamente o tamanho dos osteoclastos in vitro

De acordo com os dados anteriores, a inibição de AMPK α 1 em monócitos aumenta os principais marcadores de diferenciação dos osteoclastos. O próximo passo

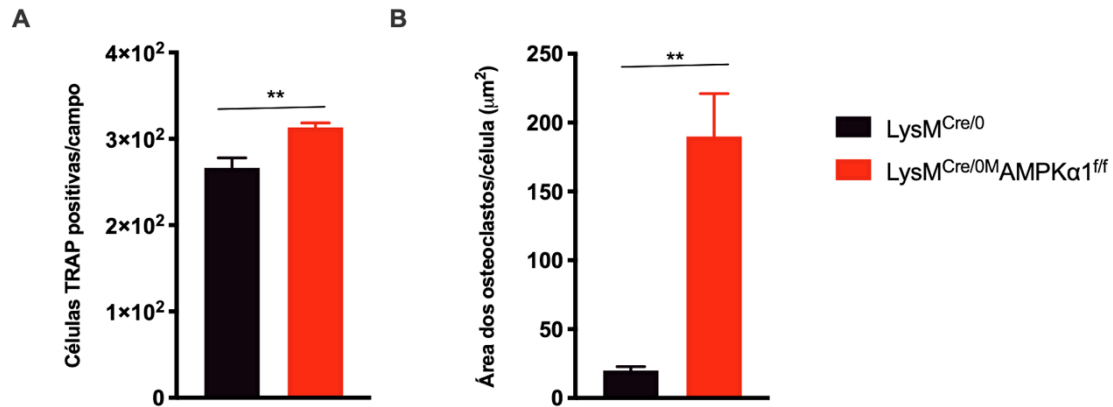
foi analisar o efeito da inibição de AMPK α 1 após 72 horas de diferenciação. Para isso foram avaliados osteoclastos diferenciados que foram corados com TRAP. Os resultados deste estudo mostraram que osteoclastos do grupo LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff} são maiores e mais numerosos quando comparados com o grupo controle (Figura 4). Conclui-se que a deleção de AMPK α 1 estimula a diferenciação de osteoclastos in vitro.

Figura 4. A deleção de AMPK α 1 aumenta o número de osteoclastos in vitro. Fotos representativas dos osteoclastos do grupo LysM^{cre/0} e LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff} após 72 horas de diferenciação corados com TRAP. Imagens fotografadas no aumento de 10x.



Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas derivadas da fusão de macrófagos (JANSEN et al., 2012; XING et al., 2012). A quantificação do número e a área de osteoclastos é realizada a partir das células TRAP positivas com 3 ou mais núcleos. Como observado nesse experimento, o número e o tamanho dos osteoclastos (área) foram maiores no grupo LysMcre/0AMPK α 1f/f quando comparado ao grupo controle LysMcre/0 (Figura 5A-B). Portanto, esses resultados sugerem que a AMPK α 1 regula o tamanho dos osteoclastos in vitro.

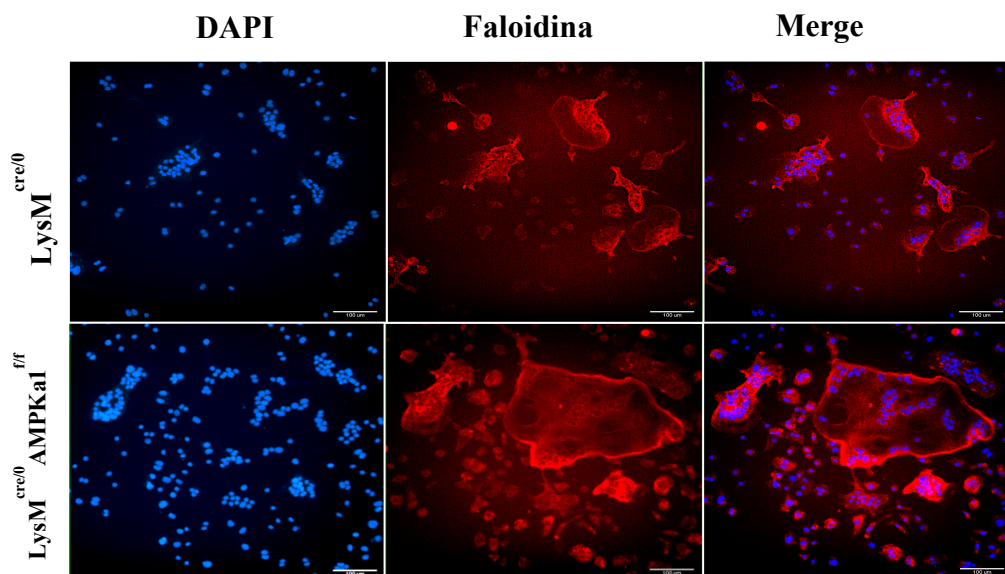
Figura 5. AMPK α 1 regula negativamente o tamanho dos osteoclastos in vitro. Avaliação do (A) número de osteoclastos (contendo mais de três núcleos) por campo e (B) da área dos osteoclastos por célula do grupo LysM^{cre/0} e LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff}. A barra indica média \pm erro padrão da média (n=5), de uma representação de 3 experimentos independentes. **p < 0,01 indicam diferença estatisticamente significante, avaliados por teste t de Student.



4.1.4 AMPKα1 regula a quantidade de núcleos em osteoclastos gigantes e a área do anel de actina in vitro

O anel de actina é formado por filamentos de f-actina e está localizado na periferia celular delimitando o tamanho dos osteoclastos (HURST et al., 2004). Para determinar o efeito da ausência de AMPKα1 sobre os filamentos de actina, foi realizado um ensaio de imunofluorescência após 48h de diferenciação. Os núcleos dos osteoclastos foram marcados com DAPI (azul) e o anel de actina com faloidina (vermelho). Nesse experimento, observamos que a ausência de AMPKα1 antecipa a fusão dos osteoclastos e aumenta a espessura do anel de actina (Figura 6).

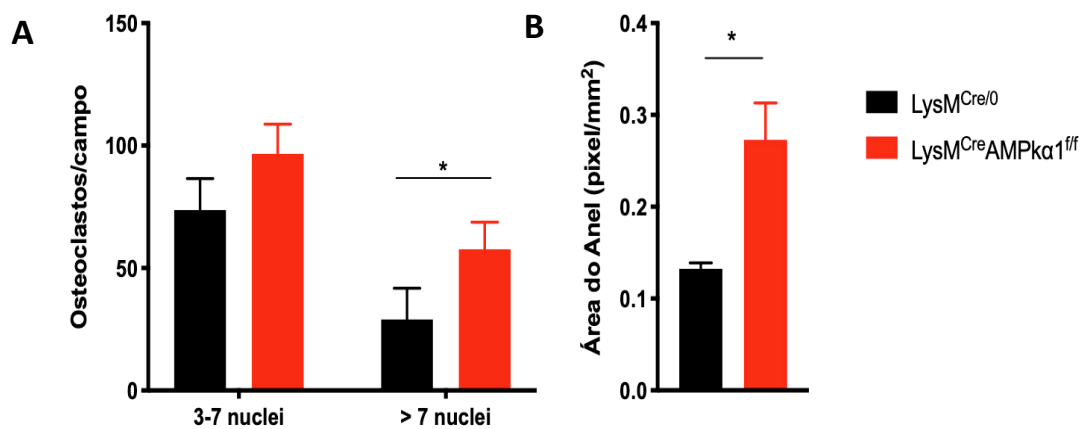
Figura 6. A deleção de AMPKα1 aumenta o tamanho e a espessura do anel de actina. Fotos representativas de osteoclastos in vitro. Marcação dos núcleos de osteoclastos do grupo LysM^{cre/0} e LysM^{cre/0}AMPKα1^{ff} com DAPI (azul) e do anel de actina com faloidina (vermelho) após 48 horas de diferenciação. Imagens fotografadas no aumento de 40x.



Como foi demonstrado anteriormente, a ausência de AMPK α 1 aumenta a expressão dos marcadores de fusão de osteoclastos como o DC-STAMP e da β ₃-integrina. As células fusionadas incorporam uma grande quantidade de núcleos no interior e aumentam de tamanho, consideravelmente. O próximo passo foi verificar se AMPK α 1 interfere na quantidade de núcleos por osteoclastos. Como observamos na Figura 7A, houve uma maior quantidade de osteoclastos no grupo *LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff}* com 3 a 7 núcleos quando comparado ao controle, contudo esse aumento não foi estatisticamente diferente. Quando analisamos a quantidade de osteoclastos do grupo *LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff}* com mais de 7 núcleos, esse foi significativamente maior em relação ao grupo *LysM^{cre/0}*. Portanto, esses dados demonstram que AMPK α 1 possivelmente controla o processo de fusão celular e a incorporação de núcleos dos osteoclastos.

Considerando que o anel de actina é importante para a reorganização do citoesqueleto e para a adesão na matriz extracelular do osso, foi quantificado a área do anel de actina dos osteoclastos do grupo *LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff}* e controle. Como esperado, a ausência de AMPK α 1 nos osteoclastos permitiu uma maior espessura do anel de actina quando comparado com o controle (Figura 7B). Esses dados sugerem que a ausência de AMPK α 1 leva a uma maior adesão na matriz extracelular do osso.

Figura 7. AMPK α 1 regula a quantidade de núcleos em osteoclastos gigantes e a área do anel de actina in vitro. (A) Avaliação do número de osteoclastos por quantidade de núcleos. A barra indica média \pm erro padrão da média, de uma representação de 2 experimentos independentes. (B) da intensidade de fluorescência do anel de actina marcado por faloidina de osteoclastos do grupo *LysM^{cre/0}* e *LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff}* após 72 horas de cultivo. A barra indica média \pm erro padrão da média (n=3), de uma representação de 2 experimentos independentes. *P<0,05 indicam diferença estatisticamente significativa, avaliados por teste t de Student.



4.1.5 A deleção de AMPK α 1 aumenta a expressão gênica e proteica dos marcadores osteoclastogênicos de reabsorção óssea in vitro

Uma vez fusionados e aderidos, os osteoclastos estão maduros aptos a reabsorver o osso. Os osteoclastos maduros liberam ácidos e enzimas para degradar a matriz óssea. A Catepsina K (*Ctsk*) é uma cisteína semelhante a papaína altamente expressa em osteoclastos e muito importante para o processo de reabsorção óssea. Essa cisteína juntamente com outras enzimas como a metaloproteinase 9 (MMP-9) degradam componentes orgânicos da matriz extracelular como o colágeno do tipo I. (TAKAYANAGI et al., 2002; XING et al., 2012). O próximo passo foi avaliar se a inibição de AMPK α 1 interfere nos marcadores de reabsorção óssea *in vitro*. Para isso, foi realizada a expressão gênica de *Ctsk* e de *Mmp9* após 72h de diferenciação. Como pode ser observado, os osteoclastos do grupo $LysM^{cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$ apresentaram significativamente maior expressão gênica de *Mmp9* e *CtsK* quando comparado ao grupo $LysM^{cre/0}$ (Figura 8A-B). Foi analisado ainda a expressão proteica de *Ctsk*, que confirma um aumento da expressão dessa cisteína nos osteoclastos do grupo $LysM^{cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$ comparados com o grupo controle (Figura 9). Portanto, esses dados sugerem que AMPK α 1 têm papel importante na atividade osteoclástica.

Figura 8. A deleção de AMPK α 1 aumenta a expressão gênica de marcadores da reabsorção óssea *in vitro*. Avaliação da expressão gênica de Catepsina K (*Ctsk*) e de metaloproteinase 9 (*Mmp9*) após 72 horas de cultivo dos osteoclastos do grupo $LysM^{cre/0}$ e $LysM^{cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$. A barra indica média \pm desvio padrão da média (n=5), de uma representação de 2 experimentos independentes. *P < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa, avaliados por teste t de Student.

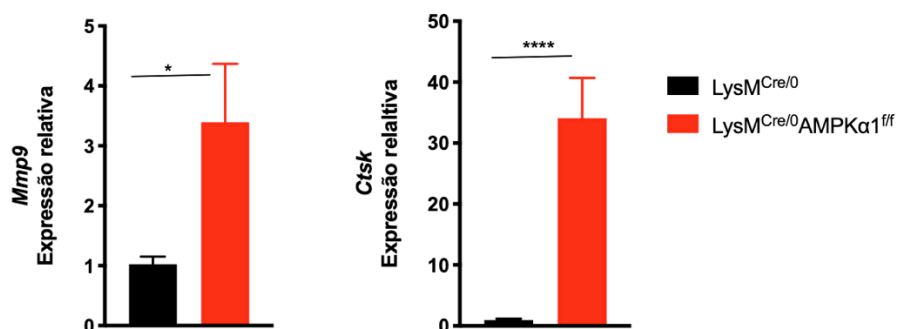
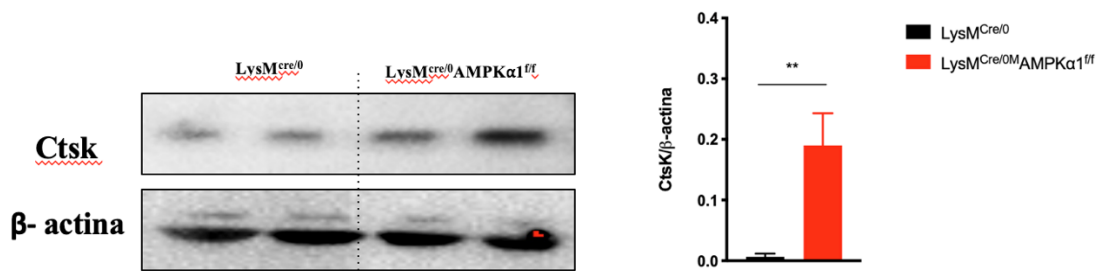


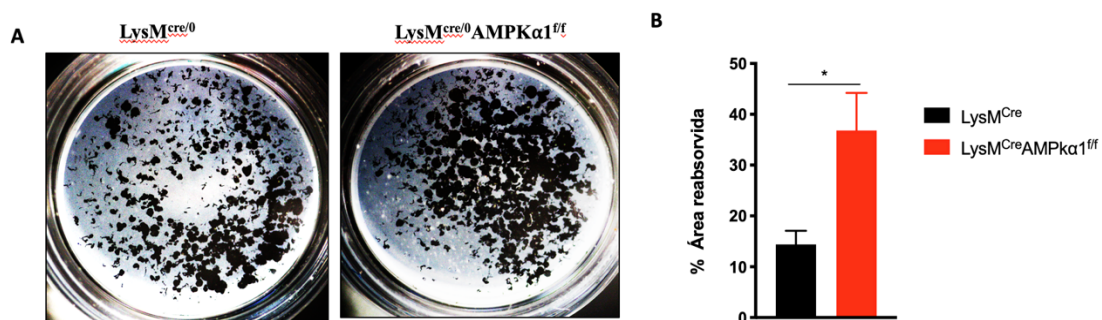
Figura 9. A deleção de AMP α 1 aumenta a expressão proteica de marcador de reabsorção óssea *in vitro*. Avaliação da expressão proteica de *CtsK* após 72 horas de cultivo dos osteoclastos do grupo $LysM^{cre/0}$ e $LysM^{cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$. A barra indica média \pm desvio padrão da média (n=2), de uma representação de 2 experimentos independentes. *P < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa, avaliados por teste t de Student.



4.1.6 AMPKα1 regula negativamente a atividade dos osteoclastos *in vitro*

Confirmando os dados obtidos no experimento anterior, o próximo passo foi determinar se a AMPKα1 realmente interfere na atividade dos osteoclastos *in vitro* utilizando um ensaio de reabsorção em placa de hidroxiapatita. As células dos grupos LysM^{Cre/0} e LysM^{Cre/0}AMPKα1^{ff} foram mantidas na placa contendo hidroxiapatita por 5 dias, tempo suficiente para avaliar a atividade de reabsorção *in vitro*. A região preta representa a área consumida pela reabsorção dos osteoclastos. A taxa de reabsorção foi determinada pela porcentagem de área da região em preto em relação a área total (100%). Os dados desse experimento demonstraram que os osteoclastos do grupo LysM^{Cre/0}AMPKα1^{ff} reabsorveu uma área maior de hidroxiapatita comparado ao grupo LysM^{Cre/0} (Figura 10A). Quando quantifica-se a taxa de reabsorção óssea observa-se que houve uma maior porcentagem nos osteoclastos do grupo LysM^{Cre/0}AMPKα1^{ff} comparado ao grupo LysM^{Cre/0} (Figura 10B). Assim, esses dados confirmam que a AMPKα1 regula negativamente a reabsorção óssea *in vitro*.

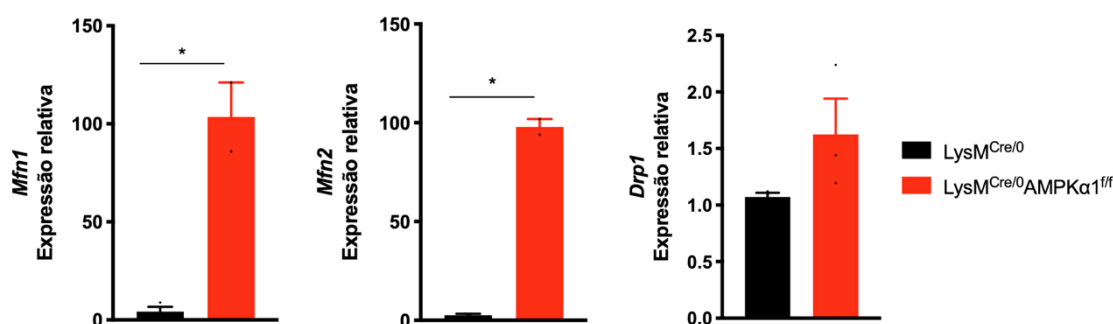
Figura 10. AMPKα1 regula negativamente a atividade dos osteoclastos *in vitro*. (A) Fotos representativas da placa de reabsorção óssea de osteoclastos cultivados na placa contendo hidroxiapatita por 5 dias provenientes de animais LysM^{Cre/0} e LysM^{Cre/0}AMPKα1^{ff}. Imagens fotografadas no aumento de 10x. (B) Quantificação da taxa de reabsorção óssea. A barra indica média ± desvio padrão da média (n=3), de uma representação de 2 experimentos independentes. *p < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa, avaliados por teste t de Student.



4.1.7 AMPKα1 controla a expressão gênica de marcadores da fusão mitocondrial *in vitro*.

A diferenciação celular e a atividade de reabsorção dos osteoclastos demanda grandes quantidades energéticas. AMPK α 1 é conhecido como um dos principais sensores energéticos celulares. Além disso, AMPK α 1 regula a biogênese mitocondrial em vários tipos celulares, induzindo a fusão ou a fissão mitocondrial, permitindo que a célula tenha maior/menor demanda energética (DETMER; CHAN, 2007a; RICHTER; RUDERMAN, 2009). De acordo com os dados anteriores, a ausência de AMPK α 1 aumenta a osteoclastogênese e a reabsorção óssea *in vitro*. Logo, o próximo passo foi avaliar se AMPK α 1 regula a expressão gênica dos marcadores de fusão e fissão mitocondrial. Interessantemente, a expressão gênica de marcadores de fusão mitocondrial, mitofusina 1 e 2 (*Mfn1* e *Mfn2*) está aumentada nos osteoclastos do grupo *LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff}* comparado com o grupo *LysM^{cre/0}*. Já a expressão gênica do marcador de fissão mitocondrial, proteína relativa a dinâmica 1 (*Drp1*), não houve aumento significativo nos osteoclastos grupo *LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff}* comparado com o grupo *LysM^{cre/0}*. Portanto, sugere-se que AMPK α 1 controla os marcadores de fusão mitocondrial.

Figura 11. AMPK α 1 controla a expressão gênica de marcadores da fusão mitocondrial *in vitro*. Avaliação da expressão gênica de mitofusina 1 (*Mfn1*), mitofusina 2 e de (DRP1) após 48 horas de cultivo dos osteoclastos do grupo *LysM^{cre/0}* e *LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff}*. A barra indica média \pm desvio padrão da média (n=3), de uma representação de 1 experimentos independentes. *P < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa, avaliados por teste t de Student.

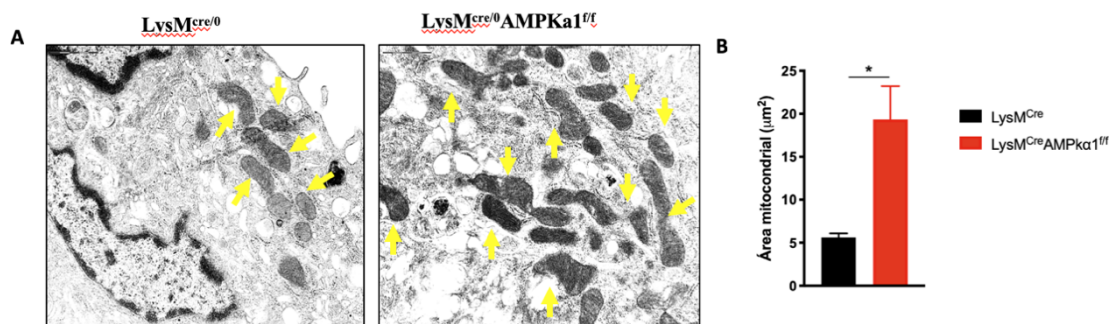


4.1.8 AMPK α 1 regula a área mitocondrial de osteoclastos *in vitro*

Para avaliar se AMPK α 1 interfere na biogênese mitocondrial dos osteoclastos, foram avaliadas as características morfológicas mitocondriais em osteoclastos dos grupos *LysM^{cre/0}* e *LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff}* após 72 horas de diferenciação por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Observa-se que as mitocôndrias dos osteoclastos do grupo *LysM^{cre/0}AMPK α 1^{ff}* são maiores comparados com o grupo controle *LysM^{cre/0}* (Figura 11A). Além disso, a quantificação do área mitocondrial do grupo

$LysM^{cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$ também é maior comparado ao grupo controle $LysM^{cre/0}$ (Figura 11B).

Figura 12. AMPK α 1 regula a área mitocondrial de osteoclastos *in vitro*. (A) Fotos representativas das mitocôndrias nos osteoclastos do grupo $LysM^{cre/0}$ e $LysM^{cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$ por microscopia eletrônica de transmissão. As setas em amarelo indicam as mitocôndrias. Imagens fotografadas no aumento de 40000x. (B) Avaliação da área das mitocôndrias em osteoclastos. A barra indica média \pm desvio padrão da média (n=3), de uma representação de 1 experimento independente. *P<0,05 indica diferença estatisticamente significativa, avaliados por teste t de Student.

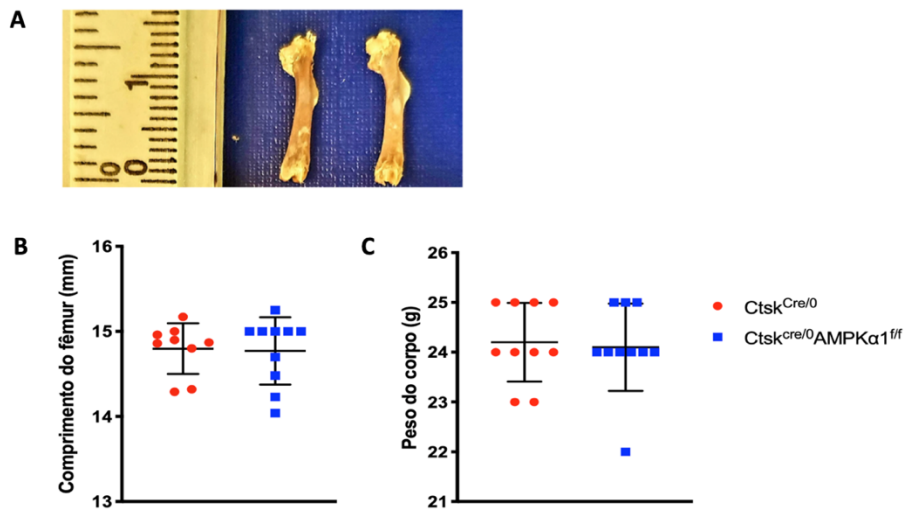


4.2 Avaliação da AMPK α 1 em osteoclastos *in vivo*

4.2.1 Caracterização do fenótipo ósseo nos animais $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$

Considerando que a deleção de AMPK α 1 em monócitos estimulou a diferenciação de osteoclastos bem como a sua atividade reabsortiva em relação ao grupo controle, avaliamos se esse efeito poderia ser extrapolado *in vivo*. Para isso, foi realizado a caracterização dos animais knockouts condicionais para osteoclastos $Ctsk^{cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$ e do seu controle $Ctsk^{Cre/0}$. No estudo realizamos uma avaliação comparativa no peso e comprimento do fêmures desses animais. Nos grupos de animais $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$ não houve diferença no peso dos animais e no comprimento do fêmures (Figura 13A-C).

Figura 13. Caracterização do fenótipo ósseo nos animais $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$. (A) Foto representativa dos fêmures. (B) Avaliação do peso dos animais e (C) do comprimento do fêmures de animais do grupo $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$ com 12 semanas de vida.



4.2.2 AMPK α 1 regula a perda óssea em animais saudáveis

Considerando que o AMPK α 1 regula negativamente a perda óssea in vitro, nosso próximo passo foi avaliar se a deficiência seletiva de AMPK α 1 em osteoclastos interfere na microestrutura óssea. Fotos representativas da microestrutura óssea dos animais do grupo $Ctsk^{cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$ na posição longitudinal (Figura 14) e na transversal (Figura 15) apresentaram menor quantidade do osso trabecular comparado com o grupo controle $Ctsk^{cre/0}$.

Figura 14. Fotos representativas do fêmur direito em 3D. Fêmures representativos na região longitudinal dos grupos $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$ (n=3) por microtomografia uCT.

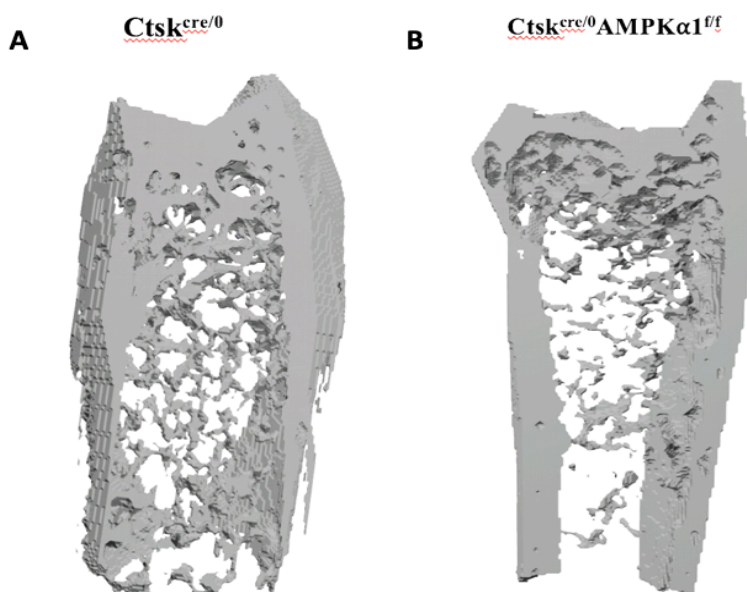
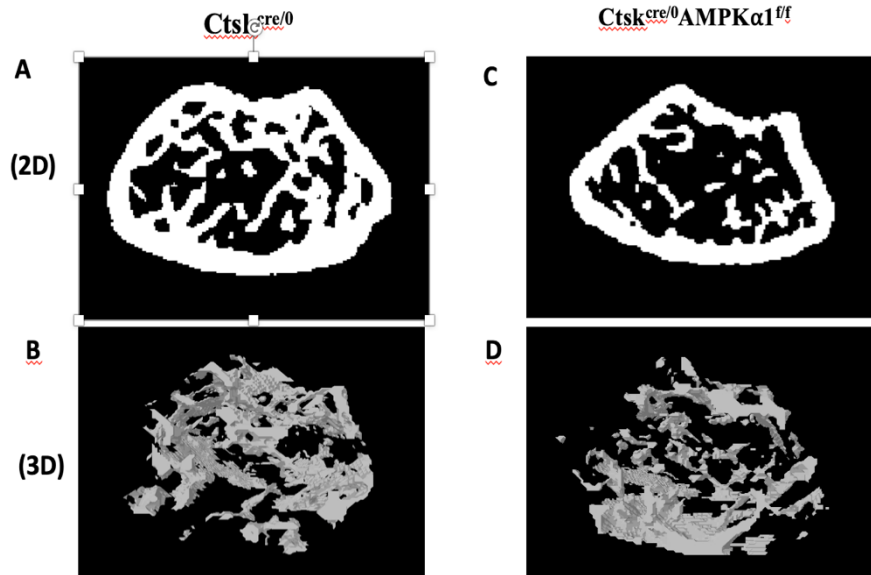
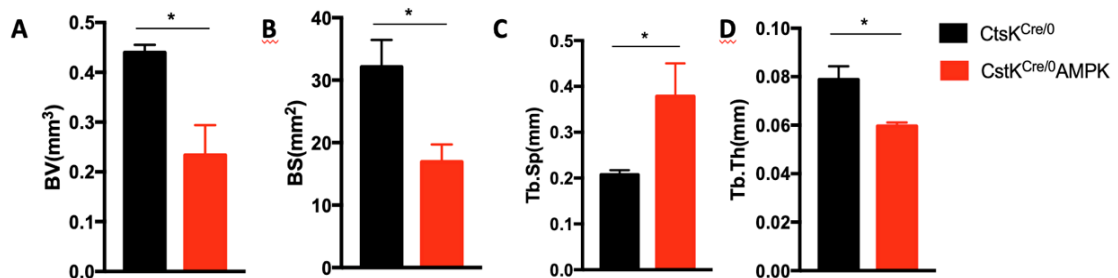


Figura 15. Fotos representativas do fêmur direito em 2D e 3D. Fêmures representativos em 2D e 3D na posição transversal do grupo $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$ (n=3) por microtomografia uCT. (A-B) $Ctsk^{Cre/0}$ Controle, (C-D) $Ctsk^{Cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$.



Sabendo que os parâmetros ósseos são importantes para detectar a perda óssea in vivo, foi quantificado o osso trabecular do grupo $Ctsk^{Cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$ e do controle. Foi analisado os parâmetros ósseos de volume ósseo (BV), superfície óssea (BS), espessura das trabéculas (Tb. Th) e número de trabéculas (Tb. n). Nesse experimento demonstra-se que os parâmetros BV, Tb. Th e Tb.n estão menores no grupo $Ctsk^{Cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$ quando comparados aos animais $Ctsk^{Cre/0}$ (Figura 16). Esses dados demonstram que a proteína AMPK α 1 em osteoclastos regula negativamente a perda óssea in vivo.

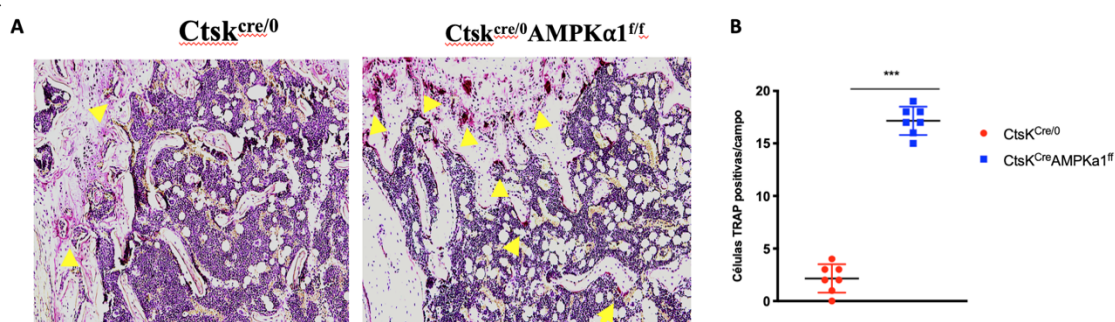
Figura 16. AMPK α 1 regula a perda óssea em animais saudáveis. Avaliação da microarquitetura óssea de fêmures direitos na posição transversal $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$ (n=3) por microtomografia uCT. (A) Volume ósseo (BV), (B) Superfície óssea (BS), (C) Separação de trabéculas (Tb.Sp), (D) Espessura trabecular (Tb.Th). A barra indica média \pm desvio padrão da média (n=3), de uma representação de 1 experimentos independentes. *P < 0,05 indica diferença estatisticamente significativa, avaliados por teste t de Student.



4.2.3 AMPK α 1 regula negativamente a osteoclastogênese in vivo

Como relatado nos experimentos anteriores, AMPK α 1 aumenta a osteoclastogênese in vitro e regula negativamente a perda óssea medular in vivo. O próximo passo foi analisar se AMPK α 1 regula o número de células TRAP positivas in vivo. Para isso, foi realizado o ensaio enzimático de TRAP nas lâminas histológicas para detectar os osteoclastos presentes na região da medula óssea do grupo *Ctsk^{cre/0}* e *Ctsk^{cre/0}AMPK α 1^{ff}* (Figura 17A). Pode-se verificar que houve um aumento de osteoclastos do grupo *Ctsk^{cre/0}AMPK α 1^{ff}* relação ao grupo controle (Figura 17B). Esses dados sugerem que a perda óssea trabecular proveniente da deleção de seletiva de AMPK α 1 em osteoclastos é gerada pelos osteoclastos da região medular.

Figura 17. AMPK α 1 regula negativamente a osteoclastogênese in vivo. (A) Fotos representativas das células TRAP positivas indicadas pelas setas amarelas na medula óssea de fêmur do grupo *Ctsk^{Cre/0}* e *Ctsk^{cre/0}AMPK α 1^{ff}* (n=7) de animais com 12 semanas. As peças foram fotografadas no aumento de 10x. (B) Quantificação das células TRAP positivas. A barra indica média \pm desvio padrão da média (n=7), de uma representação de 2 experimentos independentes. ***P<0,001 indica diferença estatisticamente significativa, avaliados por teste t de Student.

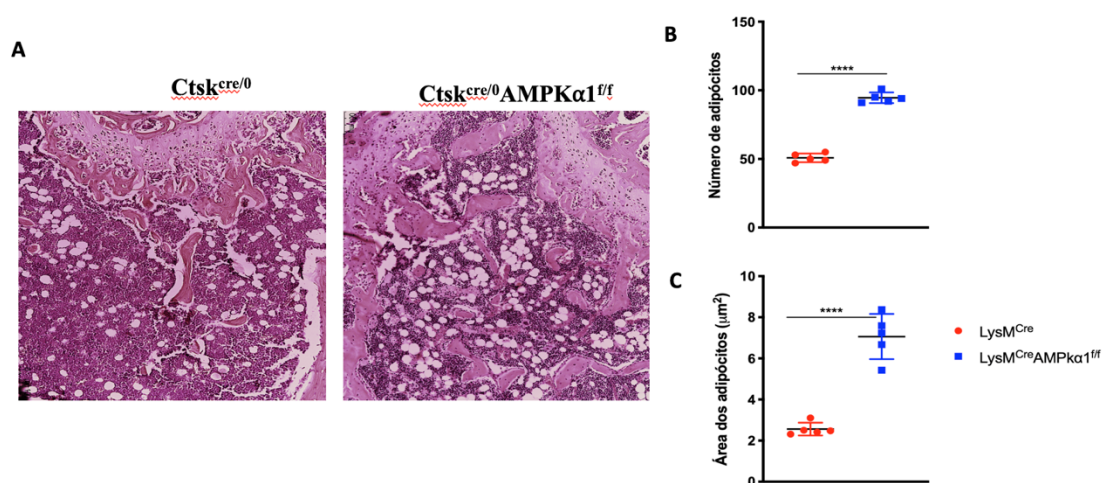


4.2.4 A deleção de AMPK α 1 aumenta o número e a área de adipócitos da medula óssea

Como já foi elucidado na literatura, osteoblastos e adipócitos têm a mesma origem: as células mesenquimais. Sendo assim, os fatores que estimulam a adipogênese inibem a osteoblastogênese e vice-versa. Ainda vale ressaltar que o aumento da adipogênese da medula óssea está correlacionada com a perda óssea medular (HO et al., 2017). Como já foi demonstrado nos experimentos anteriormente, a ausência de AMPK α 1 nos osteoclastos aumenta a perda óssea in vivo. O próximo passo foi determinar se AMPK α 1 nos osteoclastos altera a quantidade de adipócitos na medula óssea. Para isso, foi realizado um ensaio de Hematoxilina e Eosina nas lâminas histológicas para detectar os adipócitos na medula óssea de animais *Ctsk^{cre/0}AMPK α 1^{ff}* e do controle (n = 5 por grupo). Nesses dados, observa-se que os camundongos *Ctsk^{cre/0}AMPK α 1^{ff}* aumentaram a adipogênese da medula óssea em comparação com

camundongos controle (Figura 18A). Além disso, camundongos $Ctsk^{cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$ exibiram maior número e área de adipócitos no fêmur quando comparados com camundongos de controle (Figura 18B-C). Portanto, possivelmente AMPK α 1 nos osteoclastos controla a adipogênese da medula óssea.

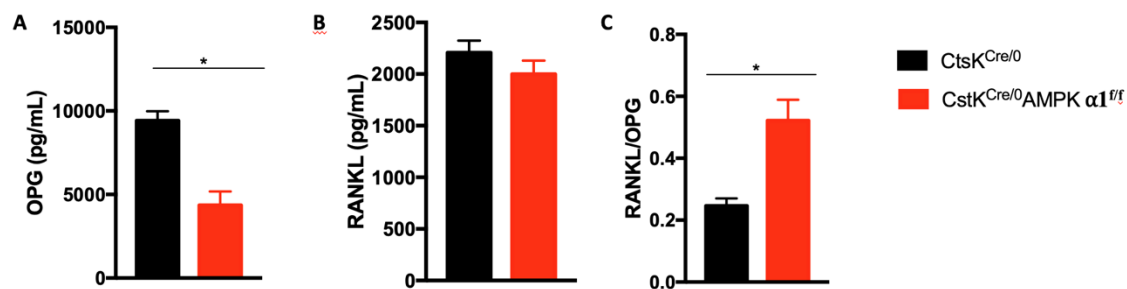
Figura 18. A deleção de AMPK α 1 aumenta o número e a área de adipócitos da medula óssea. (A) Fotos representativas dos adipócitos na medula óssea do fêmur do grupo $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$ (n=5) de animais com 12 semanas. As peças foram fotografadas no aumento de 10x. (B) Quantificação dos adipócitos. (C) Área dos adipócitos. A barra indica média \pm desvio padrão da média (n=7), de uma representação de 2 experimentos independentes. ****p<0,0001 indica diferença estatisticamente significativa, avaliados por teste t de Student.



4.2.5 AMPK α 1 regula os níveis séricos de marcadores de perda óssea sistêmica

Como foi observado uma perda óssea local, o próximo passo foi avaliar se a deleção seletiva de AMPK α 1 em osteoclastos pode alterar os níveis séricos de marcadores de perda óssea sistêmica. Para isso, foi analisado os níveis séricos de RANKL, OPG e a relação de RANKL/OPG no soro por ELISA. Observa-se que os animais do grupo $Ctsk^{cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$ apresentaram uma redução dos níveis de OPG, não houve diferença estatística dos níveis de RANKL e há um aumento da relação RANKL/OPG quando comparado com o grupo controle $Ctsk^{cre/0}$ (Figura 19). Com isso, sugere-se que houve uma perda óssea sistêmica.

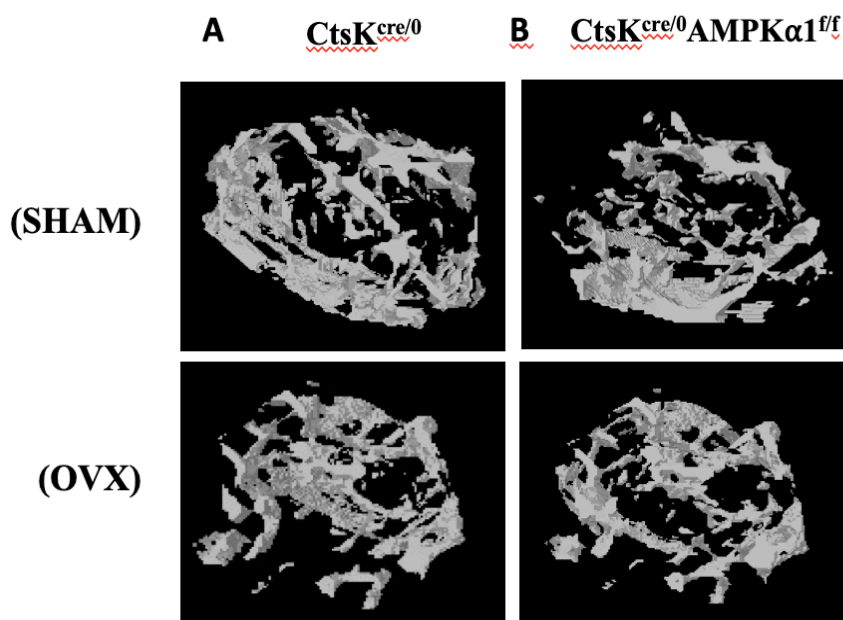
Figura 19. AMPK α 1 regula os níveis séricos de marcadores de perda óssea sistêmica. Avaliação dos níveis séricos de (A) osteoprotegerina (OPG), (B) RANKL e (C) a relação de RANKL/OPG do sangue de animais $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$ por ELISA. A barra indica média \pm desvio padrão da média (n=5), de uma representação de 2 experimentos independentes. *P<0,05 indica diferença estatisticamente significativa, avaliados por teste t de Student.



4.2.6 AMPKα1 não exacerba a perda óssea patológica por ovariectomia

A ovariectomia é um modelo que mimetiza a osteoporose, patologia que aumenta a perda óssea (MAI et al., 2011). Para avaliar se nesse modelo AMPKα1 exacerbaria a perda óssea, foi avaliado a microestrutura óssea dos animais Ctsk^{cre/0} e Ctsk^{cre/0}AMPKα1^{ff} após 30 dias de ovariectomia. Na Figura 20, observa-se que as imagens representativas da reconstrução do osso em 3D de animais SHAM e OVX dos grupos Ctsk^{cre/0} e Ctsk^{cre/0}AMPKα1^{ff}.

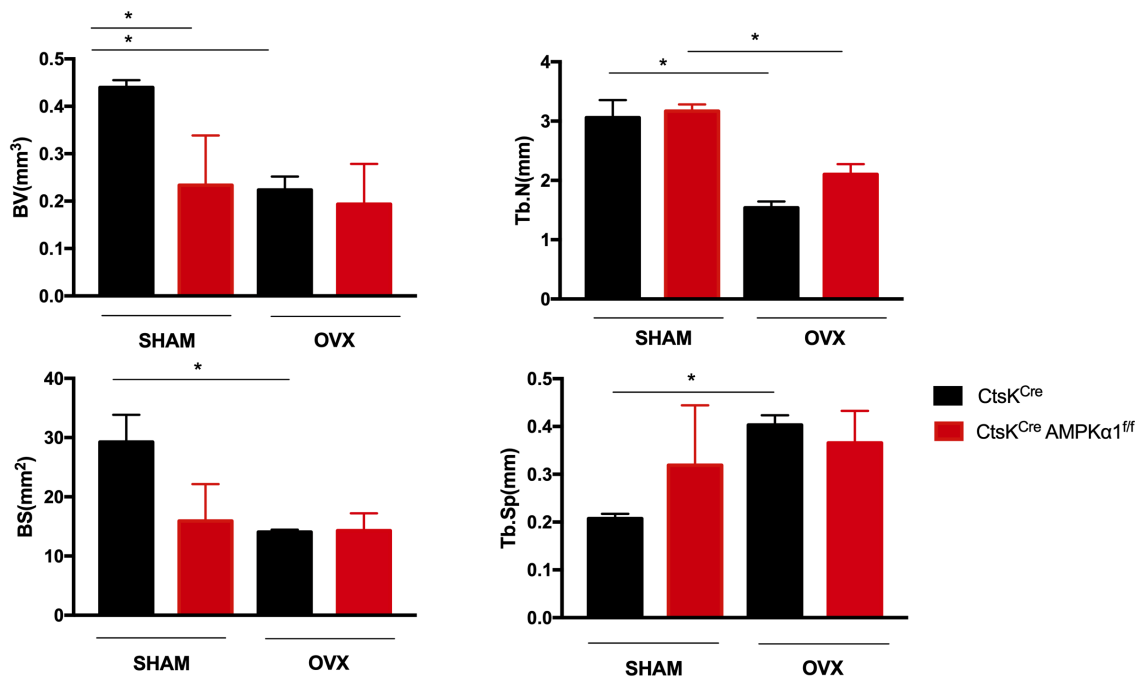
Figura 20. Fotos representativas do fêmures em 3D animais SHAM e ovariectomia. Imagens representativas de fêmures em 3D na posição transversal do grupo Ctsk^{Cre/0} e Ctsk^{cre/0}AMPKα1^{ff} (n=3) por microtomografia uCT. (A) SHAM Controle de Ctsk^{Cre/0}, (B) OVX Ctsk^{Cre/0}, SHAM Controle de Ctsk^{cre/0}AMPKα1^{ff} e OVX ovariectomizados de Ctsk^{cre/0}AMPKα1^{ff}.



Posteriormente, os parâmetros ósseos dos animais SHAM e OVX dos grupos CtsK^{cre/0} e CtsK^{cre/0}AMPKα1^{ff} foram analisados. Foi quantificado o volume ósseo (BV), a superfície óssea (BS), o número de trabéculas (Tb. n) e a separação de

trabéculas (Tb.Sp). Os dados mostraram uma redução dos parâmetros ósseos de BV, BS e Tb.n e um aumento em Tb.Sp nos animais OVX quando comparados com o grupo SHAM do grupo controle $CstK^{cre/0}$, validando o modelo de osteoporose. No entanto, quando avaliado os animais do grupo $CstK^{cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$ não houve alteração significativa nos parâmetros ósseos dos animais SHAM e OVX (Figura 21). Sendo assim, esses dados demonstraram que a AMPK α 1 em osteoclastos não controla a perda óssea patológica em modelo de ovariectomia.

Figura 21. AMPK α 1 não exerce a perda óssea patológica induzida por ovariectomia. Avaliação da microarquitetura óssea de fêmures na posição transversal de animais controles (SHAM) e ovariectomizados (OVX) $Ctsk^{Cre/0}$ (preto) e $Ctsk^{cre/0}AMPK\alpha1^{ff}$ (vermelho) por uCT. (A) Volume ósseo (BV), (B) Superfície óssea (BS), (C) Número de trabéculas (Tb.N), (D) Separação de trabéculas (Tb.Sp). A barra indica média \pm desvio padrão da média (n=3), de 1 experimento.



Discussão

5. Discussão

Os osteoclastos são as únicas células capazes de reabsorver a matriz óssea. A diferenciação celular e a reabsorção óssea demandam grandes quantidades de energia e a proteína AMPK é um sensor energético que regula a energia celular. AMPK é expressa em todas as células eucariontes e a subunidade $\alpha 1$ de AMPK é altamente expressa no tecido ósseo tanto em osteoclastos como em osteoblastos (DAVIES et al., 1994). Estudos prévios de Lee et al. (2010) mostraram que RANKL aumenta a expressão gênica de AMPK $\alpha 1$ no processo de diferenciação de osteoclastos. No entanto, não estava claro em que momento da diferenciação, a proteína AMPK $\alpha 1$ estaria mais ativa. Neste contexto, no presente estudo, verificamos que RANKL potencializa a expressão proteica de AMPK $\alpha 1$ e da sua forma ativa pAMPK $\alpha 1$ nas primeiras 24 horas da osteoclastogênese. Além disso, observamos que após 48 horas de diferenciação houve uma redução da expressão proteica de AMPK $\alpha 1$. Por isso, utilizamos animais seletivos para AMPK $\alpha 1$ em monócitos para deletar a AMPK $\alpha 1$ desde o início da diferenciação de osteoclastos.

NFATc1 é um dos principais fatores de transcrição em osteoclastos que induzem a produção de várias proteínas importantes para a fusão celular como DC-STAMP e a β_3 -integrina (MIYAMOTO, 2011). DC-STAMP é uma proteína transmembrana com a porção C-terminal intracelular, expressa na superfície de osteoclastos e no retículo endoplasmático que promove a formação de osteoclastos e é importante para a fusão célula-célula. Esse processo de fusão celular é um curto período de desenvolvimento celular, no qual monócitos/macrófagos fundem-se formando células multinucleadas, os osteoclastos. Camundongos knockouts para DC-STAMP não ocorre a fusão dos osteoclastos, apesar de apresentarem a expressão de outros marcadores de osteoclastos e da estruturas do citoesqueleto normalizados. (CHIU; RITCHLIN, 2016; KODAMA; KAITO, 2020). Já a proteína β_3 -integrina é essencial para reorganização do citoesqueleto para que haja a adesão dos osteoclastos na zona de selagem na matriz óssea mineralizada. Além disso, as integrinas emitem sinais de alta afinidade nas lacunas de reabsorção para que os osteoclastos fixem ainda mais na matriz óssea. (KODAMA; KAITO, 2020). Alguns estudos demonstraram que fármacos inibidores não-seletivos para as subunidades de AMPK como, o Composto C, aumenta a expressão gênica de *Nfatc1* e *Dstamp* in vitro (LEE et al., 2010). Um outro estudo avaliou que a deleção de AMPK $\alpha 1$ aumenta a expressão gênica de *Nfatc1*, *Acp5* e *Dstamp* (KANG;

VIOLLET; WU, 2013). Porém, esses estudos não demonstraram a correlação entre a fusão celular, a multinucleação dos osteoclastos e AMPK. Corroborando os estudos anteriores, nossos dados confirmam que a ausência de AMPK α 1 em monócitos aumenta a expressão gênica de *Nfatc1* e *Dcstamp*. Além disso, verificamos que a expressão proteica de NFATc1 e DC-STAMP aumentam com a depleção de AMPK α 1. Em acréscimo, observamos que a ausência de AMPK α 1 aumentou a expressão gênica de *Igfb3*, sugerindo que o osteoclastos estaria mais aderido na zona de selagem da matriz óssea. Até o momento nossos dados sugerem que AMPK α 1 é essencial para regular a expressão de marcadores osteoclastogênicos de fusão celular e sugere que regula a adesão do osteoclastos na matriz óssea.

A ativação de AMPK por Metformina inibe a osteoclastogênese em células de linhagem de monócitos/macrófagos imortalizadas (Raw 264.7) estimuladas com RANKL. (PARK et al., 2020). Similarmente, Lee e colaboradores (2013) também demonstraram que outros ativadores não seletivos da subunidade de AMPK como o Resveratrol e α -LA inibem os marcadores da osteoclastogênese bem como a formação de osteoclastos. Nesse mesmo estudo, a supressão de AMPK α 1 em células da medula óssea pela transfecção de RNA interferência para AMPK, demonstrou que houve um aumento da expressão de proteínas das vias de sinalização da osteoclastogênese como Akt, JNK, ERK e p-38, além de aumentar células TRAP positivas. Outro estudo *in vitro*, Kang e colaboradores (2013) reportam que a deficiência total de AMPK α 1 potencializa a formação de osteoclastos sob o estímulo de M-CSF e RANKL. Em consenso com os estudos anteriores, os dados desse trabalho, confirmam que AMPK α 1 potencializa a osteoclastogênese. Em adição, observamos que a ausência de AMPK α 1 aumenta o tamanho dos osteoclastos formados, por regular fatores de fusão como *Dcstamp* e *Igfb3*. Portanto, sugerimos que a AMPK α 1 regula negativamente a diferenciação de osteoclastos e o tamanho dos osteoclastos.

Nos mamíferos, um número limitado de células realizam a fusão para formar células multinucleadas, tais como os mioblastos para a formação do músculo esquelético e monócitos e/ou macrófagos que sofrem fusão para a formação de osteoclastos gigantes multinucleados. A fusão celular permite às células aumentarem de tamanho e realizarem a sua função (XING et al., 2012). A proteína AMPK regula a fusão de mioblastos pelo aumento da expressão da proteína Miogenina (FU et al., 2013). A proteína DC-STAMP é um marcador de fusão celular, mas também é responsável

pela multinucleação dos osteoclastos. (KODAMA; KAITO, 2020). Nos nossos dados como já elucidado anteriormente, AMPK α 1 regula a expressão de DC-STAMP no osteoclastos. Porém, até o momento na literatura não há evidências que comprove a relação entre os fatores de fusão e multinucleação dos osteoclastos e AMPK. Nesse estudo, verificamos que a depleção de AMPK α 1 favorece um aumento da quantidade de núcleos por osteoclastos gigantes. Logo, os nossos dados confirmam que o aumento do tamanho dos osteoclastos, juntamente com o aumento de núcleos por célula, sugerem que AMPK α 1 participa da fusão celular e regula a multinucleação dos osteoclastos gigantes.

Uma vez fundidos, os osteoclastos já estão maduros e reorganizam seu citoesqueleto para aderirem a matriz óssea. O citoesqueleto forma filamentos de f-actina, formando o anel de actina e a borda ondulada para selar a área de reabsorção e para secretar os prótons de H⁺, respectivamente (MIYAMOTO, 2011). Ramos-junior e colaboradores (2016) analisaram o papel da Quemerina na formação do anel de actina e na reabsorção óssea. Osteoclastos maduros que foram tratados com Quemerina exibiram um anel de actina mais evidente e maior área de reabsorção, após 72 horas de diferenciação, sugerindo uma maior adesão a matriz óssea e a maior atividade de reabsorção. Interessantemente, no presente trabalho, observamos que após 48 horas de diferenciação a deleção de AMPK α 1 leva a uma antecipação da formação de osteoclastos maiores e do anel de actina mais evidente. Nossos dados, demonstraram que a ausência de AMPK α 1 aumenta a área do anel de actina nos osteoclastos maduros, sugerindo uma maior adesão dos osteoclastos na matriz óssea. Portanto, sugerimos que AMPK α 1 regula a formação dos osteoclastos maiores, bem como controla a reorganização do anel de actina e a adesão na matriz óssea em osteoclastos.

A reabsorção nos tecidos ósseos ocorre pela degradação de componentes da matriz extracelular como o colágeno e os proteoglicanos. Essa degradação da matriz ocorre principalmente pela ação da catepsina K e pelas metaloproteinases da matriz (MMPs)(FULLER et al., 2010). A MMP-9 é ativada e clivada por catepsina K. Um estudo mostrou que AMPK α 1 regula negativamente a osteoclastogênese in vitro pela via de sinalização IKK α /p38/MAPK além de aumentar a expressão de catepsina K. Similarmente a este estudo, Lee e colaboradores (2013) mostraram que o Composto C, inibidor não-seletivo de AMPK, também reduz a reabsorção óssea in vitro. Controversamente, o estudo de Wang e colaboradores (2016) demonstraram que

osteoclastos co-cultivados com uma linhagem de osteoblastos (MC3T3-E1), que superexpressão a subunidade $\alpha 1$ de AMPK pela transfecção de lentivírus, reduzem reabsorção óssea. Com isso, o suposto papel de AMPK $\alpha 1$ na regulação da atividade dos osteoclastos não está totalmente claro. Desta forma no presente estudo avaliamos o papel de AMPK sobre a expressão de enzimas necessárias para o função dos osteoclastos. Foi observado que a ausência de AMPK $\alpha 1$ em monócitos aumentou a expressão de Catepsina K e MMP-9. Além disso, demonstramos que o AMPK $\alpha 1$ participa não somente da expressão das enzimas mas também do processo de reabsorção, pois a ausência de AMPK $\alpha 1$ aumenta da taxa de reabsorção óssea em placas de hidroxiapatita. Sendo assim, AMPK $\alpha 1$ é imprescindível para a regulação da reabsorção óssea *in vitro*.

A avaliação dos parâmetros ósseos pela microtomografia são essenciais para detectar a perda óssea *in vivo*. Alguns estudos prévios mostraram que o uso de inibidores não-seletivos de AMPK em animais WT reduziram os parâmetros ósseos, induzindo a perda óssea *in vivo* (AHN et al., 2008). Kang et al (2013) reforçam que animais com deleção total de AMPK $\alpha 1$ reduziu os parâmetros ósseos de BV/TV, aumentando a perda óssea *in vivo*. Em acordo com esses estudos, os dados desse trabalho demonstraram que houve um redução dos parâmetros ósseos de BV, Tb, Th e Tb.n em animais com deleção de AMPK $\alpha 1$ especificamente em osteoclastos. No entanto, esses estudos da perda óssea utilizando moduladores gerais ou animais com deleção total de AMPK $\alpha 1$ não nos permite concluir se a perda óssea observada é decorrente da deficiência de AMPK $\alpha 1$ em osteoclastos, osteoblastos ou ainda, em outro tipo celular. Os dados histológicos do presente estudo demonstraram que a deleção seletiva AMPK $\alpha 1$ em osteoclastos aumenta o número de células TRAP positivas. Desta forma, pode-se especular que a deleção seletiva de AMPK $\alpha 1$ leva a uma maior suscetibilidade a osteoporose proveniente do aumento dos osteoclastos. Ainda, os dados *in vitro* e *in vivo* confirmam que AMPK $\alpha 1$ exerce um papel protetor, impedindo a perda óssea.

AMPK é um sensor energético que regula a dinâmica mitocondrial em vários tipos celulares (MARIN et al., 2017). Galic e colaboradores (2011) demonstraram que a deleção de AMPK $\beta 1$ suprimem a expressão de enzimas mitocondriais em macrófagos. Em condições de privação energética, AMPK regula a fissão mitocondrial e a mitofagia (KROGH et al., 2016). As mitocôndrias estão em um equilíbrio constante de divisão e

fusão, o que é essencial para manter a qualidade e a quantidade das mitocôndrias (DETMER; CHAN, 2007b). A proteína Mitofusina 1 (Mnf1) e a proteína Mitofusina 2 (Mnf2) são essenciais para a fusão mitocondrial (DETMER; CHAN, 2007a) Já a proteína relacionada a dinâmica 1 (DRP1) é importante para fissão mitocondrial (OTERA et al., 2010). Um estudo recente, demonstrou que para regular a autofagia em miofibroblastos em condições de estresse energético, AMPK transloca do citosol para a membrana do retículo endoplasmático associada com a mitocôndria (MAM) e interage diretamente com a Mnf2 (HU et al., 2021). No entanto, não estava claro a interação de AMPK α 1 na dinâmica mitocondrial. Nesse presente estudo, observamos que a ausência de AMPK α 1 aumentou expressão de gênica de *Mnf1* e *Mnf2*. Curiosamente, verificamos ainda um aumento na área das mitocôndrias em osteoclastos com ausência de AMPK α 1. Com isso, sugere-se que AMPK α 1 regula a biogênese mitocondrial pela fusão das mitocôndrias. Além disso, possivelmente AMPK α 1 controla a demanda energética na diferenciação de osteoclastos e na reabsorção óssea por meio da reorganização mitocondrial.

Nossos dados mostraram que a ausência de AMPK α 1 leva uma perda óssea medular proveniente do aumento da osteoclastogênese e induz uma adipogênese na medula óssea. Já é do conhecimento que as células mesenquimais originam tanto osteoblastos quanto adipócitos. Uma vez induzida a via de adipogênese, os osteoblastos são inibidos e o mesmo ocorre o contrário. A perda óssea medular proveniente do aumento da osteoclastogênese gera um aumento da adipogênese na medula óssea (HO et al., 2017). Portanto, nossos dados sugerem que a deleção de AMPK α 1 aumenta a adipogênese na medula e inibe a osteoblastogênese. Além disso, sugerimos que AMPK α 1 controla a perda óssea medular proveniente do aumento de células TRAP positivas.

A osteoporose é uma condição patológica que leva a fragilidade óssea, fraturas e perda óssea. A ovariectomia é um modelo que mimetiza a osteoporose. Jeyabalan e colaboradores (2012) demonstraram que animais com deleção total de AMPK α 1 submetidos a ovariectomia reduziram os parâmetros ósseos, levando uma perda óssea patológica (JEYABALAN et al., 2012). Em outro estudo, animais WT ovariectomizadas tratados com o ativador não seletivo de AMPK, a Metformina, gera um efeito protetor de perda óssea (MAI et al., 2011). Afim de analisar se a deleção seletiva de AMPK α 1 em osteoclastos exacerbaria a perda óssea em modelo de osteoporose, os animais com

deleção seletiva de AMPK α 1 em osteoclastos foram ovariectomizadas. Observamos que não houve diferença estatística nos parâmetros ósseos de BV, BS, Tb.n e Tb.Sp, não exacerbando a perda óssea patológica.

Ao longo deste estudo, foi observado que a enzima AMPK α 1 nos osteoclastos regula negativamente a diferenciação de osteoclastos, uma vez que a ausência dessa enzima levou a um aumento do número e do tamanho dos osteoclastos in vitro. Isso foi confirmado pelo aumento de expressão dos marcadores de fusão dos osteoclastos com deleção seletiva para AMPK α 1. Observamos ainda que a multinucleação dos osteoclastos gigantes bem como a área do anel de actina é regulado pela AMPK α 1. Os nossos dados ainda confirmam que AMPK α 1 controla a perda óssea in vitro e in vivo. Nos osteoclastos sem AMPK α 1, há uma maior expressão gênica de marcadores de fusão mitocondrial e maior área das mitocôndrias. Além disso, em animais com a deleção seletiva de AMPK α 1 em osteoclastos apresentaram osteoporose espontânea proveniente do aumento de células TRAP positivas. Nossos dados ainda demonstram que em condições patológicas em que se mimetiza a osteoporose, não há uma progressão da doença.

Conclusão

6. Conclusão

AMPK α 1 é um regulador negativo da osteoclastogênese in vitro. Ao nosso ver, este é o primeiro estudo avaliando AMPK α 1 na fusão de celular e na multinucleação dos osteoclastos. Além disso, esclarecemos o papel efetivo de AMPK α 1 na reabsorção óssea. Até o momento como demonstrado no modelo in vivo, AMPK α 1 controla a perda óssea, protegendo o aumento de osteoclastos e o desenvolvimento da osteoporose espontânea. Esse trabalho ainda demonstra de forma inédita a associação de AMPK α 1 na biogênese mitocondrial em osteoclastos, controlando os fatores de fusão das mitocôndrias. Portanto, esse estudo é importante para melhor entender o papel de AMPK α 1 na biologia óssea e contribui para que novas terapias avance no tratamento de patologias ósseas.

Referências

7. Referências

- AHN, J. et al. The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 373, n. 4, p. 545–549, 2008.
- BERTINI, I. et al. Locating the Metal Ion in Calcium-Binding Proteins by Using Cerium(III) as a Probe. **ChemBioChem**, v. 2, n. 7–8, p. 550–558, 2001.
- CARLING, D. et al. **Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities***Fur. J. Eiochem.* [s.l: s.n.].
- CARLING, D. AMPK signalling in health and disease. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 45, p. 31–37, 2017.
- CHIU, Y.-H.; RITCHLIN, C. DC-STAMP: A Key Regulator in Osteoclast Differentiation. **Journal of Cell Physiol**, v. 231, n. 11, p. 1–16, 2016.
- DAVIES, S. P. et al. **Purification of the AMP-activated protein kinase on ATP-y-Sepharose and analysis of its subunit structure***Eur. J. Biochem.* [s.l: s.n.].
- DETMER, S. A.; CHAN, D. C. Complementation between mouse Mfn1 and Mfn2 protects mitochondrial fusion defects caused by CMT2A disease mutations. **Journal of Cell Biology**, v. 176, n. 4, p. 405–414, 2007a.
- DETMER, S. A.; CHAN, D. C. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 11, p. 870–879, 2007b.
- DOBSON, P. F. et al. Mitochondrial dysfunction impairs osteogenesis, increases osteoclast activity, and accelerates age related bone loss. v. 10, p. 11643, 2020.
- DONG, W. et al. Zoledronate and high glucose levels influence osteoclast differentiation and bone absorption via the AMPK pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 505, n. 4, p. 1195–1202, 2018.
- FONG, D. et al. **Bone morphogenetic protein-9 activates Smad and ERK pathways and supports human osteoclast function and survival in vitro.** [s.l.] Elsevier B.V., 2013. v. 25
- FU, X. et al. AMP-activated protein kinase mediates myogenin expression and myogenesis via histone deacetylase 5. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 305, p. 887–895, 2013.
- FULLER, K. et al. The resorptive apparatus of osteoclasts supports lysosomotropism and increases potency of basic versus non-basic inhibitors of cathepsin K. **Bone**, v. 46, n. 5, p. 1400–1407, 2010.

GUERRINI, M. M.; TAKAYANAGI, H. The immune system, bone and RANKL. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 561, n. June, p. 118–123, 2014.

HATTERSLEY, G. et al. Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) is essential for osteoclast formation in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 177, n. 1, p. 526–531, 1991.

HO, L. et al. Sirtuin-3 Promotes Adipogenesis, Osteoclastogenesis, and Bone Loss in Aging Male Mice. 2017.

HU, Y. et al. The AMPK-MFN2 axis regulates MAM dynamics and autophagy induced by energy stresses. **Autophagy**, v. 17, n. 5, p. 1142–1156, 2021.

HURST, I. R. et al. Actin-related protein 2/3 complex is required for actin ring formation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19, n. 3, p. 499–506, 2004.

INDO, Y. et al. Metabolic regulation of osteoclast differentiation and function. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 28, n. 11, p. 2392–2399, 2013.

JANSEN, I. D. C. et al. Osteoclast fusion and fission. **Calcified Tissue International**, v. 90, n. 6, p. 515–522, 2012.

JEYABALAN, J. et al. REVIEW AMP-activated protein kinase pathway and bone metabolism. **Journal of Endocrinology**, v. 212, p. 277–290, 2012.

KANG, H.; VIOLLET, B.; WU, D. Genetic deletion of catalytic subunits of AMP-activated protein kinase increases osteoclasts and reduces bone mass in young adult mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 17, p. 12187–12196, 2013.

KIM, J. et al. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. **Experimental & Molecular Medicine**, p. 48, 2016.

KIM, J. M. et al. Osteoclast precursors display dynamic metabolic shifts toward accelerated glucose metabolism at an early stage of RANKL-stimulated osteoclast differentiation. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 20, n. 6, p. 935–946, 2007.

KODAMA, J.; KAITO, T. Osteoclast multinucleation: Review of current literature. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, p. 1–35, 2020.

KOGA, T. et al. Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. **Nature**, v. 428, n. 6984, p. 758–763, 2004.

KROGH, A. et al. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in. **Science**, v. 351, n. 6270, p. 275–281, 2016.

LEE, Y. S. et al. AMP kinase acts as a negative regulator of RANKL in the differentiation of osteoclasts. **Bone**, v. 47, n. 5, p. 926–937, 2010.

MAI, Q. G. et al. Metformin stimulates osteoprotegerin and reduces RANKL

expression in osteoblasts and ovariectomized rats. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 10, p. 2902–2909, 2011.

MAO, D. et al. PLC γ 2 regulates osteoclastogenesis via its interaction with ITAM proteins and GAB2. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 11, p. 2869–2879, 2006.

MARIN, T. L. et al. AMPK promotes mitochondrial biogenesis and function by phosphorylating the epigenetic factors DNMT1, RBBP7, and HAT1. **Science Signaling**, v. 10, n. 464, p. 1–11, 2017.

MIYAMOTO, T. **Regulators of Osteoclast Differentiation and Cell-Cell Fusion** *Keio J Med.* [s.l: s.n.].

MUN, S. H. et al. Interleukin-33 stimulates formation of functional osteoclasts from human CD14⁺ monocytes. **Cell molecular Life Science**, v. 67, n. 22, p. 3883–3892, 2010.

OTERA, H. et al. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. **Journal of Cell Biology**, v. 191, n. 6, p. 1141–1158, 2010.

PARK, S.-H. et al. Metformin coordinates osteoblast/osteoclast differentiation associated with ischemic osteonecrosis See-Hyoung. v. 12, n. 6, p. 4727–4741, 2020.

PEDERSON, L. et al. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 52, p. 20764–20769, 2008.

RICHTER, E. A.; RUDERMAN, N. B. AMPK and the biochemistry of exercise: Implications for human health and disease. **Biochemical Journal**, v. 418, n. 2, p. 261–275, 2009.

RODAN, G. A.; MARTIN, J. Therapeutic Approaches to Bone Diseases. **Science**, v. 289, n. September, p. 1508–1514, 2000.

TAKAYANAGI, H. et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. **Developmental Cell**, v. 3, n. 6, p. 889–901, 2002.

TIEDEMANN, K. et al. Regulation of osteoclast growth and fusion by mTOR/raptor and mTOR/rictor/Akt. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 5, n. MAY, p. 1–10, 2017.

TONG, X. et al. Osteoprotegerin inhibit osteoclast differentiation and bone resorption

by enhancing autophagy via AMPK/mTOR/p70S6K signaling pathway in vitro. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 2, p. 1630–1642, 2019.

VÄÄNÄNEN, H. K.; LAITALA-LEINONEN, T. Osteoclast lineage and function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 473, n. 2, p. 132–138, 2008.

WINSLOW, R. L. et al. Multiscale modeling of calcium signaling in the cardiac dyad. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1080, p. 362–375, 2006.

XING, L. et al. Osteoclast fusion and regulation by RANKL-dependent and independent factors. v. 3, n. 12, p. 212–222, 2012.

YAVROPOULOU, M. P.; YOVOS, J. G. Osteoclastogenesis - Current knowledge and future perspectives. **Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions**, v. 8, n. 3, p. 204–216, 2008.

ZADRA, G.; BATISTA, J. L.; LODA, M. Dissecting the Dual Role of AMPK in Cancer: From Experimental to Human Studies. **Mol Cancer Res**, v. 13, n. 7, 2015.