



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**



LETÍCIA FERNANDA DUFFLES RODRIGUES

**Efeito da AMPK sobre a remodelação óssea em modelo experimental
murino de movimentação dentária ortodôntica**



**Ribeirão Preto
2022**

LETÍCIA FERNANDA DUFFLES RODRIGUES

**Efeito da AMPK sobre a remodelação óssea em modelo experimental
murino de movimentação dentária ortodôntica**

VERSÃO CORRIGIDA

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

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientadora: Sandra Yasuyo Fukada Alves

Ribeirão Preto

2022

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.

Assinatura do autor: _____ Data: ___/___/2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto

Rodrigues, Letícia Fernanda Duffles

Efeito da AMPK sobre a remodelação óssea em modelo experimental murino de movimentação dentária ortodôntica./ Letícia Fernanda Duffles Rodrigues; Orientadora, Prof.^a Dr.^a Sandra Yasuyo Fukada Alves. Ribeirão Preto, 2022.

113p.: il.; 30cm

Versão corrigida da tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa.

Versão Corrigida

1. AMPK. 2. Remodelação óssea. 3. Movimentação dentária ortodôntica. 4. Osteoclastos. Osteoblastos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

RODRIGUES, L.F.D. **Efeito da AMPK sobre a remodelação óssea em modelo experimental murino de movimentação dentária ortodôntica.**

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

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Aprovado em: ___/___/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

LETÍCIA FERNANDA DUFFLES RODRIGUES

Nascimento	22 de Abril 1992, Belo Horizonte, MG
Filiação	Fernanda Leopoldino Duffles
2010-2015	Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais
2011-2015	Iniciação Científica – Bolsista Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais Orientadora: Profa. Dra. Tarcília Aparecida Silva
2016-2018	Mestrado em Odontologia Área de Concentração: Odontopediatria Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais Dissertação: “Associação entre obesidade e adipocinas na saliva e fluido gengival crevicular: uma revisão sistemática e meta-análise.” Orientadora: Profa. Dra. Tarcília Aparecida Silva
2019-2019	Aperfeiçoamento em Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP/USP
2018-2022	Doutorado em Ciências Área de Concentração: Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo- FORP/USP Tese: “Efeito da AMPK sobre a remodelação óssea em modelo experimental murino de movimentação dentária ortodôntica” Orientadora: Profa. Dra. Sandra Yasuyo Fukada Alves

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora **Prof^á. Dr^a. Sandra Yasuyo Fukada**, quem admiro a competência e entusiasmo pela pesquisa, por me acolher como orientanda e por todo ensinamento durante esses quatro anos. Muito obrigada pela confiança depositada em mim e por sua dedicação e orientação neste trabalho e em todos os outros que compartilhamos.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, ao **Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. E aos professores dessa instituição, por todos os valiosos ensinamentos e auxílio na construção do meu conhecimento. E aos professores da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e do Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias (CRID), **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.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Processo: 2019/01596-0)** pelo suporte financeiro para que esse projeto fosse executado.

Ao **Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM)** pelo escaneamento das microtomografias computadorizadas.

À **Prof^á. Dr^a Ana Paula Ramos** por ceder seu laboratório, equipamentos e, especialmente, seus ricos conhecimentos para realização das análises na Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

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

Agradeço também todos os técnicos e funcionários, em especial **Mayara Santos Gomes, Juliana Aparecida Vercesi de Macedo, Nilza Letícia Magalhães, Marco Antônio dos Santos, Marina Del Arco Mastrange e Mary Possani Carmessano** por todo auxílio e ensinamento durante a realização dos experimentos laboratoriais, pela ajuda com processos burocráticos, pela companhia e conversas descontraídas.

À **Prof^á. Dr^a Tarcília Aparecida Silva** da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, minha eterna orientadora, por ter sido e ser meu exemplo na academia. Obrigada por todo incentivo sempre, mesmo quando esse incentivo me fez vir fazer o doutorado na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. E por jamais esquecer e desistir de mim, mesmo com toda distância.

Uma tese de doutorado não se faz sozinha e eu tive comparsas melhores que os "**Minions**", os quais não só foram meu braço direito no laboratório, mas anjos em minha vida e amigos sensacionais, muito obrigada meus parceirinhos **Lucas Venturini, João Guilherme, Mariana Pena, Laisa Souza, Taissa Cássia, Ayda Schneider, Cesar Speck e Jeferson Moussa**.

Durante esse período do doutorado, o qual veio cercado de mudanças e novidades, fiz grandes amigos que viraram minha família em Ribeirão Preto, a eles agradeço pelo apoio emocional, momentos de risada, abraços carinhosos, incentivo e por todo o laço criado o qual espero que perdure. Obrigada **Thaise Taira, Renata Delgado, Cecília Costa e Rodrigo Dias**, por serem tão especiais e presentes em todos os momentos, sejam de alegria ou difíceis.

Agradeço também a todos os amigos que deixei em Belo Horizonte, mas jamais deixei de carregá-los em meu coração com um carinho e amor que transbordam. **Abgail Pinheiro, Amanda Leal, Sicília Oliveira, Marcos de Oliveira e Soraiá Macari**, obrigada por todo apoio imensurável, mesmo de longe, vocês são incríveis!

Aos meus tios **Fabrcio Duffles**, **Flávio Duffles**, **Viviane Duffles** e **Daniele Marzano** e meus primos **João Vitor Duffles** e **Luísa Duffles**, por tanto carinho e amor, pela torcida, apoio e sorrisos.

Por fim, de modo especial, agradeço minha mãe **Fernanda Leopoldino Duffles**, minha irmã **Bianca Cristina Duffles**, meu avô **Amaury Andrade Duffles** e minha avó Maria de **Lourdes Leopoldino Duffles**, que além de minha família são meu pilar e porto seguro. Obrigada por sonharem junto comigo, enfrentarem todas as dificuldades sem sequer pensarem em soltar minha mão. Foi uma batalha árdua, vencida a cada dia em meio a tanta saudade, mas com a certeza de um amor imensurável que nos deu força e não nos deixou desanimar. Não teria dado um passo sem vocês. Amo vocês ao infinito e além!

Por fim, agradeço a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a concretização deste trabalho e, também, a todos que passaram de alguma forma por minha vida durante esse período. Muito obrigada!

RESUMO

RESUMO

RODRIGUES, L.F.D. **Efeito da AMPK sobre a remodelação óssea em modelo experimental murino de movimentação dentária ortodôntica.** 2022. 113p. Tese. (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2022.

A movimentação dentária ortodôntica (MDO) resulta de uma intensa remodelação óssea em ambiente estéril. A aplicação de um estímulo mecânico ao dente gera uma cascata de eventos físicos e biológicos no periodonto, formando uma área de tensão e outra de pressão no alvéolo dentário, com ação de osteoblastos e osteoclastos, respectivamente. Esses tipos celulares demandam uma alta taxa de energia durante a diferenciação e especialmente durante sua ação, levando à ativação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK). A AMPK é um complexo de proteína quinase serina/treonina heterotrimérica, que possui um papel central na homeostase energética, atuando em situações de déficit energético, com o objetivo de inibir processos que consomem energia e estimulando os produtores. Dessa forma o objetivo do nosso estudo foi investigar o papel da deleção de AMPK, especificamente em osteoclastos e osteoblastos, durante a remodelação óssea alveolar *in vivo*. Para isso foram utilizados animais deficientes condicionais de AMPK em osteoclastos ($Ctsk^{Cre/0} AMPK^{ff}$) e osteoblastos ($Col1a1^{Cre-ERT2/0} AMPK^{ff}$) e seus respectivos controles $Ctsk^{Cre/0}$ e $Col1a1^{Cre/0} AMPK^{ff}$, submetidos à colagem de mola de níquel-titânio no primeiro molar superior direito, ancorada aos incisivos. Primeiramente foi observado que a deleção seletiva de AMPK em osteoclastos resultou em uma maior MDO após 12 dias de aplicação da força, associado a uma maior expressão dos genes para *IL-6* e menor expressão de *IL-10* em tempos iniciais da MDO. Além disso, camundongos $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{ff}$ apresentaram melhores parâmetros ósseos alveolares representados por maior densidade mineral, maior volume ósseo e menor espaço entre as trabéculas, bem como uma menor expressão gênica de *ctsk* e *rankl* no osso alveolar, quando comparado aos controle. Corroborando a esses achados verificamos que o osso alveolar de camundongos $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{ff}$ apresentaram uma razão entre matriz mineral e matriz orgânica relativamente maior identificada pela razão de intensidade das bandas em infravermelho, bem como estruturas minerais mais nítidas identificadas por microscopia eletrônica de varredura, quando comparado ao osso alveolar de camundongos controle. Nos camundongos $Col1a1^{Cre-ERT2/0} AMPK^{ff}$ verificamos uma menor MDO e a deleção seletiva de AMPK provocou uma piora nos parâmetros ósseos alveolares representada pela redução da densidade mineral óssea, menor volume ósseo e trabéculas ósseas mais finas quando comparado aos camundongos controle. Esses resultados sugerem que a AMPK, em osteoclastos, possui um papel favorável à osteoclastogênese e em osteoblastos essa proteína apresenta uma ação osteoprotetora. Além disso, a AMPK parece ter um papel importante sobre a atividade de osteoclastos e osteoblastos especificamente durante a MDO.

Palavras-chave: AMPK. Remodelação óssea. Movimentação dentária ortodôntica. Osteoclastos. Osteoblastos.

ABSTRACT

ABSTRACT

RODRIGUES, L.F.D. **Effect of AMPK on bone remodeling in an experimental murine model of orthodontic tooth movement.** 2022. 113f. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2022.

Orthodontic tooth movement (OTM) results from intense bone remodeling in a sterile environment. The application of a mechanical stimulus to the tooth generates a cascade of physical and biological events in the periodontium, forming an area of tension and another of pressure in the dental alveolus, with the action of osteoblasts and osteoclasts, respectively. These cell types demand a high rate of energy during differentiation and especially during their action, leading to adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) activation. AMPK is a heterotrimeric serine/threonine protein kinase complex, which plays a central role in energy homeostasis, acting in situations of energy deficit, to inhibit energy-consuming processes and stimulating producers. Thus, our study aimed to investigate the role of AMPK deletion, specifically in osteoclasts and osteoblasts, during alveolar bone remodeling *in vivo*. For this, AMPK conditional deficient animals, specifically in osteoclasts, were used ($Ctsk^{Cre/0} AMPK^{f/f}$) and specifically in osteoblasts ($Col1a1^{Cre-ERT2/0} AMPK^{f/f}$) and their respective controls $Ctsk^{Cre/0}$ and $Col1a1^{Cre/0} AMPK^{f/f}$, submitted to nickel-titanium spring in the upper right first molar, anchored to the incisors. First, it was observed that the selective deletion of AMPK in osteoclasts resulted in a higher OTM after 12 days of force application, associated with a higher expression of the genes for *IL-6* and a lower expression of *IL-10* in the initial times of the OTM. Furthermore, $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{f/f}$ mice showed better alveolar bone parameters represented by higher bone mineral density, greater bone volume and less space between the trabeculae, as well as a lower gene expression of *ctsk* and *rankl* in alveolar bone, when compared to controls. Corroborating these findings, we verified that the alveolar bone of $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{f/f}$ mice presented a relatively higher ratio between mineral matrix and organic matrix identified by the intensity of the infrared bands, as well as clearer mineral structures identified by scanning electron microscopy, when compared to bone alveolus of control mice. In $Col1a1^{Cre-ERT2/0} AMPK^{f/f}$ mice, we found a lower OTM and the selective deletion of AMPK caused a worsening in alveolar bone parameters represented by reduced bone mineral density, lower bone volume and thinner bone trabeculae when compared to control mice. These results suggest that AMPK, in osteoclasts, has a favorable role in osteoclastogenesis and in osteoblasts this protein has an osteoprotective action. Furthermore, AMPK appears to play a role in the osteoclasts and osteoblasts specifically during OTM.

Keywords: AMPK. Bone remodeling. Orthodontic tooth movement. Osteoclasts. Osteoblasts.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α:	alfa
β:	beta
γ:	gama
K:	kappa
TNF:	fator de necrose tumoral
IL:	interleucina
M-CSF:	fator estimulador de colônia de macrófagos
OPG:	osteoprotegerina
RANKL:	ligante do receptor de ativação do fator nuclear kB
COX-2:	Ciclooxygenase-2
AMPc:	monofosfato cíclico de adenosina
RANK:	receptor de ativação do fator nuclear kB
MMP:	metaloproteinase da matriz
TGF-β:	fator de crescimento transformador beta
COL-1:	gene do colágeno tipo 1
TIMP:	inibidor tecidual de metaloproteinases
AMPK:	proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
ATP:	adenosina trifosfato
AMP:	adenosina monofosfato
AKT:	proteína quinase B
mTOR:	receptor alvo de rapamicina em mamíferos
MicroCT:	microtomografia computadorizada
TRAP ou TRAcP:	fosfatase ácida resistente ao tartarato
qPCR:	reação em cadeia da polimerase quantitativa
Ctsk:	catepsina k
Col1a1:	colágeno tipo 1 subunidade α 1
%:	por cento
μl:	microlitros
$^{\circ}$C:	graus celsius

ng:	nanograma
V:	volts
mL/kg:	mililitros por quilograma
Ni-Ti:	Níquel-Titânio
mm:	milímetros
cm:	centímetros
g:	gramas
µm:	micrômetro
kv:	kilowatt
°:	graus
3D:	tridimensional
g/cm³:	grama por centímetro cúbico
mm³:	milímetro(s) cúbico (s)
BMD:	densidade mineral óssea
BV:	volume ósseo
BV/TV:	volume ósseo / volume de tecido
Tb.Th:	Espessura das trabéculas
Tb.N:	Número de trabéculas
Tb.Sp:	Espaço entre as trabéculas
RNA:	ácido ribonucleico
DNA:	ácido desoxirribonucleico
cDNA:	DNA complementar
nM:	nanômetro
CT:	ciclo limiar (cycle threshold)
Δ:	delta
FTIR:	Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
ATR:	análise de reflectância de superfícies
PO₄:	fosfato
Col:	colágeno
cm⁻¹:	centímetro elevado a -1
MDO:	movimentação dentária ortodôntica

Dcstamp: proteína transmembrana específica de células dendríticas

Runx2: fator de transcrição relacionado a runt 2

OPN: osteopontina

DMP-1: proteína de matriz de dentina 1

eNOS: expressão endotelial do óxido nítrico sintase

BMP-2: proteína morfogenética óssea 2

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Passo a passo da colagem da mola de Ni-Ti no primeiro molar superior direito dos camundongos..... 56
- Figura 2.** Passo a passo da ancoragem da mola de Ni-Ti nos incisivos superiores dos camundongos..... 57
- Figura 3.** **Ilustração das análises de microCT.** A figura A representa um corte em plano sagital da maxila direita de um camundongo, contendo os três molares superiores direito. A linha vermelha ilustra a região em que é feita a mensuração da movimentação dentária ortodôntica. A figura B representa um corte em plano sagital da maxila de um camundongo, contendo as raízes do primeiro e segundos molares superiores direito. A área delimitada em vermelho representa a região em que foram realizadas as avaliações dos parâmetros ósseos alveolares..... 58
- Figura 4.** **Avaliação do impacto da deleção seletiva de AMPK em osteoclastos sobre os parâmetros ósseos alveolares.** Foram avaliados parâmetros ósseos do osso alveolar na região entre as raízes do primeiro molar superior esquerdo de camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{f/f}$ sem movimentação dentária ortodôntica. (A) Densidade mineral óssea. (B) Volume de tecido ósseo. (C) Porcentagem do volume ósseo trabecular sobre o tecido avaliado. (D) Espessura trabecular. (E) Número de trabéculas. (F) Espaço entre as trabéculas ósseas. * $p < 0,05$. (n=7)..... 66
- Figura 5.** **Avaliação do impacto da deleção seletiva de AMPK na composição do osso alveolar.** Foram analisadas a intensidade das bandas relacionadas ao estiramento assimétrico do grupo fosfato (PO_4) e amida I, indicadas pelas setas na figura, na maxila de camundongo $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{f/f}$ sem movimentação dentária ortodôntica. As bandas estão representadas pela imagem das análises por infravermelho. Posteriormente foi feita a razão da intensidade da banda de PO_4 dividida pela intensidade da banda de amida I..... 68
- Figura 6.** **Avaliação do impacto da deleção seletiva de AMPK na composição mineral e orgânica do fêmur.** Foram analisadas a intensidade das bandas relacionadas ao estiramento assimétrico do grupo fosfato (PO_4) e amida I no fêmur triturado de camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{f/f}$. Posteriormente foi feita a razão entre a intensidade da banda de fosfato e a amida I. * $p < 0,05$. (n= 2-4)..... 69

Figura 7. Quantificação da movimentação dentária ortodôntica. Foi mensurada a distância movimentada pelo primeiro molar superior direito em camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{ff}$ por meio de microtomografia computadorizada (A-C). Essa movimentação dentária é indicada pela subtração da distância entre o primeiro e o segundo molares superiores direitos pela distância entre esses mesmos dentes do lado esquerdo do mesmo animal. MDO: Movimentação dentária ortodôntica. * $p < 0,05$. (n=7)..... 70

Figura 8. Avaliação do impacto da deleção seletiva de AMPK em osteoclastos nos parâmetros ósseos alveolares durante a movimentação dentária ortodôntica. Foram avaliados parâmetros ósseos do osso alveolar na região entre as raízes do primeiro molar superior esquerdo de camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{ff}$ após 12 dias de movimentação dentária ortodôntica. (A) Densidade mineral óssea. (B) Volume de tecido ósseo. (C) Porcentagem do volume ósseo trabecular sobre o tecido avaliado. (D) Espessura trabecular. (E) Número de trabéculas. (F) Espaço entre as trabéculas ósseas. MDO: Movimentação dentária ortodôntica. * $p < 0,05$. (n=7)..... 71

Figura 9. Avaliação do impacto da deleção seletiva de AMPK na composição mineral e orgânica da maxila. Foram analisadas a intensidade das bandas relacionadas ao estiramento assimétrico do grupo fosfato (PO_4) e amida I na maxila triturada de camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{ff}$ após 12 dias de movimentação dentária ortodôntica. Posteriormente foi feita a razão entre a intensidade da banda de PO_4 dividida pela intensidade da banda de amida I. (n = 5 e 6)..... 73

Figura 10. Avaliação do impacto da deleção seletiva de AMPK na composição mineral e orgânica da maxila. Foram obtidas imagens a partir da microscopia eletrônica de varredura da maxila de camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{ff}$ após 12 dias de movimentação dentária ortodôntica, nos aumentos de 50 (A, D, G e J), 3000 (B, E, H e K) e 10000 (C, F, I e L) vezes de cada grupo experimental. O retângulo vermelho representa a região ampliada no maior aumento. As barras de escala correspondem a 200 μm no aumento de 50 vezes, 5 μm no aumento de 3000 vezes e 1 μm no aumento de 10000 vezes..... 74

- Figura 11. Quantificação de osteoclastos.** Foi quantificado o número de osteoclastos no osso alveolar mesial à raiz disto-vestibular do primeiro molar superior direito em camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{f/f}$ nas maxilas submetidas à reação enzimática TRAcP, após 12 dias de movimentação dentária. MDO: Movimentação dentária ortodôntica. * $p < 0,05$. (n=8-10)..... 75
- Figura 12. Avaliação da expressão gênica de marcadores de osteoclastos após 10 dias de aplicação da força de movimentação dentária ortodôntica.** O osso alveolar do lado direito (com mola) e esquerdo (sem mola) de camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{f/f}$ foram coletados após 10 dias de aplicação da força de movimentação dentária, esses ossos foram processados e submetidos ao ensaio de PCR em tempo real para avaliação de marcadores de osteoclastos. Os marcadores de osteoclastos avaliados foram o TRAP (A), Catepsina K (B), MMP9 (C), Dcstamp (D), RANKL (E) e Osteoprotegerina (F). MDO: Movimentação dentária ortodôntica. * $p < 0,05$. (n=8-12)..... 77
- Figura 13. Avaliação da expressão gênica de marcadores de osteoblastos após 10 dias de aplicação da força de movimentação dentária ortodôntica.** O osso alveolar do lado direito (com mola) e esquerdo (sem mola) de camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{f/f}$ foram coletados após 10 dias de aplicação da força de movimentação dentária, esses ossos foram processados e submetidos ao ensaio de PCR em tempo real para avaliação de marcadores de osteoblastos. Os marcadores de osteoblastos avaliados foram Runx2 (A) e Osteocalcina (B). MDO: Movimentação dentária ortodôntica. * $p < 0,05$. (n=8-12)..... 78
- Figura 14. Avaliação da expressão gênica de marcadores inflamatórios após 12 horas de movimentação dentária ortodôntica.** O osso alveolar do lado direito (com mola) e esquerdo (sem mola) de camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{f/f}$ foram coletados após 12 horas de movimentação dentária, esses ossos foram processados e submetidos ao ensaio de PCR em tempo real para avaliação de marcadores inflamatórios. Os marcadores pró-inflamatórios avaliados foram Fator de necrose tumoral alfa (A), Interleucina-1 β (B) e Interleucina-6 (C) e o marcador anti-inflamatório avaliado foi a Interleucina-10 (D). MDO: Movimentação dentária ortodôntica. * $p < 0,05$. (n=5-7)..... 80

- Figura 15. Avaliação da expressão gênica de marcadores inflamatórios após 72 horas de movimentação dentária ortodôntica.** O osso alveolar do lado direito (com mola) e esquerdo (sem mola) de camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{f/f}$ foram coletados após 72 horas de movimentação dentária, esses ossos foram processados e submetidos ao ensaio de PCR em tempo real para avaliação de marcadores inflamatórios. Os marcadores pró-inflamatórios avaliados foram Fator de necrose tumoral alfa (A), Interleucina-1 β (B) e Interleucina-6 (C) e o marcador anti-inflamatório avaliado foi a Interleucina-10 (D). MDO: Movimentação dentária ortodôntica. * $p < 0,05$. (n=3-8)..... 82
- Figura 16. Avaliação do impacto da deleção seletiva de AMPK em osteoblastos nos parâmetros ósseos alveolares.** Foram avaliados parâmetros ósseos do osso alveolar na região entre as raízes do primeiro molar superior esquerdo de camundongos $Col1a1^{Cre/0} AMPK^{f/f}$ tratados ou não com tamoxifeno sem movimentação dentária ortodôntica. (A) Densidade mineral óssea. (B) Volume de tecido ósseo. (C) Porcentagem do volume ósseo trabecular sobre o tecido avaliado. (D) Espessura trabecular. (E) Número de trabéculas. (F) Espaço entre as trabéculas ósseas. * $p < 0,05$. (n=3-4)..... 84
- Figura 17. Quantificação da movimentação dentária ortodôntica.** Foi mensurada a distância movimentada pelo primeiro molar superior direito em camundongos $Col1a1^{Cre/0} AMPK^{f/f}$ e $Col1a1^{Cre-ERT2/0} AMPK^{f/f}$ por meio de microtomografia computadorizada (A-C). Essa movimentação dentária é indicada pela subtração da distância entre o primeiro e o segundo molares superiores direitos pela distância entre esses mesmos dentes do lado esquerdo do mesmo animal. MDO: Movimentação dentária ortodôntica. * $p < 0,05$. (n=3-4)..... 85
- Figura 18. Avaliação do impacto da deleção seletiva de AMPK em osteoblastos nos parâmetros ósseos alveolares durante a movimentação dentária ortodôntica.** Foram avaliados parâmetros ósseos do osso alveolar na região entre as raízes do primeiro molar superior esquerdo de camundongos $Col1a1^{Cre/0} AMPK^{f/f}$ tratados ou não com tamoxifeno sem movimentação dentária ortodôntica. (A) Densidade mineral óssea. (B) Volume de tecido ósseo. (C) Porcentagem do volume ósseo trabecular sobre o tecido avaliado. (D) Espessura trabecular. (E) Número de trabéculas. (F) Espaço entre as trabéculas ósseas. * $p < 0,05$. (n=3-4)..... 87

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	39
2. OBJETIVOS	47
2.1 Objetivo Geral.....	49
2.2 Objetivos Específicos.....	49
3. MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1 Animais.....	53
3.2 Animais deficientes de AMPK em osteoclasto (animais $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{f/f}$).....	53
3.3 Animais deficientes de AMPK em osteoblastos (animais $Col1a1^{Cre/0} AMPK^{f/f}$).....	53
3.4 Genotipagem dos animais por PCR convencional	54
3.5 Protocolo de movimentação dentária ortodôntica.....	55
3.6 Análise de movimentação dentária e parâmetros ósseos alveolares por microtomografia computadorizada (micro-CT)	57
3.7 Quantificação de osteoclastos no osso alveolar mesial à raiz disto-vestibular.	59
3.8 Análise da expressão gênica de marcadores específicos pela técnica de PCR em tempo real.....	60
3.9 Avaliação da qualidade óssea utilizando Infravermelho, difração de raio x e microscopia eletrônica de varredura	61
3.10 Forma de análise dos resultados	61
4. RESULTADOS	63
4.1 Efeito da deleção de AMPK, especificamente em osteoclastos, sobre parâmetros da microarquitetura do osso alveolar	65
4.2 Efeito da deleção de AMPK, especificamente em osteoclastos, no processo de remodelação óssea induzido por movimentação dentária ortodôntica	69
4.3 Efeito da deleção de AMPK, especificamente em osteoclastos, na microarquitetura óssea alveolar durante processo de remodelação óssea induzido por movimentação dentária ortodôntica	70
4.4 Efeito da deleção de AMPK, especificamente em osteoclastos, no número de células TRAcP positivas durante processo de remodelação óssea induzido por movimentação dentária ortodôntica	74
4.5 Efeito da deleção seletiva de AMPK em osteoclastos, na expressão gênica de marcadores de osteoclastos e osteoblastos no osso alveolar após 10 dias de movimentação dentária ortodôntica	75

4.6 Efeito da deleção seletiva de AMPK em osteoclastos, na expressão gênica de marcadores inflamatórios no osso alveolar após 12 e 72 horas de movimentação dentária ortodôntica.....	79
4.7 Efeito da deleção de AMPK, especificamente em osteoblastos, no osso alveolar.....	83
4.8 Efeito da deleção de AMPK, especificamente em osteoblastos, no processo de remodelação óssea induzido por movimentação dentária ortodôntica	85
4.9 Efeito da deleção de AMPK, especificamente em osteoblastos, nos parâmetros ósseos alveolar durante processo de remodelação óssea induzido por movimentação dentária ortodôntica.....	85
5. DISCUSSÃO	89
6. CONCLUSÕES.....	97
REFERÊNCIAS	101
ANEXO.....	111

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um órgão dinâmico que passa por contínua adaptação para preservar sua integridade, homeostase, tamanho e forma (RAGGATT; PARTRIDGE, 2010). O processo de remodelação óssea é caracterizado pela reabsorção e aposição óssea, e o equilíbrio durante esse processo envolve interações entre osteoclastos e osteoblastos (LENER, 2012). Portanto, a atividade sincronizada desses 2 tipos celulares é responsável por assegurar a preservação do tecido (RAGGATT; PARTRIDGE, 2010).

O dinamismo ósseo é fortemente influenciado por uma série de mediadores tais como fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e hormônios (ROBLING; CASTILLO; TURNER, 2006; DATTA et al., 2008). Esses mediadores são responsáveis por controlar a proliferação, o recrutamento, a diferenciação, a atividade e a sobrevivência das células ósseas (KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006; ROBLING; CASTILLO; TURNER, 2006; DATTA et al., 2008). Além disso, o dinamismo ósseo pode ser alterado em diversas patologias, até mesmo na cavidade bucal, como na doença periodontal, lesão periapical por exemplo, onde há presença de infecção, com liberação dos diversos mediadores citados acima. O remodelamento ósseo ocorre também durante processos fisiológicos como durante a erupção dentária ou ainda durante a movimentação dentária ortodôntica.

A movimentação dentária ortodôntica induz um intenso remodelamento ósseo em ambiente estéril que decorre da transdução de um estímulo mecânico em resposta biológica, resultando na remodelação do tecido ósseo alveolar, onde o dente está inserido (KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006). Neste sentido, quando um estímulo mecânico é aplicado ao dente, inicia-se um processo inflamatório, que gera uma cascata de eventos físicos e biológicos no periodonto, que resulta na remodelação óssea e, por fim, na movimentação dentária (ISIK; SAYINSU; ARUN, 2005). É importante ressaltar que se formam áreas de tensão e outras de pressão no alvéolo do dente em movimento, onde a reabsorção óssea ocorre nas áreas de pressão e a deposição nas áreas de tensão. Assim, a unidade dentária é movimentada no sentido da força aplicada (ISIK; SAYINSU; ARUN, 2005).

Quando uma força é aplicada sobre o dente, e essa força se mantém, o fluxo sanguíneo nas áreas de compressão (compressão das fibras do ligamento periodontal) torna-se diminuído e nas áreas de tensão (estiramento das fibras do

ligamento periodontal) se mantém ou torna-se aumentado (LI et al., 2018). Essa mudança de fluxo sanguíneo gera uma mudança nas taxas de oxigênio e na composição química desse ambiente, o que leva à liberação de agentes biologicamente ativos tais como as citocinas (PARK et al., 2011; NIKLAS et al., 2013). Esses mediadores químicos, por sua vez, irão afetar as atividades celulares nessas áreas de compressão e tensão do ligamento periodontal, resultando em reabsorção e formação óssea, respectivamente (NIKLAS et al., 2013; LI et al., 2018).

Essa resposta inflamatória gerada pela alteração do fluxo sanguíneo e de oxigênio ocorre de forma asséptica, sem interferência de bactérias, e se dá devido à distorção que ocorre nas terminações nervosas do ligamento periodontal, liberando neurotransmissores vasoativos, como a substância P, as quais interagem com células endoteliais vasculares causando vasodilatação e aumento da permeabilidade desses vasos (WISE; KING, 2008; KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006). Ocorre então o recrutamento de células circulantes do sistema imunológico como os leucócitos, monócitos e macrófagos para o ligamento periodontal, estabelecendo-se assim o início de uma inflamação aguda. Essas células, uma vez recrutadas para o ligamento periodontal, irão desencadear a liberação de citocinas, prostaglandinas, fatores de crescimento e fatores estimuladores de colônias, tais como fator-alfa de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-10), fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), prostaglandinas, osteoprotegerina (OPG) e o ligante do receptor de ativação do fator nuclear kB (RANKL), que promoverão e controlarão a remodelação óssea. Essa resposta inflamatória aguda inicial, com o passar dos dias se transforma em uma resposta inflamatória crônica e proliferativa, com ação de fibroblastos, células endoteliais, osteoblastos e osteoclastos (KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006; REN; VISSINK, 2008).

A força de compressão sobre o ligamento periodontal está associada à elevação da Ciclooxygenase-2 (COX-2), uma enzima responsável por catalisar a produção de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. As prostaglandinas atuam nos osteoclastos, de forma a aumentar as concentrações intracelulares de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e potencializar sua atividade reabsortiva (KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006; HUANG; WILLIAMS; KYRKANIDES, 2014). As prostaglandinas estimulam também a diferenciação de osteoblastos que, juntamente com os linfócitos, por exemplo, liberam o M-CSF que induz o processo inicial de diferenciação dos osteoclastos. Assim, os monócitos provenientes da corrente

sanguínea se fundem dando origem aos osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea nas áreas de compressão (KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006). Desta forma, juntamente ao RANKL, o M-CSF promove a osteoclastogênese. O RANKL, sintetizado por osteoblastos e linfócitos, entre outras células, liga-se ao seu receptor, receptor de ativação do fator nuclear kB (RANK) situado nas membranas dos precursores de osteoclastos e induz a osteoclastogênese. Este processo envolve o agrupamento e a fusão de vários precursores dos osteoclastos e dá origem a um único osteoclasto multinucleado (TEITELBAUM; ROSS, 2003). Os osteoclastos recebem sinais estimulatórios ou inibitórios de osteoblastos vizinhos. Um destes sinais inibitórios é a OPG, sintetizada por osteoblastos e linfócitos, que age como receptor solúvel do RANKL, impedindo a ligação do RANKL ao RANK. Como consequência, o sinal pró-osteoclástico é interrompido e conseqüentemente há uma menor formação de osteoclastos (TAKAHASHI; UDAGAWA; SUDA, 1999).

Como descrito anteriormente, a resposta inflamatória gerada pela força aplicada sobre o dente desencadeia a liberação de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-1 β e IL-6 são capazes de induzir a diferenciação, função e sobrevivência dos osteoclastos e aumentar os níveis de metaloproteínases da matriz (MMP). Essas MMPs, juntamente com as catepsinas provocam alterações no ligamento periodontal e a matriz orgânica óssea, permitindo a fixação dos osteoclastos para que assim ocorra a reabsorção óssea (HENNEMAN; VON DEN HOFF; MALTHA, 2008).

Nas zonas de tensão ocorre uma proliferação de progenitores de osteoblastos no ligamento periodontal, o que desencadeará na prevalência de deposição de osso alveolar, com o aumento da atividade dos osteoblastos. Com a aplicação da força ortodôntica ocorre um aumento dos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 nas áreas de tensão, aumentando os níveis de OPG e reduzindo a produção de RANKL pelos osteoblastos. Dessa forma há uma redução geral na sinalização RANK - RANKL, favorecendo a deposição óssea através da inibição da formação, atividade e sobrevivência de osteoclastos (HUANG; WILLIAMS; KYRKANIDES, 2014). Nas áreas de tensão ocorre também um aumento da expressão de fator de crescimento transformador beta (TGF- β), o qual regula positivamente o gene do colágeno tipo 1 (COL-1), recruta precursores de osteoblastos, induz sua diferenciação, regula negativamente as MMPs e regula positivamente os inibidores teciduais de metaloproteínases (TIMPs) (GARLET et al., 2007; KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2009). As MMPs e seus inibidores atuam em

conjunto para regular a remodelação óssea, resultando em um aumento dos osteoblastos e a redução da atividade dos osteoclastos, com produção de osso e fibras do ligamento periodontal remodelado no lado oposto ao movimento dentário (HOWARD *et al.*, 1998; WISE; KING, 2008).

A diferenciação e ativação de osteoclastos e osteoblastos, células atuantes na remodelação óssea, demandam uma alta taxa de ATP (KIM *et al.*, 2007). Além do processo de reabsorção e aposição óssea, um estresse ambiental ou nutricional, situações de hipóxia ou toxinas podem desencadear uma desregulação energética intracelular (HARDIE *et al.*, 2012). Em todos esses casos, a proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) é ativada com o intuito de restaurar os níveis de adenosina trifosfato (ATP) no interior das células (HARDIE *et al.*, 2012).

A AMPK é um complexo de proteína quinase serina/treonina heterotrimérica, composta por três subunidades: alfa (α), beta (β) e gama (γ). A subunidade α é a catalítica, codificada por dois genes: $\alpha 1$ e $\alpha 2$, sendo $\alpha 1$ mais expressa em tecido ósseo (LEE *et al.*, 2010). A subunidade α combina-se com as subunidades reguladoras β e γ que são codificadas por dois ($\beta 1$ e $\beta 2$) e três ($\gamma 1$, $\gamma 2$ e $\gamma 3$) genes, respectivamente (KIM *et al.*, 2016). A proteína AMPK α possui um papel central na homeostase energética, atuando em diversos tipos celulares, em situações de déficit energético (tanto pela redução dos níveis de ATP como no aumento de adenosina monofosfato (AMP) coordenando uma ampla gama de processos, com o objetivo de inibir aqueles que consomem energia e estimulando os produtores de energia (HARDIE *et al.*, 2012).

A AMPK é expressa em níveis reduzidos durante a proliferação de pré-osteoblastos, entretanto, torna-se aumentada durante sua diferenciação (WANG *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2012). A literatura tem se mostrado controversa e inconclusiva com relação ao papel da AMPK em osteoblastos, demonstrando que essa proteína pode estimular (SHAH *et al.*, 2010; KANAZAWA *et al.*, 2008; KANAZAWA *et al.*, 2009) ou inibir a diferenciação de osteoblastos (KASAI *et al.*, 2009; SHAH *et al.*, 2010). Alguns estudos demonstram que a ativação de AMPK é aumentada durante a diferenciação de osteoblastos e essa indução é essencial para a formação óssea, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SHAH *et al.*, 2010; KANAZAWA *et al.*, 2008; KANAZAWA *et al.*, 2009), sendo demonstrado que animais deficientes para AMPK apresentam menor massa óssea, bem como, após ovariectomia, sua recuperação óssea é menor (JEYABALAN *et al.*, 2012). Estudos realizados *in vitro*, demonstraram

que células provenientes de animais deficientes para AMPK apresentaram menor osteogênese (PANTOVIC *et al.*, 2013).

Em contrapartida, outros autores afirmam que a diferenciação de osteoblastos está associada a um decréscimo na atividade de AMPK (SHAH *et al.*, 2010). Essa proteína parece inibir a proteína quinase B, também conhecida como AKT, um conhecido estimulante de diferenciação de osteoblastos (FUJITA *et al.*, 2004).

Em relação aos osteoclastos, sabe-se que a AMPK, bem como o receptor alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR), são responsáveis pelos principais fatores de sinalização que influenciam a formação e diferenciação de osteoclastos (GLANTSCHNIG *et al.*, 2003; TIEDEMANN *et al.*, 2017). Entretanto, a função precisa e os mecanismos de ação da AMPK nessas células ainda não é totalmente clara (LEE *et al.*, 2010). Estudos prévios mostraram que a AMPK regula negativamente a osteoclastogênese (LEE *et al.*, 2010; OH *et al.*, 2016). Por meio de estudo *in vitro* demonstrou-se que a ativação de AMPK promoveu a formação óssea e a inibição das subunidades α e β reduziram a massa óssea em camundongos (JEYABALAN *et al.*, 2012). Por outro lado, um estudo *in vitro* afirma que a inibição de AMPK leva a uma menor osteoclastogênese (WANG *et al.*, 2016), sendo, dessa forma, também contraditória a relação entre AMPK e a atividade de osteoclastos.

Além de contraditório o papel da AMPK em osteoclastos e osteoblastos durante o processo de reabsorção e formação óssea, as vias de atuação dessa proteína nas células ósseas não são bem elucidadas. Somado a isso, os trabalhos publicados até o momento avaliam o papel de AMPK em osteoblastos e osteoclastos individualmente. Desta forma, torna-se essencial a condução de um estudo que avalie a atividade, bem como os meios de atuação da AMPK, especificamente em osteoblastos e osteoclastos, durante o processo de remodelação óssea onde ocorre a ativação dos 2 tipos celulares.

A utilização de um modelo que emprega a movimentação dentária permitirá não somente avaliar a ação de osteoblastos e osteoclastos simultaneamente, mas também a influência que uma célula exerce sobre a outra durante a remodelação óssea ao deletar seletivamente AMPK em um ou outro tipo celular. Desta forma, a presente tese permitiu avaliar a influência da AMPK, ao deletarmos essa proteína em osteoclastos e em osteoblastos de forma independente enquanto desempenham suas funções no dinamismo do tecido ósseo.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o papel da deleção de AMPK, especificamente em osteoclastos e osteoblastos, durante a remodelação óssea alveolar *in vivo*.

2.2 Objetivos Específicos

- a) **Avaliar o papel da deleção de AMPK sobre o osso alveolar**, por meio de análises de parâmetros ósseos utilizando a MicroCT.
- b) **Avaliar o papel da AMPK na remodelação óssea induzida pela movimentação dentária ortodôntica**, por meio de análises de parâmetros ósseos como a mensuração da distância entre o primeiro e o segundo molares superiores, utilizando a MicroCT.
- c) **Determinar se a deleção de AMPK em osteoclastos interfere na osteoclastogênese**, para isso foram avaliados o número de células TRAP positivas na região de compressão da movimentação dentária ortodôntica. Foram avaliados também importantes marcadores da atividade de remodelação óssea pelas técnicas de qPCR.
- d) **Avaliar se a deleção de AMPK em osteoclastos interfere na qualidade óssea**, para isso foram avaliadas a matriz mineral e orgânica de maxila e fêmur utilizando as técnicas de Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), acoplado a um acessório de análise de reflectância de superfícies (ATR), Difração de Raios-X e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo sob o protocolo número 19.1.782.60.2. Para realização desse projeto de doutorado foi utilizado o sistema de animais Cre-loxP, o qual possibilita a deleção de uma proteína especificamente em um tipo celular. O sistema de recombinação Cre-lox consiste em dois elementos: a enzima recombinase Cre e os sítios lox. A enzima Cre pode recombinar as sequências do sítio lox, detectando-as e cortando-as especificamente, e os efeitos funcionais desta enzima como deleção, inversão ou translocação cromossômica são dependentes da direção e posição dos locais lox (PENG *et al.*, 2014). No presente estudo o efeito da enzima Cre foi de deleção em AMPK, subunidade $\alpha 1$ ($AMPK^{ff}$). Esses camundongos *AMPK-flox*, foram adquiridos no *Jackson Lab* (stock no: 014141, Bar Harbor, Maine, EUA).

3.2 Animais deficientes de AMPK em osteoclasto (animais $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{ff}$)

Para que essa deleção seja realizada em um tipo celular específico, deve-se selecionar uma região promotora suficientemente ativa para excluir completamente o gene alvo, mas apenas no tecido de interesse (CHIU *et al.*, 2004). Dentre as regiões promotoras em osteoclastos, o promotor de Catepsina K (*ctsk*) é o mais compatível com a expressão de Cre especificamente em osteoclastos, sendo então gerado a linha transgênica Catepsina K-Cre ($Ctsk^{Cre}$). Esses camundongos $Ctsk^{Cre}$ foram gentilmente cedidos pelo Dr. Shigeaki Kato (University of Tokyo, Japão). Os animais com deleção seletiva de *AMPK* nos osteoclastos ($Ctsk^{Cre/0} AMPK^{ff}$) foram gerados a partir do cruzamento de animais *Ctsk-Cre* com *AMPK-flox*. E para o grupo controle foram utilizados camundongos $Ctsk^{Cre/0}$.

3.3 Animais deficientes de AMPK em osteoblastos (animais $Col1a1^{Cre/0} AMPK^{ff}$)

Em osteoblastos, o promotor mais compatível é o Colágeno tipo 1 subunidade $\alpha 1$ (*col1a1*), sendo então gerada a linha transgênica Colágeno1a1 – Cre ($Col1a1^{Cre}$). Esses camundongos transgênicos foram obtidos do *Jackson Lab* (stock no: 016241, Bar Harbor, Maine, EUA), eles expressam uma recombinase Cre

induzível por Tamoxifeno® conduzida pelo promotor *Col1a1*. A inserção do transgene contém um produto de fusão envolvendo a recombinase Cre e uma forma mutante do domínio de ligação do ligante do receptor de estrogênio de camundongo. O receptor de estrogênio de camundongo mutante não se liga ao ligante natural em concentrações fisiológicas, mas se liga ao ligante sintético, 4-hidroxitamoxifeno. A proteína Cre/*Esr1* fica restrita ao citoplasma, mas quando exposta ao tamoxifeno, ela pode ter acesso ao compartimento nuclear das células, permitindo assim a realização da deleção da sequência de interesse flanqueada pelo sítio loxP. A administração de tamoxifeno induz a recombinação Cre nos osteoblastos da maioria dos ossos e nos odontoblastos dos dentes em camundongos embrionários e pós-natais. Os animais com deleção seletiva de *AMPK* nos osteoblastos (*Col1a1*^{Cre-ERT2/0} *AMPK*^{ff}) foram gerados a partir do cruzamento de animais *Col1a1*-Cre com *AMPK*-flox. Como controle também foram utilizados camundongos *Col1a1*^{Cre/0} *AMPK*^{ff}, porém não foi realizada a aplicação de tamoxifeno neste grupo.

Os camundongos machos foram submetidos ao protocolo experimental quando atingiram idade entre 6 e 8 semanas e peso médio entre 20 e 25g, de modo que já haviam atingido a maturidade sexual e peso corporal ideal, o qual foi monitorado durante todo o período experimental. O acondicionamento destes animais foi realizado no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em mini-isoladores, forrados com maravalha e organizados em estantes ventiladas com sistemas independentes de insuflamento e exaustão de ar. A alimentação foi composta de ração pastosa e água, os animais foram mantidos em local com ciclo de 12 horas claro/escuro. Como critério de exclusão, avaliamos: presença de irritações ou inflamações na cavidade oral, não permanência do aparelho nos elementos dentários até o final do experimento e perda de peso superior a 20%.

3.4 Genotipagem dos animais por PCR convencional

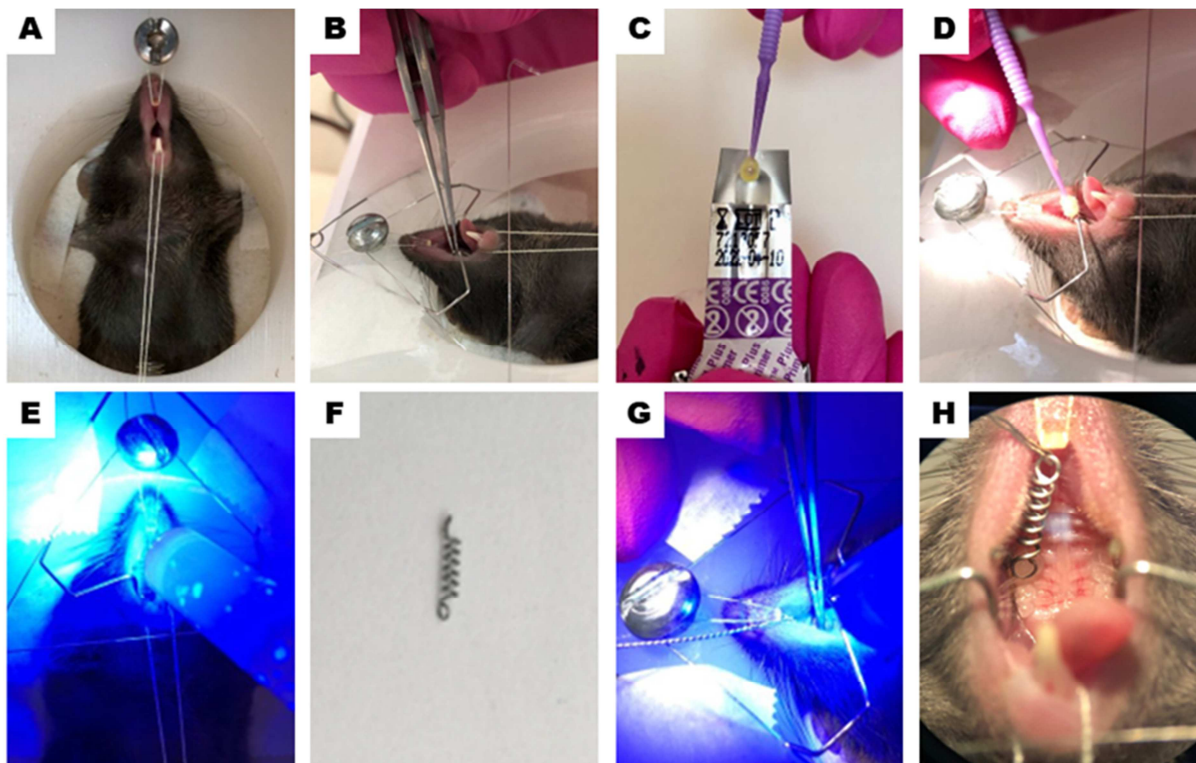
Uma amostra de ácido desoxirribonucléico (DNA) da orelha de cada animal foi coletada para realização da extração de DNA. Essa extração de DNA foi realizada primeiramente adicionando 75 µl de tampão (NaOH 25 mM e EDTA 0,2 mM) em cada amostra e posteriormente sendo levadas ao termociclador a 98°C por 1 hora. Em seguida, o DNA extraído foi quantificado no aparelho nanofotômetro (NanoPhotometer® P360, Implén, Inc., Califórnia, EUA) e 20 ng total de DNA de

cada amostra foram utilizados para a reação de PCR. Para esta reação foram utilizados os primers específicos para análise da enzima do Cre genérico e *AMPK*, juntamente com o Amplitaq Gold 360 Master MIX (#4398881- Applied biosystemsTM, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EUA). As amostras de DNA juntamente com o padrão molecular, um controle positivo e um negativo foram aplicadas em gel de agarose na concentração de 1,5%, esse gel foi colocado em cuba de eletroforese a 100V por 50 minutos. Após a corrida o gel foi revelado em câmara escura com luz ultravioleta e o genótipo de cada camundongo foi estabelecido, sendo selecionados aqueles de interesse previamente ao uso.

3.5 Protocolo de movimentação dentária ortodôntica

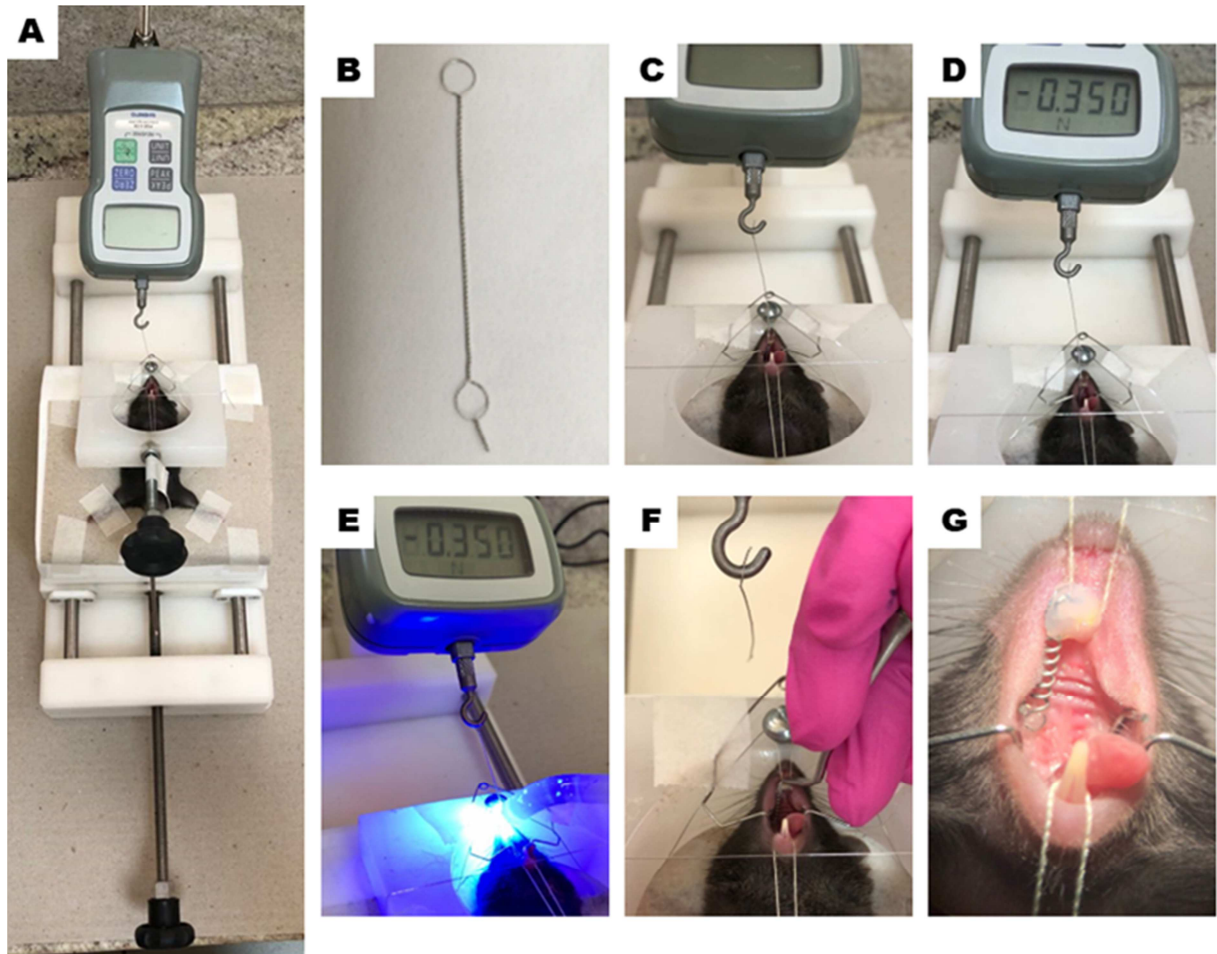
O protocolo referente à indução da movimentação ortodôntica foi realizado conforme previamente descrito (ANDRADE Jr *et al.*, 2007) com modificações (TADDEI *et al.*, 2012). Os camundongos foram anestesiados pela injeção intraperitoneal de uma solução de cloridrato de Cetamina (Ketamina 10%, Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A. Embu-Guaçu, SP) na dosagem de 100 mg/Kg de peso, e cloridrato de Xilazina (Anasedan[®] 2%, Ceva Santé Animale S/A. Paulínea, SP), na dosagem de 10 mg/Kg de peso preparada em soro fisiológico. Os animais foram posicionados em uma mesa cirúrgica especialmente desenhada para restringir movimentos do camundongo e permitir o acesso intra-bucal (Figura 1A). Para melhor visualização da cavidade bucal, foi colocado um abridor de boca confeccionado especialmente para isso e utilizado um estereomicroscópio (Stemi 2000-C; Zeiss, Jena, Alemanha) e uma iluminação com fibra óptica (CL 1500 ECO, Zeiss, Jena, Alemanha). Após posicionados, os incisivos superiores e a face oclusal do primeiro molar superior do lado direito dos camundongos foi limpa com uma bolinha de algodão embebida em acetona por 10 segundos (Figura 1B) e foi aplicado um adesivo autocondicionante (self-etching primer, Unitek, 3M, Mineapolis, USA) com o auxílio de um microbrush (Figura 1C), posteriormente esse adesivo foi fotoativado utilizando um fotoativador (Figura 1D). Uma mola ortodôntica aberta de Níquel-Titânio (Ni-Ti) com dimensões de 0,25 x 0,76 mm (Lancer Orthodontics, San Marcos, CA, USA) (Figura 1E), foi fixada com resina fotopolimerizável (Transbond, Unitek/3M, St. Paul, MN) na superfície oclusal do primeiro molar superior direito, de modo que a cúspide distal do dente pudesse permanecer visível, sem a mola encobrindo-a (Figura 1F-G).

Figura 1. Passo a passo da colagem da mola de Ni-Ti no primeiro molar superior direito dos camundongos.



Posteriormente a porção anterior/mesial da mola foi ativada no sentido mesial e fixada com a mesma resina nos incisivos centrais superiores. A mola não foi reativada durante o período experimental. Para a calibração da força foi utilizado um tensiômetro (Shimpo Corp., Tokyo, Japan), fixado sobre uma plataforma. Esta plataforma é composta de um trilho sob o qual desliza a mesa cirúrgica (Figura 2A). Um fio de 0,8 mm de espessura e 4 cm de comprimento (Morelli Ortodontia, Sorocaba, SP, Brasil) (Figura 2B) foi utilizado para conectar a extremidade mesial/anterior da mola ao gancho do tensiômetro (Figura 2C). Para a ativação da mola, a manivela da plataforma foi girada movimentando assim a mesa cirúrgica para trás até registrar no tensiômetro a força ortodôntica 0,35N (TADDEI *et al.*, 2012) (Figura 2D). Uma vez atingida a força, a mola foi fixada nos incisivos (Figura 2E-G).

Figura 2. Passo a passo da ancoragem da mola de Ni-Ti nos incisivos superiores dos camundongos.



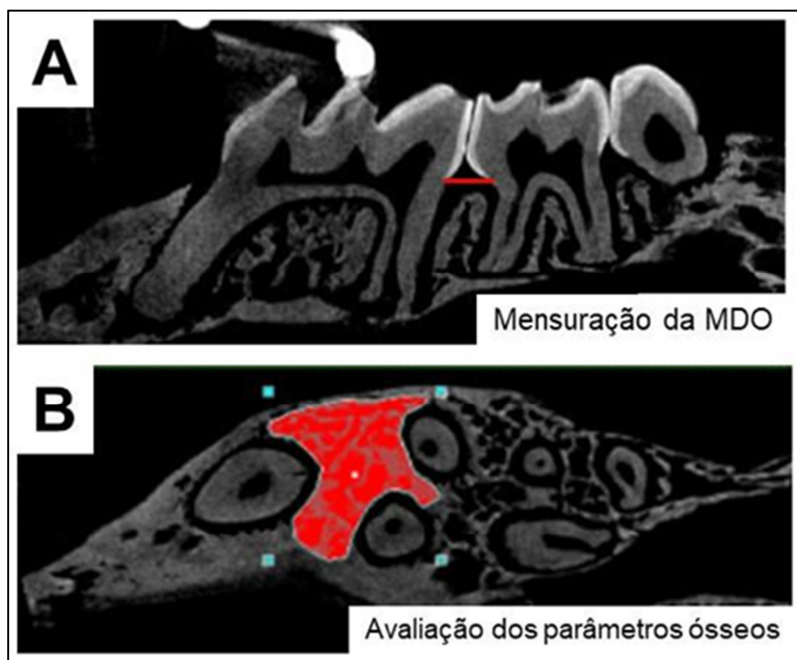
3.6 Análise de movimentação dentária e parâmetros ósseos alveolares por microtomografia computadorizada (micro-CT)

Para avaliação quantitativa da movimentação dentária ortodôntica e tridimensional dos parâmetros ósseos dos ossos alveolares, as maxilas foram dissecadas após 12 dias de ativação da mola e fixadas em formol tamponado a 10 % com a finalidade de minimizar a decomposição do tecido até que fosse realizada a análise. Em seguida, as amostras foram escaneadas utilizando o aparelho de microtomografia computadorizada Micro-CT Sky Scan 1272 (Bruker Corporation, Billerica, EUA), com o tamanho de *voxel* de 7,4 μm , 70 kV, filtro de alumínio de 0,5 mm e 0,4^o de rotação de ângulo. Para visualização, as imagens de projeção tridimensional (3D) foram reconstruídas utilizando o software NRecon (versão 1.7.4.6; Skyscan; Bruker Corporation, Billerica, EUA). As mensurações da movimentação dentária e dos padrões ósseos foram realizadas utilizando o programa de imagem CTAn (Bruker microCT). Para mensuração da movimentação

ortodôntica foram utilizados 6 cortes no plano sagital de um segmento de 1 mm contendo as raízes mesial e distal do 1º e 2º molares, essa medida foi realizada em linha reta entre as junções amelo-cementária do primeiro e segundo molares, na maxila direita e esquerda (Figura 3 A). A partir da média da distância entre a junção amelo-cementária do primeiro e segundo molares dos lados direito e esquerdo obtivemos a distância movimentada pelo dente realizando a subtração da medida do lado direito em relação ao esquerdo do mesmo animal.

Para análise dos parâmetros ósseos alveolares foram utilizados cortes no plano transaxial, de 1mm (40 secções), na região alveolar entre as raízes do primeiro molar superior (Figura 3B). Os parâmetros ósseos avaliados foram densidade mineral óssea (g/cm^3), volume ósseo (mm^3), fração de volume ósseo trabecular (%), espessura trabecular (μm), número de trabéculas e espaço entre as trabéculas (μm). A calibração foi dada a partir de um *phantom* com densidade de hidroxiapatita já conhecida (Skyscan, Aartselaar, Belgium).

Figura 3. Ilustração das análises de microCT. A figura A representa um corte em plano sagital da maxila direita de um camundongo, contendo os três molares superiores direito. A linha vermelha ilustra a região em que é feita a mensuração da movimentação dentária ortodôntica. A figura B representa um corte em plano sagital da maxila de um camundongo, contendo as raízes do primeiro e segundos molares superiores direito. A área delimitada em vermelho representa a região em que foram realizadas as avaliações dos parâmetros ósseos alveolares.



3.7 Quantificação de osteoclastos no osso alveolar mesial à raiz disto-vestibular.

Após o período experimental de 12 dias, as maxilas foram removidas e imersas em solução de formol tamponado a 10% por 48 horas em temperatura ambiente para a fixação. Posteriormente foram lavadas em PBS e desmineralizadas em solução de EDTA a 10% (pH 7.4) por aproximadamente 30 dias. Sequencialmente, as amostras foram desidratadas em ordem crescente de álcoois (Synth[®]) 70 %, 80 %, 95 % e 100 % e diafanizadas em xilol (Synth[®]). Os tecidos foram imersos em parafina fundida (56 a 60°C), e incluídos em blocos de parafina utilizando uma central de inclusão (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Para preparar as maxilas para inclusão nos blocos de parafina inicialmente foi removida e descartada a porção anterior da maxila, contendo os incisivos, utilizando-se uma lâmina de aço. Um segundo corte foi realizado a 1mm da superfície palatina da coroa dos molares, paralelo a uma linha imaginária traçada sobre a superfície oclusal dos molares. O mesmo protocolo foi realizado do lado da movimentação ortodôntica e do lado contralateral.

Os fragmentos de maxila foram incluídos com a superfície palatina voltada para o lado da microtomia, a ser realizada por um micrótomo rotatório (Leica RM2145; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha). Lâminas de cortes semi-seriados de 5 µm foram obtidas em toda a extensão da amostra que incluísse as raízes mesial e distal do primeiro e segundo molares.

Para quantificação dos osteoclastos, os cortes de maxila foram submetidos à reação de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e contra-coradas com Hematoxilina. Os osteoclastos, os quais apresentaram coloração avermelhada (células TRAP-positivas) foram quantificados na superfície da lâmina dura do osso alveolar na face voltada para o ligamento periodontal na região mesial da raiz disto-vestibular do primeiro molar por meio de microscópio óptico (Nikon eclipse E200, Tóquio, Japão). Cortes representativos de TRAP foram fotografados com câmera AxioCam MRc5 acoplada ao microscópio Axio Imager.M1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha).

3.8 Análise da expressão gênica de marcadores específicos pela técnica de PCR em tempo real

A análise por PCR em tempo real foi utilizada para quantificar quimiocinas, marcadores de osteoclastos, marcadores de osteoblastos e reguladores negativos de reabsorção óssea. Usando um estereomicroscópio, o ligamento periodontal e o osso alveolar circundante foram extraídos dos primeiros molares superiores. As amostras foram submetidas à extração de ácido ribonucléico (RNA) total usando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) conforme instruções do fabricante.

Alíquotas de cada amostra foram diluídas em água para a quantificação do RNA. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 2 µg de RNA através de uma reação de transcriptase reversa. A análise quantitativa da expressão de RNA mensageiro foi realizada através do ABI Prism 5700 Sequence Detection System utilizando o sistema de fluorescência SYBR-green (Applied Biosystems, Warrington, UK) para a quantificação dos produtos de amplificação. As condições de reação de PCR foram: 95°C (10 minutos), seguidas por 40 ciclos de 94°C (1 minuto), 65°C (1 minuto) e 72°C (2 minutos), seguidas por uma curva padrão de desnaturação.

As condições de reação de PCR para cada gene de interesse foram otimizadas com relação à concentração de primers, ausência da formação de dímeros e eficiência da amplificação do gene alvo. SYBR Green PCR Master Mix, 400 nM dos primers específicos e 2,5 ng de cDNA foram utilizados em cada reação. O limiar para a determinação da positividade da reação de Real-Time-PCR foi determinado baseado em controles negativos (ausência de SYBR-green, ausência de amostra, ausência de primer e amostra contendo apenas água). Para alguns genes utilizamos o TaqMan Master Mix (Thermo Fisher, Scientific Waltham, Massachusetts, EUA). O cálculo para determinação do nível relativo de expressão do gene de interesse foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, utilizando como referência a expressão de β -actina na mesma amostra, utilizando-se do método do "ciclo limiar" (cycle threshold – Ct). A média dos valores de Ct obtidas de duplicatas foi utilizada para o cálculo do nível de expressão gênica, normalizado pela β -actina e comparado aos valores do gene alvo de uma amostra controle para o cálculo do aumento relativo de expressão, através da fórmula $2^{-\Delta Ct}$.

3.9 Avaliação da qualidade óssea utilizando Infravermelho, difração de raio x e microscopia eletrônica de varredura

Fragmentos do fêmur e do osso alveolar da maxila dos camundongos submetidos à movimentação dentária ortodôntica por 12 dias foram submetidos à desidratação em uma dessecadora à vácuo contendo sílica em gel. Posteriormente esses ossos foram triturados na forma de pó para realização das análises de Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), acoplado a um acessório de análise de reflectância de superfícies (ATR). Utilizando-se ATR-FTIR foi possível acompanhar a razão de intensidade entre a banda em 1650 cm^{-1} , relacionada a matriz orgânica de amida I, e a banda em 1090 cm^{-1} , relacionada ao estiramento assimétrico do grupo fosfato (PO_4). Esses dados mostram a proporção de material mineralizado e material orgânico em cada amostra. Nas amostras de fêmur triturado (em forma de pó) também foram obtidos padrões de difração de Raios-X. Estes padrões foram comparados com padrões para apatitas a partir de bancos de dados cristalográficos. O tamanho de cristalitos foi analisado quantitativamente utilizando-se a equação de Sherrer, que leva em consideração a largura a meia altura do pico de difração em $2\text{-teta}=26,8$, para hidroxiapatita.

De forma a corroborar os dados, as maxilas dos camundongos submetidos à movimentação dentária ortodôntica por 12 dias foram fixadas adequadamente sobre porta-amostras de alumínio com o auxílio de fita dupla-face condutora à base de carbono (Ted Pella Inc.), recobertas com carbono e, sequencialmente, com ouro em um sistema Bal-Tec mod. SCD 050 Sputter Coater (Fürstentum Liechtenstein) por um período de tempo de 200 segundos. A análise morfológica das amostras foi realizada em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) Shimadzu mod. SS-550 (Kyoto Japan). O feixe de elétrons do MEV foi acelerado por voltagem de 20 kV e um detector Everhart-Thornley foi usado para atrair os elétrons secundários provenientes das amostras.

3.10 Forma de análise dos resultados

Os dados foram, primeiramente, avaliados quanto à sua distribuição utilizando o teste de Shapiro-Wilk, no programa GraphPad Software 8.0 (GraphPad Prism; GraphPad Software, San Diego). Para dados cuja distribuição apresentou-se como normal, utilizamos o teste “t” de Student a fim de comparar dois grupos e o

teste de variância de um critério (One-Way ANOVA) para comparar mais de dois grupos. Em caso de distribuição não paramétrica foram utilizados os testes de Mann-Whitney e Kruskal Wallis conforme o número de grupos a serem comparados. Em seguida, pós testes foram realizados conforme a necessidade. As diferenças das médias ou medianas foram consideradas significativas para valores de $P < 0,05$.

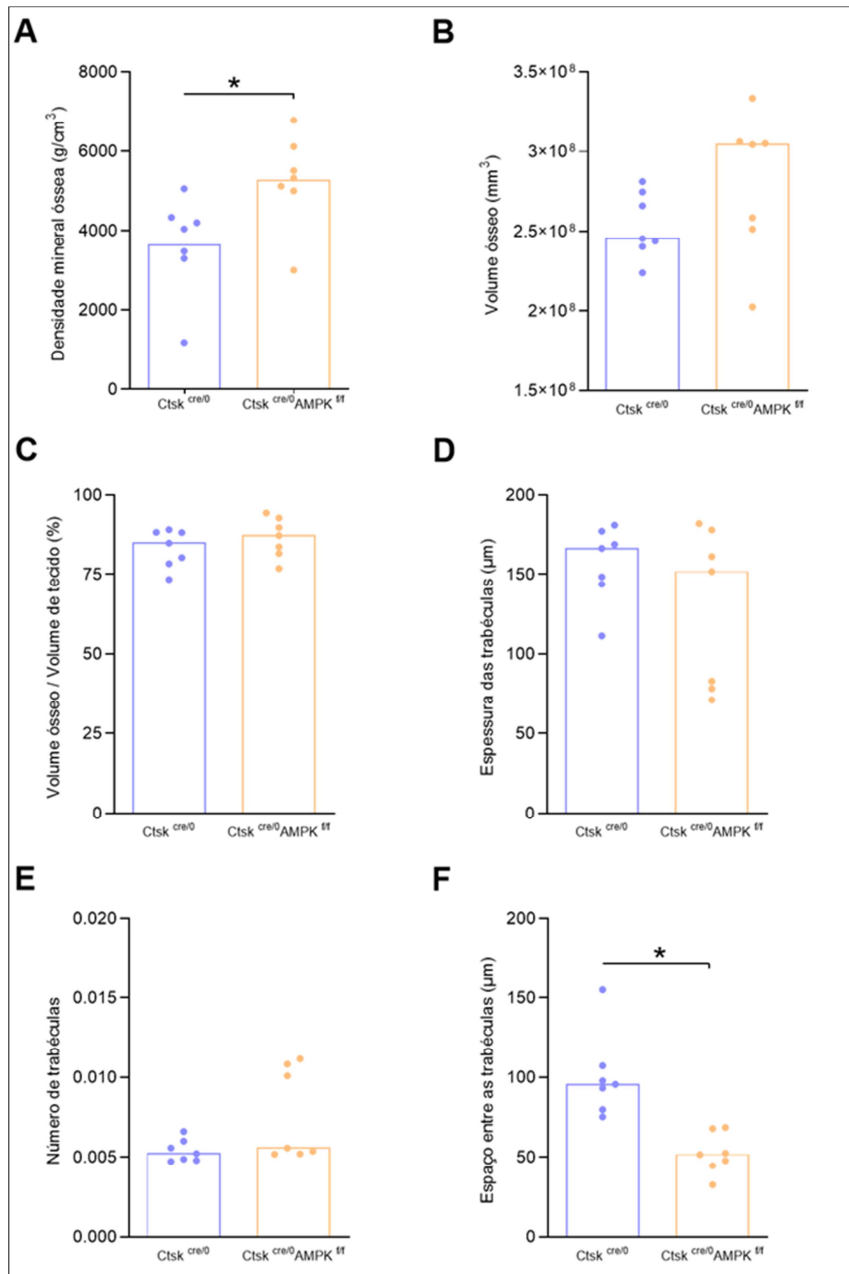
4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Efeito da deleção de AMPK, especificamente em osteoclastos, sobre parâmetros da microarquitetura do osso alveolar

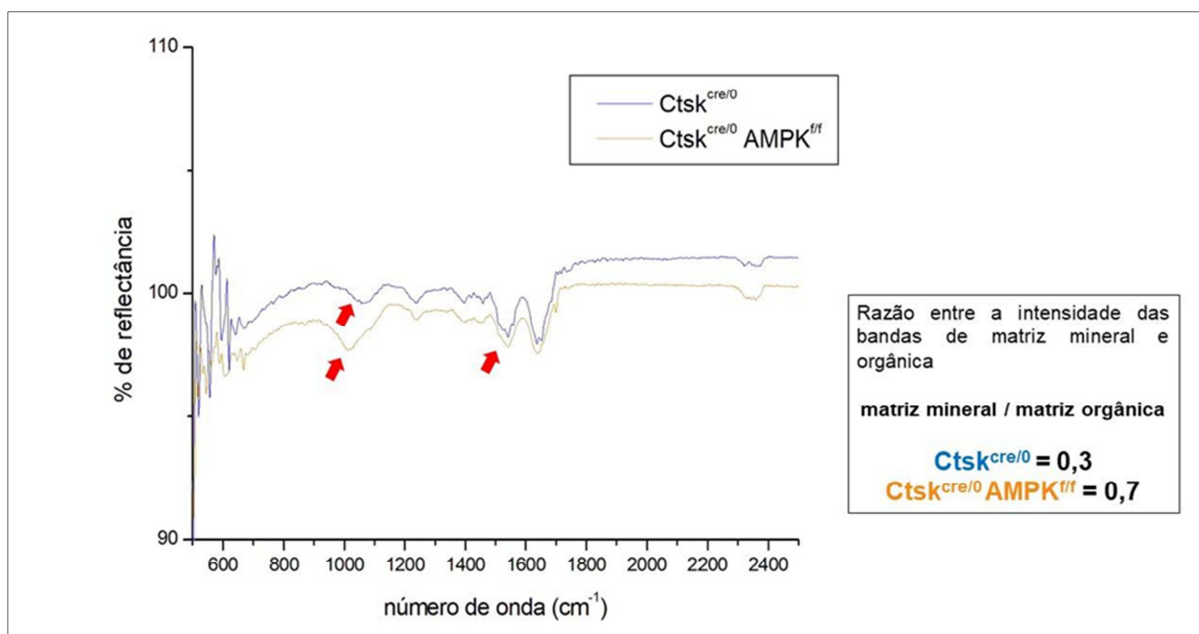
Dados da literatura mostram um papel protetor de AMPK na manutenção da integridade de ossos longos, visto que a deleção dessa proteína em osteoclastos gera uma piora nos parâmetros ósseos avaliados por microCT em fêmures, bem como um aumento de células TRAcP positivas (AHN et al., 2008; JEYABALAN et al., 2012; Kang et al., 2013). Estudos in vitro mostram que há um maior número de osteoclastos diferenciados, bem como um maior tamanho dessas células em cultura de células da medula de camundongos knockout seletivo de AMPK em monócitos (LEE et al., 2010; KANG et al., 2013; PARK et al., 2020). No presente trabalho, avaliamos os efeitos da deleção seletiva de AMPK em osteoclastos sobre os parâmetros da microarquitetura do osso alveolar de camundongos. Selecionamos a região entre as raízes do primeiro molar superior esquerdo do osso alveolar para esse estudo. Na análise de MicroCT, observamos que animais deficientes de AMPK apresentaram um aumento significativo da densidade mineral óssea (Figura 4A), um relativo aumento no volume de tecido ósseo (Figura 4B) e uma significativa redução no espaço entre as trabéculas ósseas (Figura 4F) quando comparados ao controle. Em contrapartida, a análise de outros parâmetros como porcentagem de volume ósseo em relação ao volume de tecido (Figura 4C), na espessura (Figura 4D) e número (Figura 4E) das trabéculas ósseas, não observamos diferenças estatisticamente significantes. Em conjunto, diferentemente do que foi encontrado em ossos longos, nossos resultados mostram que a deficiência de AMPK em osteoclastos melhora os parâmetros ósseos alveolares avaliados por microCT.

Figura 4. Avaliação do impacto da deleção seletiva de AMPK em osteoclastos sobre os parâmetros ósseos alveolares. Foram avaliados parâmetros ósseos do osso alveolar na região entre as raízes do primeiro molar superior esquerdo de camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{fl/fl}$ sem movimentação dentária ortodôntica. (A) Densidade mineral óssea. (B) Volume de tecido ósseo. (C) Porcentagem do volume ósseo trabecular sobre o tecido avaliado. (D) Espessura trabecular. (E) Número de trabéculas. (F) Espaço entre as trabéculas ósseas. * $p < 0,05$. (n=7).



Para aprofundar no estudo do papel da deleção do AMPK sobre a qualidade óssea, de maneira semi-quantitativa utilizando ATR-FTIR, analisamos ainda a relação entre as quantidades de componentes orgânicos, relacionados à matriz colágena, e minerais, relacionados à presença de fosfatos, no osso alveolar. Para isso, utilizamos a razão entre a intensidade das bandas relacionadas a estes grupos, conforme descrito na parte experimental. Para esta análise coletamos o osso alveolar circundante ao primeiro molar, após exodontia do mesmo, e o trituramos. Utilizamos o osso de camundongos que não foram submetidos ao modelo de MDO. Nossos dados mostram que a razão entre a intensidade das bandas de PO_4 e orgânica (mineral/orgânica) é maior na maxila de camundongo com deleção seletiva de AMPK quando comparado ao controle. Esses dados indicam que a maxila do animal deficiente de AMPK em osteoclastos apresenta uma maior quantidade de matéria mineralizada ou uma menor quantidade de matéria orgânica, ou uma combinação dos dois fatores, quando comparado à maxila do camundongo controle (Figura 5). Esses dados em conjunto com os dados da microCT sugerem que a deleção de AMPK leva a uma maior densidade mineral no osso alveolar.

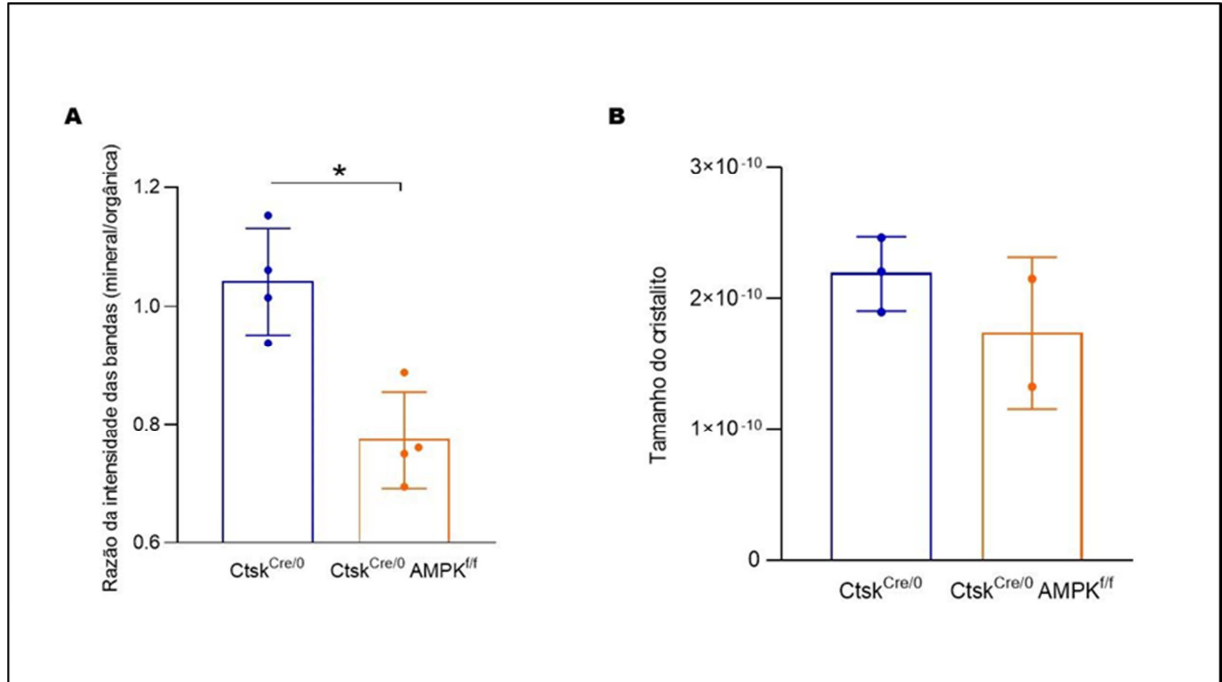
Figura 5. Avaliação do impacto da deleção seletiva de AMPK na composição do osso alveolar. Foram analisadas a intensidade das bandas relacionadas ao estiramento assimétrico do grupo fosfato (PO_4) e amida I, indicadas pelas setas na figura, na maxila de camundongo $\text{Ctsk}^{\text{Cre/0}}$ e $\text{Ctsk}^{\text{Cre/0}} \text{AMPK}^{\text{f/f}}$ sem movimentação dentária ortodôntica. As bandas estão representadas pela imagem das análises por infravermelho. Posteriormente foi feita a razão da intensidade da banda de PO_4 dividida pela intensidade da banda de amida I.



Visto que a literatura descreve que a AMPK apresenta um papel ósseo protetor em ossos longos e nossos dados em maxila apontaram um efeito contrário, avaliamos essa relação entre a quantidade de matriz mineral e orgânica no fêmur, também triturado, por meio das análises por infravermelho. Interessantemente, nossos dados mostram que no fêmur, ocorre uma redução significativa da razão entre a intensidade da banda do fosfato e da amida I (mineral / orgânica) (Figura 6A) nos camundongos deficientes de AMPK quando comparado aos controles, sugerindo que, no fêmur, a deleção de AMPK em osteoclastos está associada a uma menor quantidade de matéria mineralizada e/ou uma maior quantidade de matéria orgânica, diferentemente do que observamos na maxila.

No próximo experimento avaliamos se a deleção de AMPK interfere na cristalinidade e tamanho de cristalitos de hidroxiapatita presente no fêmur. Mensuramos o tamanho dos cristalitos de hidroxiapatita, utilizando a difração de raios x, e identificamos uma relativa redução no tamanho desses cristalitos no fêmur de camundongos $\text{Ctsk}^{\text{Cre/0}} \text{AMPK}^{\text{f/f}}$ comparado aos $\text{Ctsk}^{\text{Cre/0}}$ (Figura 6B). Até o momento, nossos dados sugerem que a ausência de AMPK em osteoclastos altera a qualidade dos ossos e, aparentemente, essa alteração ocorre de forma diferente no osso alveolar e no osso longo (fêmur).

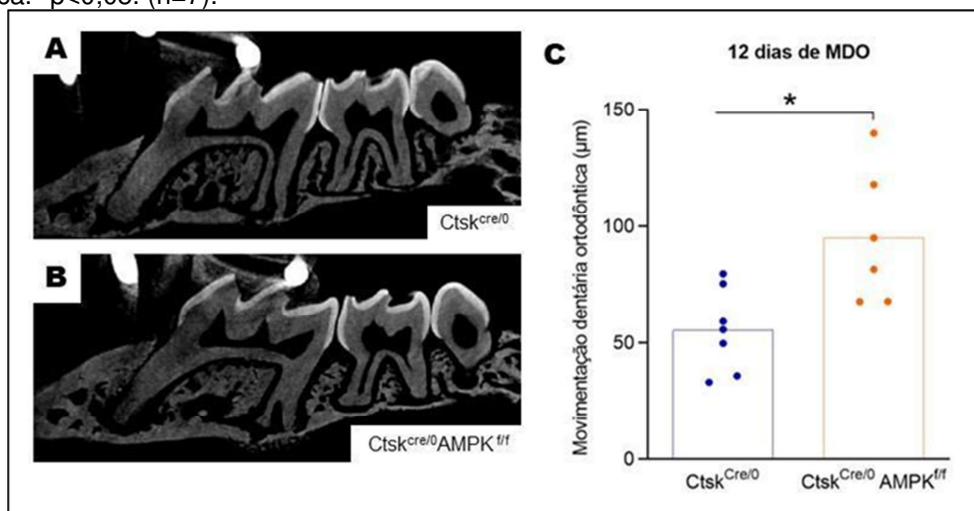
Figura 6. Avaliação do impacto da deleção seletiva de AMPK na composição mineral e orgânica do fêmur. Foram analisadas a intensidade das bandas relacionadas ao estiramento assimétrico do grupo fosfato (PO_4) e amida I no fêmur triturado de camundongos $\text{Ctsk}^{\text{Cre}/0}$ e $\text{Ctsk}^{\text{Cre}/0}$ $\text{AMPK}^{\text{f/f}}$. Posteriormente foi feita a razão entre a intensidade da banda de fosfato e a amida I. * $p < 0,05$. (n= 2-4)



4.2 Efeito da deleção de AMPK, especificamente em osteoclastos, no processo de remodelação óssea induzido por movimentação dentária ortodôntica

Visto esse efeito da deleção de AMPK em osteoclastos no osso alveolar, decidimos avaliar o efeito dessa deleção no processo de remodelação óssea durante a movimentação dentária ortodôntica. Para isso, camundongos $\text{Ctsk}^{\text{Cre}/0}$ $\text{AMPK}^{\text{f/f}}$ e seus controles $\text{Ctsk}^{\text{Cre}/0}$ foram submetidos ao modelo de indução de movimentação dentária ortodôntica. Após 12 dias, as maxilas foram coletadas e avaliadas com relação à quantidade movimentada pelo dente (μm) por meio de microtomografia computadorizada (Figura 7 A, 7 B e 7 C). A medida da movimentação foi feita da seguinte forma: mensuração da distância entre a junção cimento-esmalte do primeiro e segundo molares superiores direito (medida X) subtraída da medida entre a junção cimento-esmalte do primeiro e segundo molares superiores esquerdo do mesmo animal (medida Y). Dessa forma, tem-se que a movimentação dentária ortodôntica de um camundongo é igual à subtração da medida X pela medida Y. Os resultados mostram que após 12 dias houve movimentação dentária, sendo essa movimentação maior nos animais $\text{Ctsk}^{\text{Cre}/0}$ $\text{AMPK}^{\text{f/f}}$ quando comparado aos controles (Figura 7).

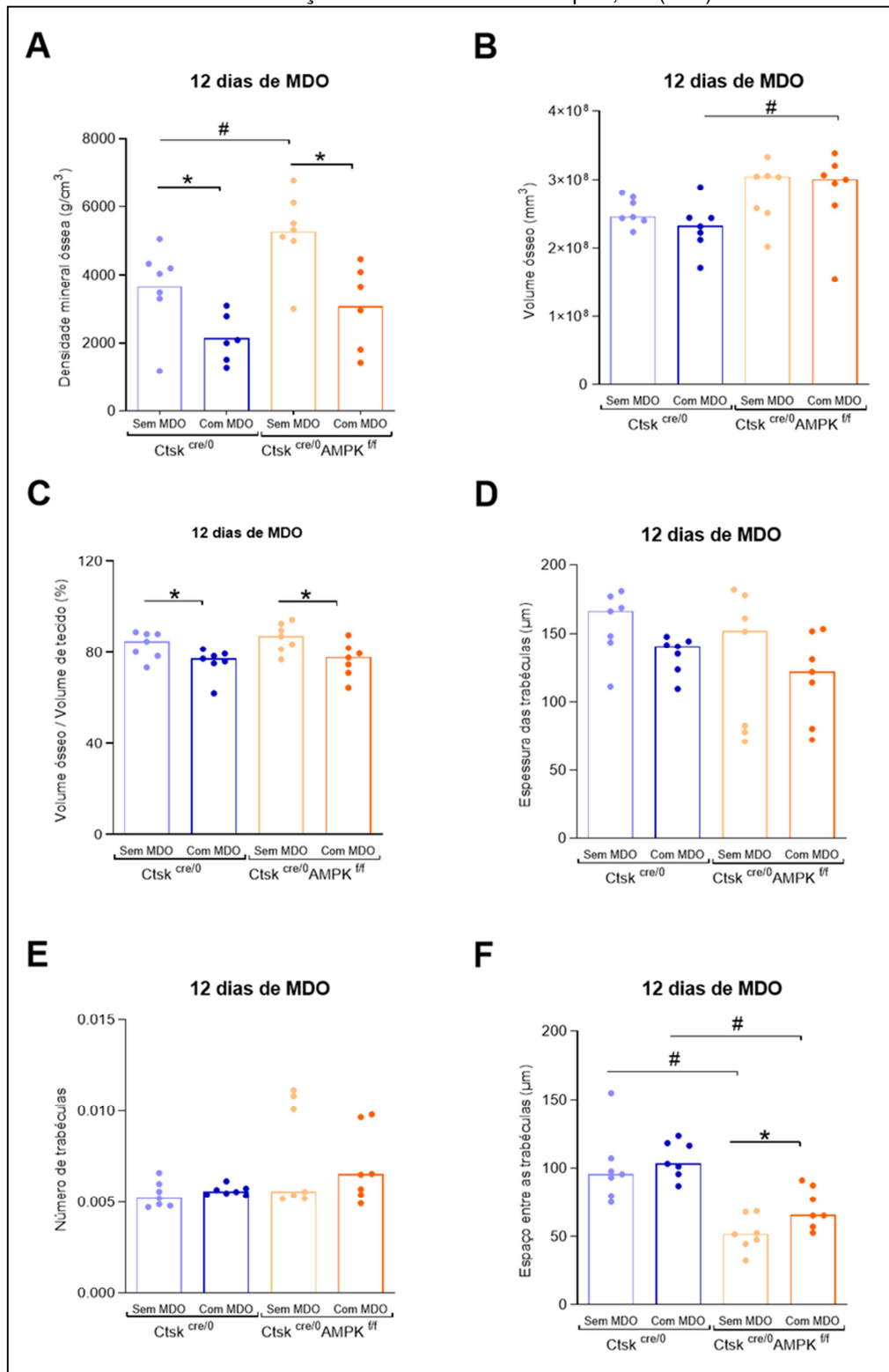
Figura 7. Quantificação da movimentação dentária ortodôntica. Foi mensurada a distância movimentada pelo primeiro molar superior direito em camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{ff}$ por meio de microtomografia computadorizada (A-C). Essa movimentação dentária é indicada pela subtração da distância entre o primeiro e o segundo molares superiores direitos pela distância entre esses mesmos dentes do lado esquerdo do mesmo animal. MDO: Movimentação dentária ortodôntica. * $p < 0,05$. (n=7).



4.3 Efeito da deleção de AMPK, especificamente em osteoclastos, na microarquitetura óssea alveolar durante processo de remodelação óssea induzido por movimentação dentária ortodôntica

Considerando que houve uma maior movimentação dentária nos camundongos $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{ff}$, avaliamos se a pressão imposta pela movimentação dentária teria um impacto também na microarquitetura óssea alveolar na região entre as raízes dos primeiros molares. Os resultados mostraram que a MDO desencadeou em uma redução da densidade mineral óssea (Figura 8 A) e uma menor proporção de volume ósseo por volume de tecido (Figura 8 C) tanto nos animais controle quanto nos animais $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{ff}$. Apesar de uma maior movimentação dentária nos animais $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{ff}$, observou-se que os animais mantiveram suas características de maior mineralização do osso alveolar quando comparado aos controle, uma vez que os camundongos $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{ff}$ apresentaram maior volume ósseo e menor espaço entre as trabéculas após a MDO quando comparado aos camundongos controle (Figura 8 B e 8 F). Em contrapartida, não houve diferença estatística entre o grupo controle e camundongos com deleção seletiva de AMPK em osteoclastos, após MDO, quando avaliou-se densidade mineral óssea (Figura 8A), a proporção de tecido ósseo em relação ao volume de tecido (Figura 8C), a espessura e número de trabéculas ósseas (Figura 8D e 8 E).

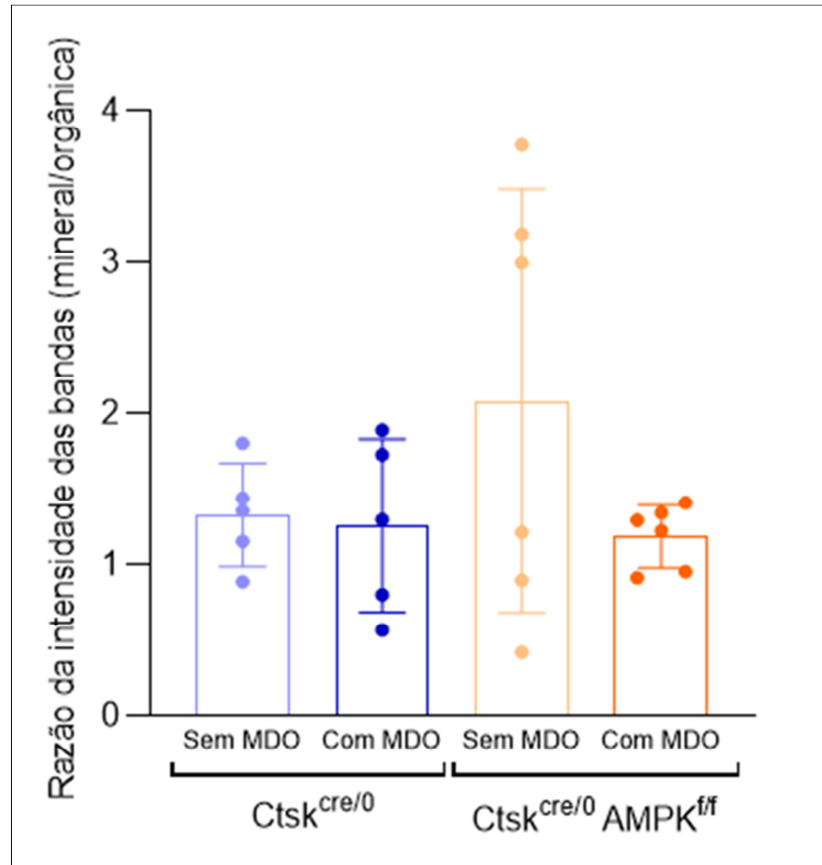
Figura 8. Avaliação do impacto da deleção seletiva de AMPK em osteoclastos nos parâmetros ósseos alveolares durante a movimentação dentária ortodôntica. Foram avaliados parâmetros ósseos do osso alveolar na região entre as raízes do primeiro molar superior esquerdo de camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{ff}$ após 12 dias de movimentação dentária ortodôntica. (A) Densidade mineral óssea. (B) Volume de tecido ósseo. (C) Porcentagem do volume ósseo trabecular sobre o tecido avaliado. (D) Espessura trabecular. (E) Número de trabéculas. (F) Espaço entre as trabéculas ósseas. MDO: Movimentação dentária ortodôntica. * $p < 0,05$. (n=7).



Visto esses resultados característicos de melhores parâmetros ósseos nos camundongos com deleção seletiva de AMPK em osteoclastos, mesmo após uma maior resposta ao emprego de uma força mecânica, o próximo passo foi avaliar a razão entre a quantidade de matriz mineral e orgânica do osso alveolar na região onde houve a movimentação dentária. Os resultados obtidos pelos espectros ATR-FTIR mostraram que a deleção seletiva de AMPK em osteoclastos provocou um relativo aumento da razão entre a intensidade das bandas de PO_4 /amida I quando comparado aos animais controle (Figura 9). Porém, após o emprego da força mecânica, não foi observada alteração da razão entre a intensidade das bandas de matriz mineral e orgânica entre os camundongos com deleção seletiva de AMPK em osteoclastos e os camundongos controle (Figura 9). Esses resultados indicam que após uma tração mecânica, o osso alveolar dos camundongos com deleção seletiva de AMPK em osteoclastos apresentaram uma quantidade de matriz mineral e orgânica em sua composição semelhante ao dos camundongos controle (Figura 9).

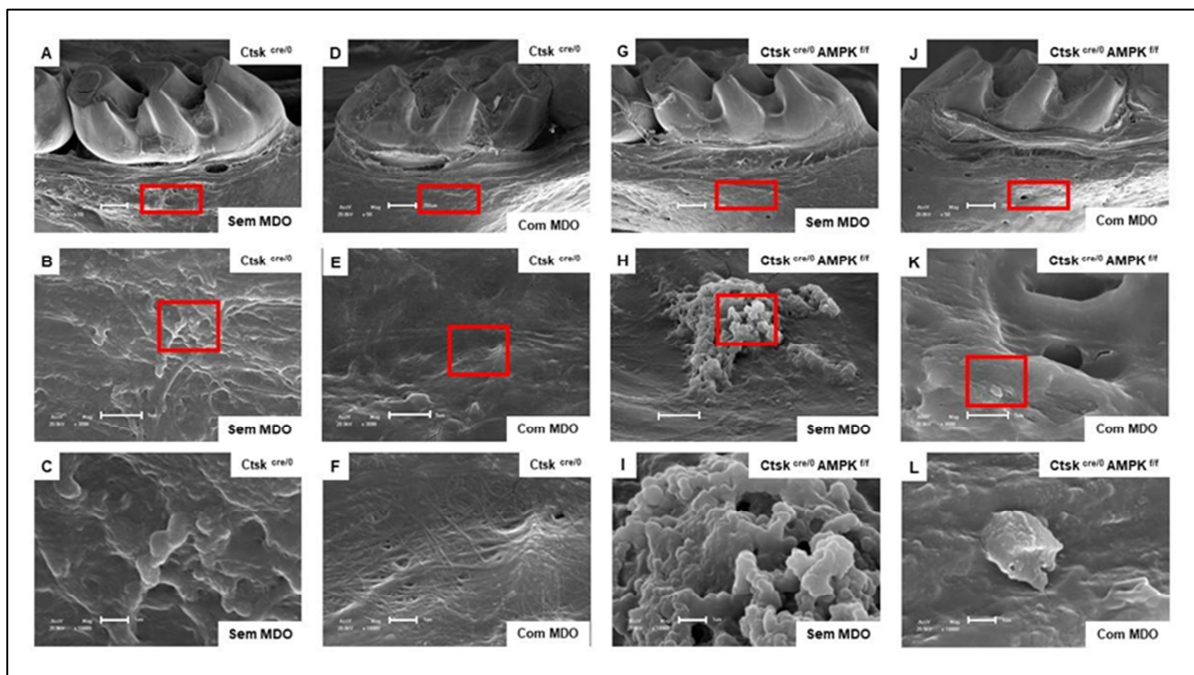
Podemos notar também que nos camundongos $\text{Ctsk}^{\text{cre/0}} \text{AMPK}^{\text{ff}}$ houve uma maior redução, porém não estatística, dessa razão entre a matriz mineral e orgânica após a MDO, diferentemente dos camundongos controle, em que vemos uma estabilidade dessa razão após o emprego da força mecânica (Figura 9).

Figura 9. Avaliação do impacto da deleção seletiva de AMPK na composição mineral e orgânica da maxila. Foram analisadas a intensidade das bandas relacionadas ao estiramento assimétrico do grupo fosfato (PO_4) e amida I na maxila triturada de camundongos $\text{Ctsk}^{\text{Cre}/0}$ e $\text{Ctsk}^{\text{Cre}/0} \text{AMPK}^{\text{ff}}$ após 12 dias de movimentação dentária ortodôntica. Posteriormente foi feita a razão entre a intensidade da banda de PO_4 dividida pela intensidade da banda de amida I. (n = 5 e 6).



Através das imagens obtidas pela MEV, podemos ver de forma ilustrativa esses resultados que foram previamente quantificados no infravermelho. As imagens representativas mostram que camundongos controle, sem MDO (Figura 10 A, 10 B e 10 C), apresentam fibras colágenas com depósito de esferas de minerais, porém pouco definidas. Por outro lado, nos camundongos com deleção seletiva de AMPK em osteoclastos, sem MDO (Figuras 10 G, 10 H e 10 I), observamos que esses animais apresentam estruturas minerais nítidas. Quando empregamos a força mecânica, nota-se ausência desta estrutura mineral no camundongo $\text{ctsk}^{\text{Cre}/0} \text{AMPK}^{\text{ff}}$ (Figuras 10 J, 10 K e 10 L) comparado ao controle (Figuras 10 D, 10 E e 10 F). Além disso, no grupo controle vemos uma densa rede de colágeno (Figuras 10 E e 10 F), diferente dos camundongos knockout condicionais, em que percebemos a presença de menor quantidade de fibras colágenas (Figuras 10 K e 10 L).

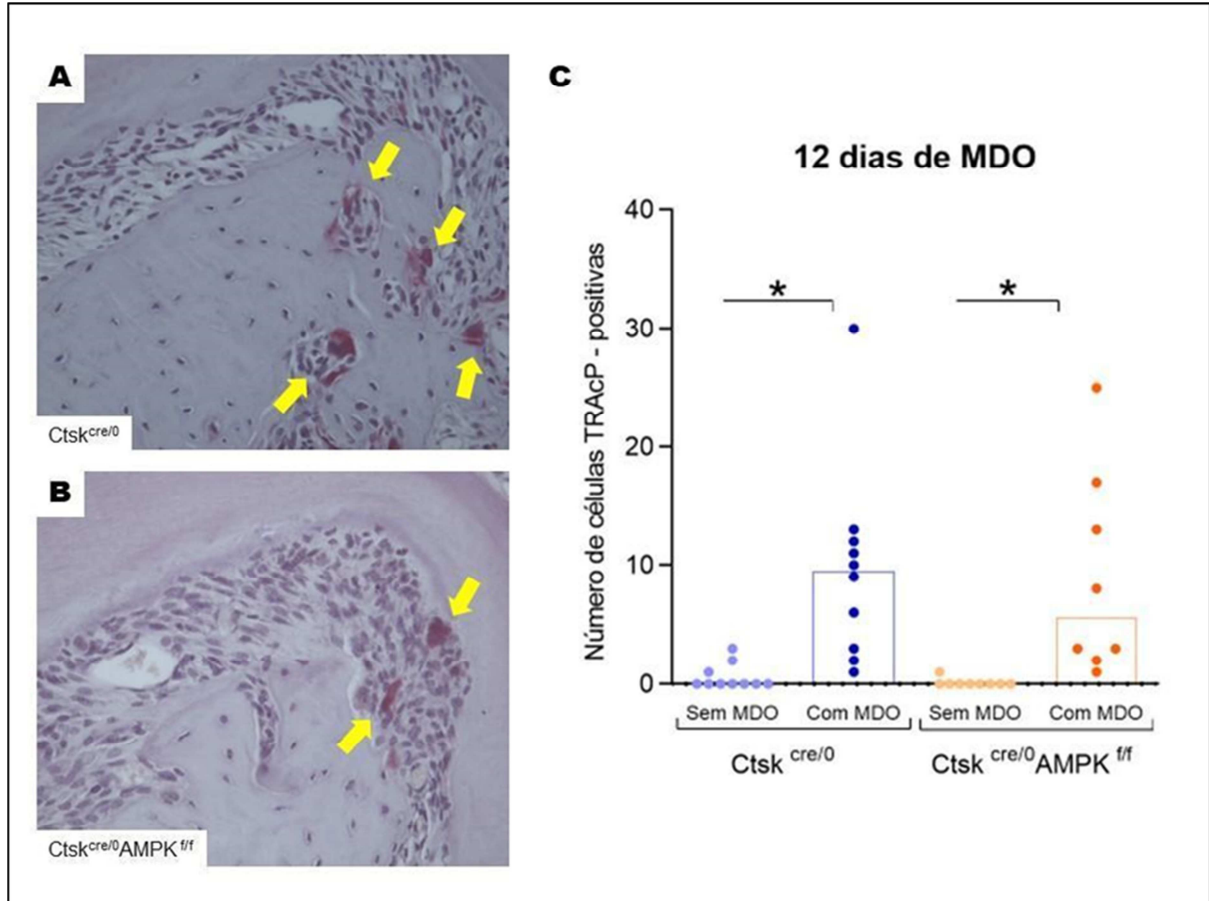
Figura 10. Avaliação do impacto da deleção seletiva de AMPK na composição mineral e orgânica da maxila. Foram obtidas imagens a partir da microscopia eletrônica de varredura da maxila de camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{f/f}$ após 12 dias de movimentação dentária ortodôntica, nos aumentos de 50 (A, D, G e J), 3000 (B, E, H e K) e 10000 (C, F, I e L) vezes de cada grupo experimental. O retângulo vermelho representa a região ampliada no maior aumento. As barras de escala correspondem a 200 μm no aumento de 50 vezes, 5 μm no aumento de 3000 vezes e 1 μm no aumento de 10000 vezes.



4.4 Efeito da deleção de AMPK, especificamente em osteoclastos, no número de células TRAcP positivas durante processo de remodelação óssea induzido por movimentação dentária ortodôntica

Visto que houve uma maior movimentação dentária, após o emprego de uma força ortodôntica nos camundongos deficientes para AMPK em osteoclastos, avaliamos qual seria a correlação dessa movimentação com o número e presença de osteoclastos. A análise dos osteoclastos foi focada no osso alveolar, na região mesial à raiz disto-vestibular do primeiro molar superior direito após 12 dias de aplicação da força. Para isso, as lâminas histológicas foram submetidas a uma reação enzimática utilizando a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAcP), a qual marca, em vermelho, os osteoclastos. Foi observado que os lados submetidos à movimentação dentária ortodôntica (direito) apresentaram um número significativamente maior de osteoclastos quando comparado aos lados controle do mesmo animal (lado esquerdo) (Figura 11). Em contrapartida, não foi observada diferença estatística no número de osteoclastos dos animais $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{f/f}$ quando comparado aos animais $Ctsk^{Cre/0}$ (Figura 11).

Figura 11. Quantificação de osteoclastos. Foi quantificado o número de osteoclastos no osso alveolar mesial à raiz disto-vestibular do primeiro molar superior direito e esquerdo em camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{f/f}$ nas maxilas submetidas à reação enzimática TRAP, após 12 dias de movimentação dentária. As imagens são referentes ao primeiro molar superior direito. MDO: Movimentação dentária ortodôntica. * $p < 0,05$. (n=8-10).



4.5 Efeito da deleção seletiva de AMPK em osteoclastos, na expressão gênica de marcadores de osteoclastos e osteoblastos no osso alveolar após 10 dias de movimentação dentária ortodôntica

Diante dos resultados de uma maior movimentação dentária nos camundongos $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{f/f}$ comparado aos $Ctsk^{Cre/0}$, porém a manutenção de melhores parâmetros ósseos alveolares nesses camundongos, mesmo após um estímulo, e a não diferença no número de células TRAP positivas, a próxima etapa foi investigar se, após 10 dias de movimentação dentária ortodôntica, a expressão gênica de marcadores de osteoclastos (Figura 12) e osteoblastos (Figura 13) seriam diferentes nesses grupos experimentais, utilizando o ensaio de PCR em tempo real. Embora os resultados demonstraram não haver diferença estatística na expressão de marcadores de osteoblastos (Figura 13), os animais $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{f/f}$ apresentaram uma menor expressão dos marcadores da atividade de osteoclastos

representado pela Catepsina K (Ctsk) (Figura 12 B) e RANKL (Figura 12 E) quando comparado aos camundongos controle. Os dados mostram que a MDO não altera a expressão desses genes, portanto, essa menor expressão de Catepsina K e RANKL corroboram com a melhoria dos parâmetros ósseos alveolares nos camundongos com deleção seletiva de AMPK nos animais íntegros (sem MDO). Nossos dados mostram que a expressão de genes para TRAP (Figura 12 A), MMP9 (Figura 12 C), proteína transmembrana específica de células dendríticas (DC-STAMP) (Figura 12 D), Osteoprotegerina (OPG) (Figura 12 E), fator de transcrição relacionado à runt 2 (Runx2) (Figura 13 A) e Osteocalcina (Figura 13 B) foi semelhante entre os camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ $AMPK^{f/f}$ e $Ctsk^{Cre/0}$. Entretanto, a expressão de runx2 diminuiu após instalação da mola ortodôntica nos camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ $AMPK^{f/f}$ (Figura 13 A), para os demais genes vimos que a MDO também não altera a expressão desses genes analisados por PCR.

Figura 12. Avaliação da expressão gênica de marcadores de osteoclastos após 10 dias de aplicação da força de movimentação dentária ortodôntica. O osso alveolar do lado direito (com mola) e esquerdo (sem mola) de camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{If/If}$ foram coletados após 10 dias de aplicação da força de movimentação dentária, esses ossos foram processados e submetidos ao ensaio de PCR em tempo real para avaliação de marcadores de osteoclastos. Os marcadores de osteoclastos avaliados foram o TRAP (A), Catepsina K (B), MMP9 (C), Dcstamp (D), RANKL (E) e Osteoprotegerina (F). MDO: Movimentação dentária ortodôntica. * $p < 0,05$. (n=8-12).

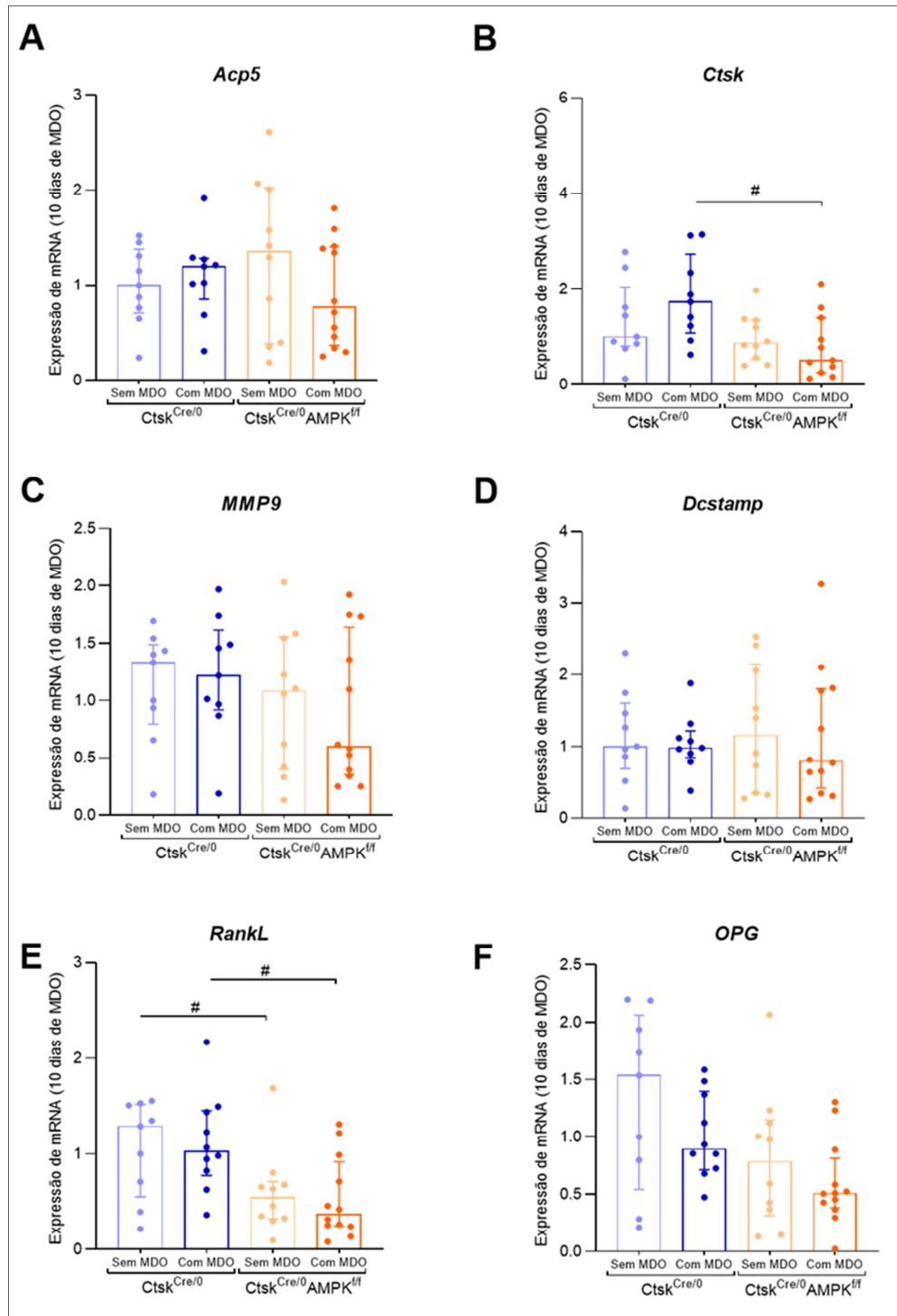
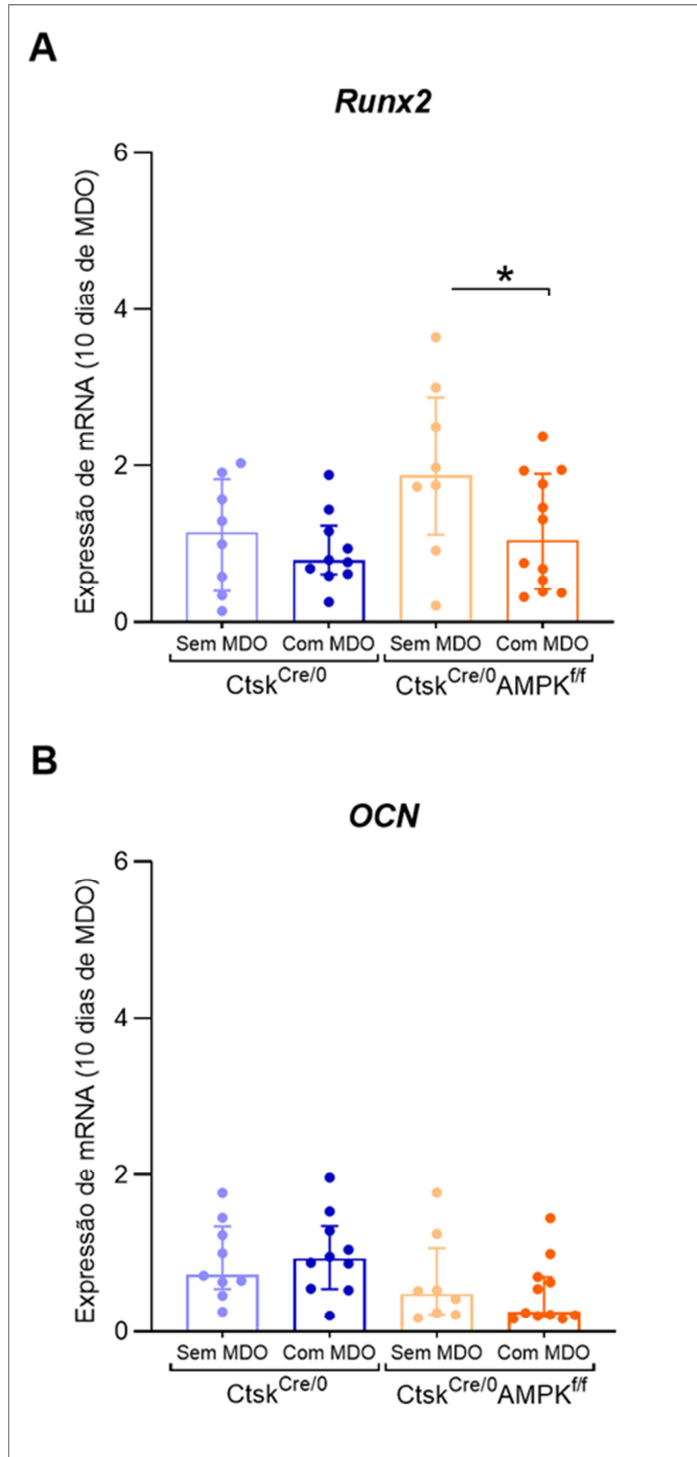


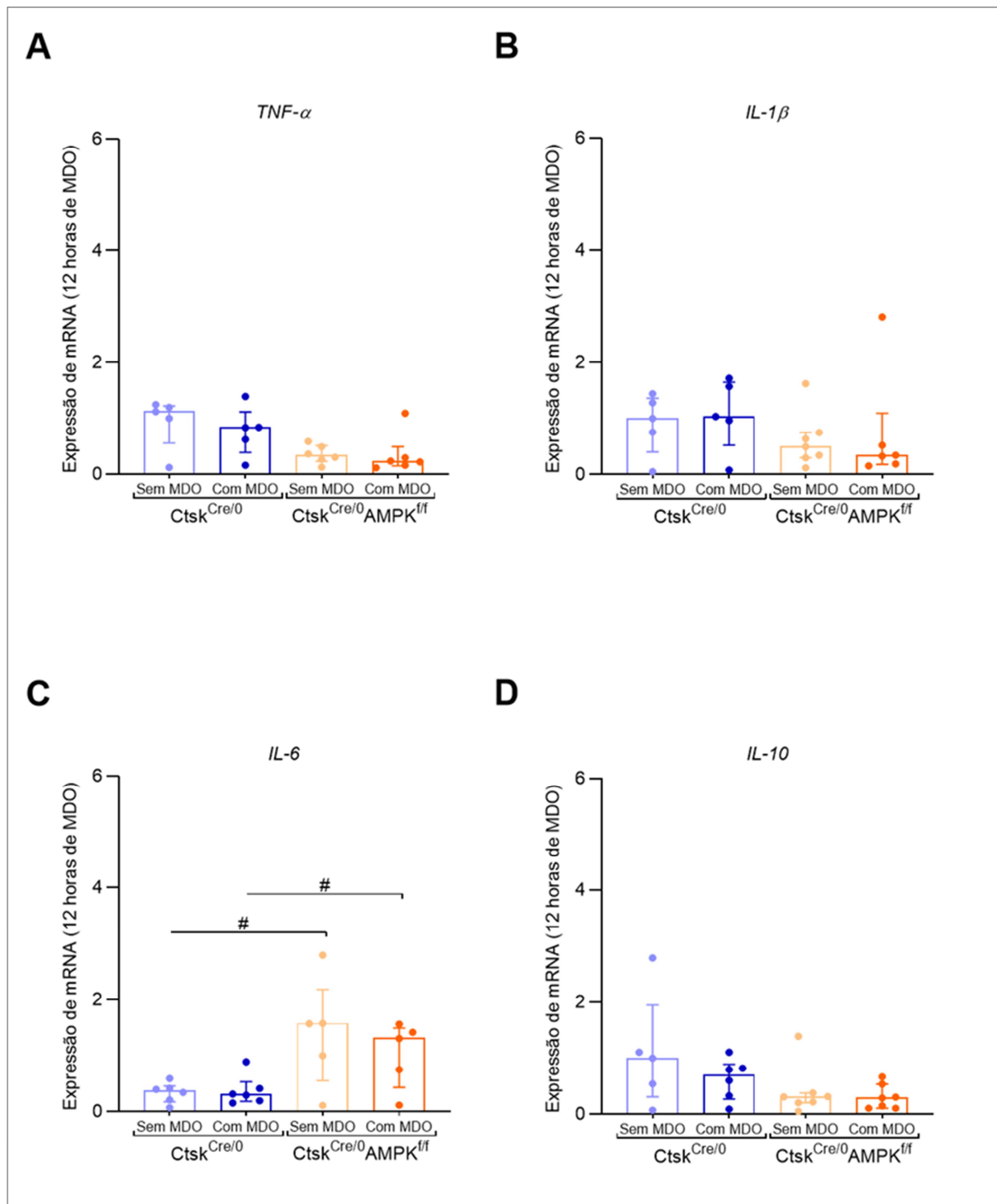
Figura 13. Avaliação da expressão gênica de marcadores de osteoblastos após 10 dias de aplicação da força de movimentação dentária ortodôntica. O osso alveolar do lado direito (com mola) e esquerdo (sem mola) de camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{if}$ foram coletados após 10 dias de aplicação da força de movimentação dentária, esses ossos foram processados e submetidos ao ensaio de PCR em tempo real para avaliação de marcadores de osteoblastos. Os marcadores de osteoblastos avaliados foram Runx2 (A) e Osteocalcina (B). MDO: Movimentação dentária ortodôntica. * $p < 0,05$. (n=8-12).



4.6 Efeito da deleção seletiva de AMPK em osteoclastos, na expressão gênica de marcadores inflamatórios no osso alveolar após 12 e 72 horas de movimentação dentária ortodôntica

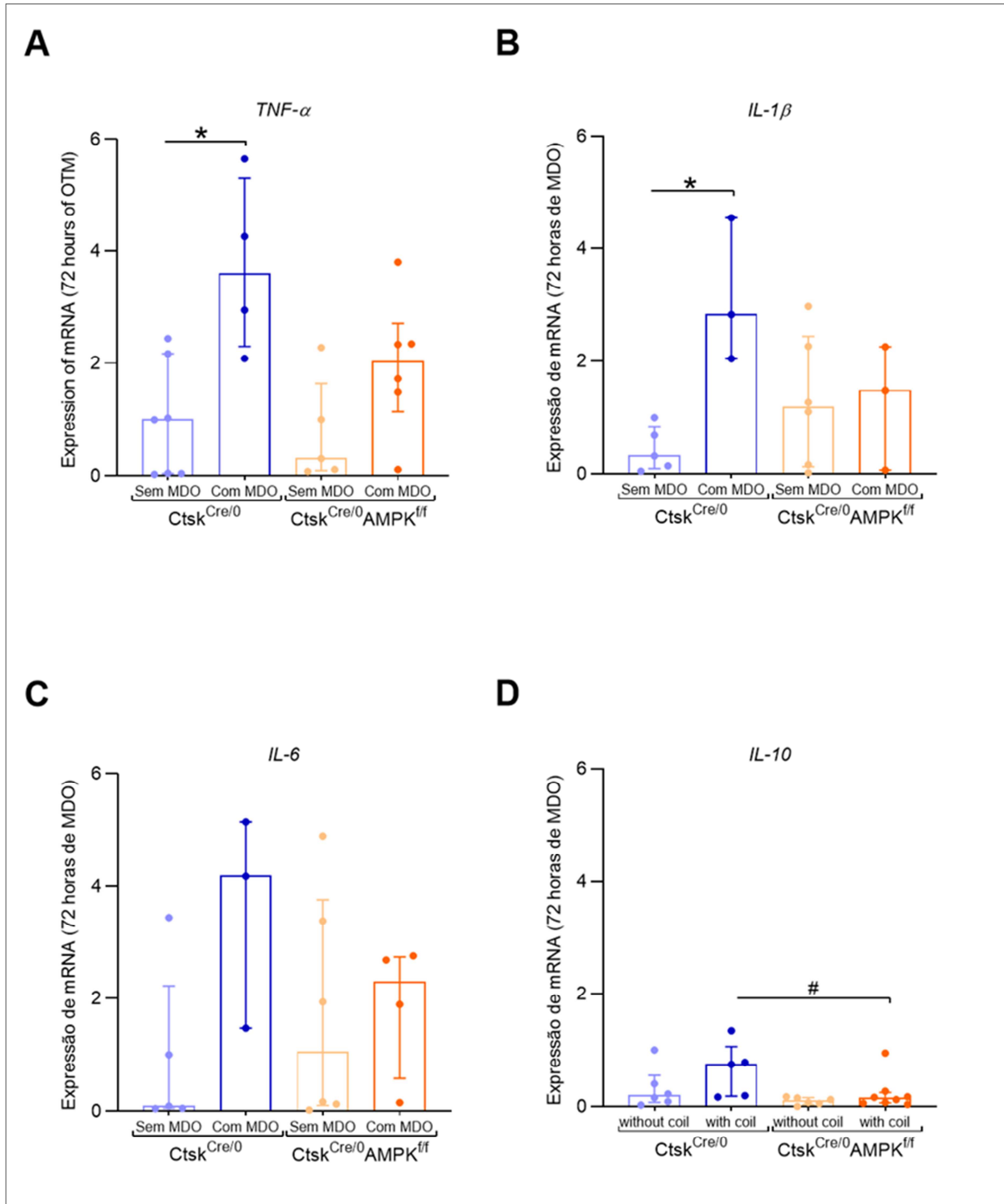
Para que um dente se movimente no osso alveolar, é necessária uma resposta inflamatória, desencadeada pelo emprego de uma força aplicada ao dente. Essa resposta inflamatória é representada por citocinas liberadas no local que são responsáveis pelo recrutamento de células ósseas, em especial os osteoclastos e os osteoblastos (LI *et al.*, 2018). Visto isso, bem como os resultados encontrados até o momento, o nosso próximo passo foi avaliar a expressão gênica de marcadores inflamatórios no osso alveolar após aplicação do modelo de MDO. Primeiramente foi coletado o osso alveolar de camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{ff}$ submetidos ao modelo de MDO por 12 horas, uma vez que pretendíamos avaliar a resposta inflamatória logo após o emprego da força sobre o dente. Os resultados mostraram que camundongos com deleção de AMPK em osteoclastos apresentaram expressão de IL-6, uma citocina pró-inflamatória que estimula a osteoclastogênese, aumentada quando comparados aos camundongos controle (Figura 14 C), o que corrobora com uma maior MDO encontrada nesses camundongos, e nos leva a suspeitar de uma maior diferenciação de osteoclastos em tempos mais iniciais nesse grupo, quando comparado ao grupo controle. Entretanto, não foi identificada diferença estatística nos níveis de outras citocinas pró-inflamatórias analisadas como TNF- α (Figura 14 A), IL-1 β (Figura 14 B), e na citocina anti-inflamatória IL-10 (Figura 14 D).

Figura 14. Avaliação da expressão gênica de marcadores inflamatórios após 12 horas de movimentação dentária ortodôntica. O osso alveolar do lado direito (com mola) e esquerdo (sem mola) de camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{fl/fl}$ foram coletados após 12 horas de movimentação dentária, esses ossos foram processados e submetidos ao ensaio de PCR em tempo real para avaliação de marcadores inflamatórios. Os marcadores pró-inflamatórios avaliados foram Fator de necrose tumoral alfa (A), Interleucina-1 β (B) e Interleucina-6 (C) e o marcador anti-inflamatório avaliado foi a Interleucina-10 (D). MDO: Movimentação dentária ortodôntica. * $p < 0,05$. (n=5-7).



Com o objetivo de avaliar o perfil inflamatório em tempo mais tardio, optou-se por avaliar a expressão de genes inflamatórios após 72 horas de movimentação ortodôntica. Embora não tenha sido observado diferenças na expressão de TNF- α (Figura 15 A), IL-1 β (Figura 15 B) e IL-6 (Figura 15 C) no grupo $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{f/f}$ comparado ao controle, observou-se que a expressão de IL-10 estava reduzida em camundongos $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{f/f}$, comparado aos controles (Figura 15 D), o que sugere uma maior inflamação nesses camundongos e corrobora novamente com uma maior MDO encontrada nesses camundongos, e reforça a hipótese de uma maior diferenciação de osteoclastos em tempos mais iniciais nesse grupo, quando comparado ao grupo controle.

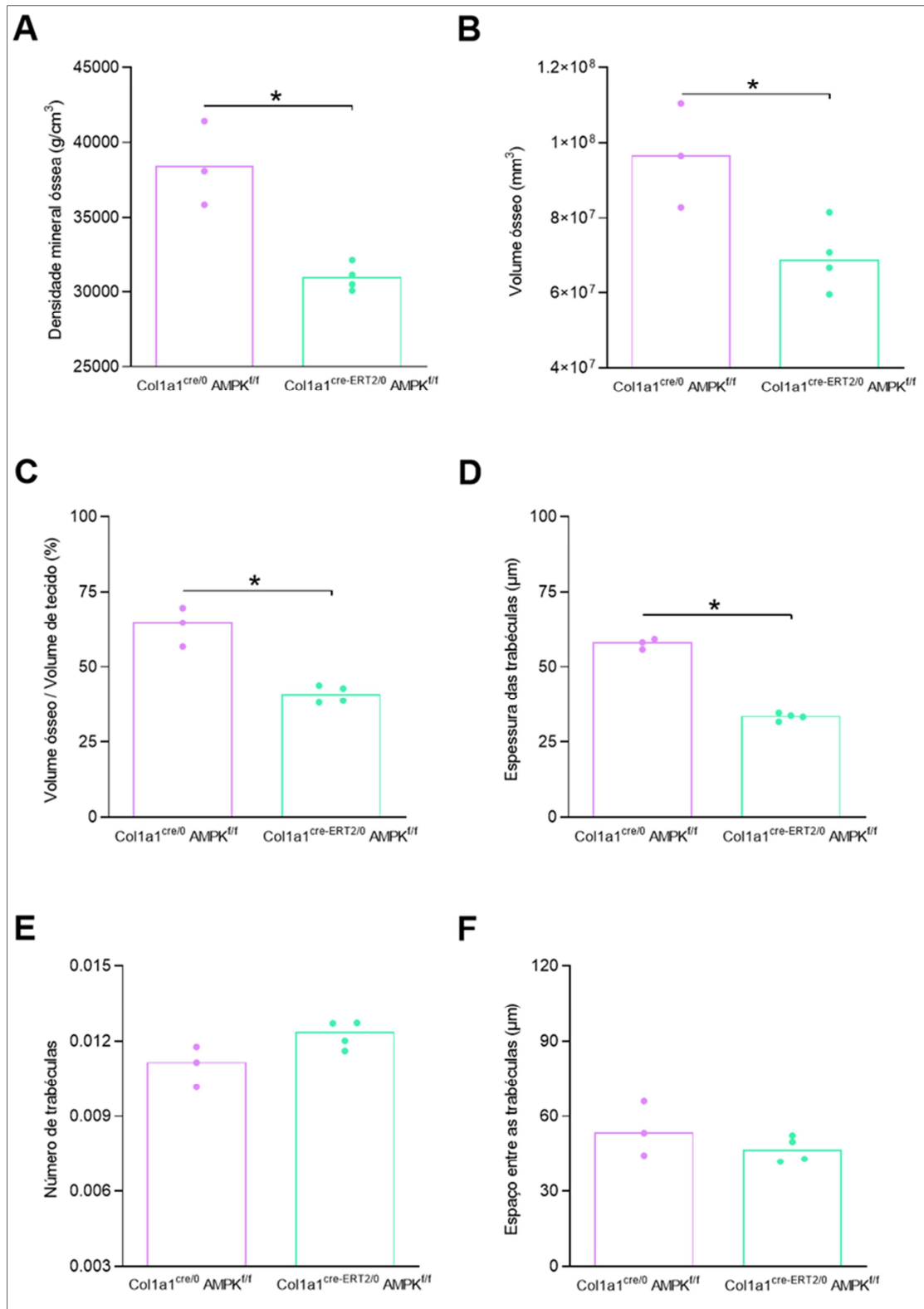
Figura 15. Avaliação da expressão gênica de marcadores inflamatórios após 72 horas de movimentação dentária ortodôntica. O osso alveolar do lado direito (com mola) e esquerdo (sem mola) de camundongos $Ctsk^{Cre/0}$ e $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{fl/fl}$ foram coletados após 72 horas de movimentação dentária, esses ossos foram processados e submetidos ao ensaio de PCR em tempo real para avaliação de marcadores inflamatórios. Os marcadores pró-inflamatórios avaliados foram Fator de necrose tumoral alfa (A), Interleucina-1 β (B) e Interleucina-6 (C) e o marcador anti-inflamatório avaliado foi a Interleucina-10 (D). MDO: Movimentação dentária ortodôntica. * $p < 0,05$. (n=3-8).



4.7 Efeito da deleção de AMPK, especificamente em osteoblastos, no osso alveolar

O próximo passo foi avaliar o efeito sobre a qualidade do osso alveolar quando deletamos a AMPK em osteoblastos. Nossos resultados mostram que a deleção seletiva dessa proteína em osteoblastos leva a uma piora na qualidade óssea evidenciado por alguns parâmetros no osso alveolar. Observou-se uma significativa redução da densidade mineral óssea (Figura 16 A), do volume de tecido ósseo (Figura 16 B), na razão entre tecido ósseo e volume de tecido (Figura 16 C) e da espessura das trabéculas ósseas (Figura 16 D). No presente estudo avaliamos ainda o número de trabéculas ósseas (Figura 16 E) e o espaço entre elas (Figura 16 F), mas não foi observado diferença estatística entre o grupo controle e com deleção seletiva de AMPK em osteoblastos.

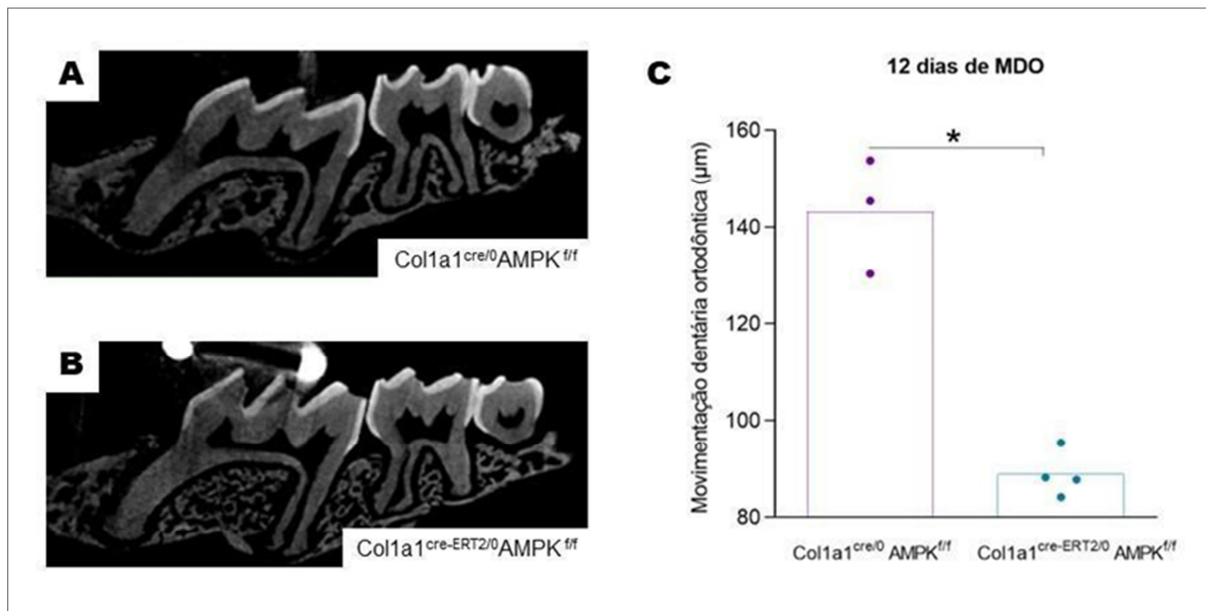
Figura 16. Avaliação do impacto da deleção seletiva de AMPK em osteoblastos nos parâmetros ósseos alveolares. Foram avaliados parâmetros ósseos do osso alveolar na região entre as raízes do primeiro molar superior esquerdo de camundongos $Col1a1^{cre/0}AMPK^{fl/fl}$ tratados ou não com tamoxifeno sem movimentação dentária ortodôntica. (A) Densidade mineral óssea. (B) Volume de tecido ósseo. (C) Porcentagem do volume ósseo trabecular sobre o tecido avaliado. (D) Espessura trabecular. (E) Número de trabéculas. (F) Espaço entre as trabéculas ósseas. * $p < 0,05$. (n=3-4).



4.8 Efeito da deleção de AMPK, especificamente em osteoblastos, no processo de remodelação óssea induzido por movimentação dentária ortodôntica

Visto esse efeito diferente da deleção de AMPK, em osteoblastos, no osso alveolar decidimos avaliar o efeito dessa deleção no processo de remodelação óssea. Para isso, camundongos $Col1a1^{Cre-ERT2/0}AMPK^{f/f}$ e seus controles $Col1a1^{Cre/0}AMPK^{f/f}$ foram submetidos ao modelo de indução de movimentação dentária ortodôntica. Após 12 dias, as maxilas foram coletadas e avaliadas com relação à quantidade movimentada pelo dente (μm) por meio de microtomografia computadorizada (Figura 17 A, 17 B e 17 C). Os resultados mostram que após 12 dias houve movimentação dentária, sendo essa movimentação menor nos animais $Col1a1^{Cre-ERT2/0}AMPK^{f/f}$ quando comparado aos controles (Figura 17).

Figura 17. Quantificação da movimentação dentária ortodôntica. Foi mensurada a distância movimentada pelo primeiro molar superior direito em camundongos $Col1a1^{Cre/0}AMPK^{f/f}$ e $Col1a1^{Cre-ERT2/0}AMPK^{f/f}$ por meio de microtomografia computadorizada (A-C). Essa movimentação dentária é indicada pela subtração da distância entre o primeiro e o segundo molares superiores direitos pela distância entre esses mesmos dentes do lado esquerdo do mesmo animal. MDO: Movimentação dentária ortodôntica. * $p < 0,05$. (n=3-4).

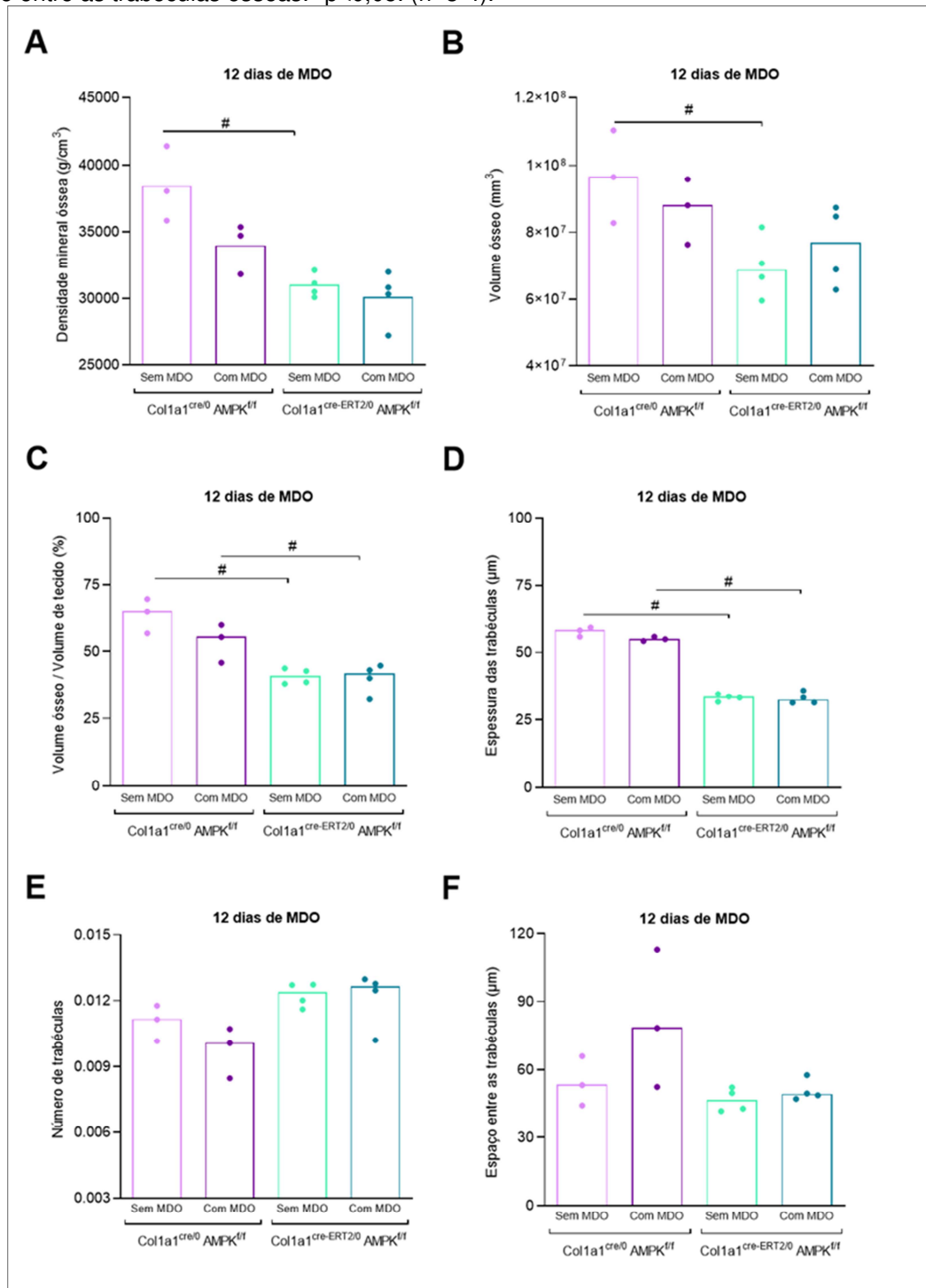


4.9 Efeito da deleção de AMPK, especificamente em osteoblastos, nos parâmetros ósseos alveolar durante processo de remodelação óssea induzido por movimentação dentária ortodôntica

Considerando que a deleção seletiva de AMPK em osteoblastos acarretou em uma piora dos parâmetros ósseos, avaliamos se essa característica se mantinha

em um processo de remodelação óssea. Os resultados mostraram que os camundongos com deleção seletiva de AMPK em osteoblastos continuaram apresentando um menor volume ósseo identificado por uma redução significativa da proporção de volume ósseo/volume de tecido (Figura 18 C) e uma menor espessura das trabéculas ósseas (Figura 18 D) após MDO, quando comparado aos camundongos controle. Apesar disso, não houve diferença estatística significativa para os parâmetros de densidade mineral óssea (Figura 18 A), volume ósseo (Figura 18 B), número de trabéculas (Figura 18 E) e espaço entre elas (Figura 18 F), quando comparamos os animais controle e com deleção seletiva de AMPK em osteoblastos, após a MDO.

Figura 18. Avaliação do impacto da deleção seletiva de AMPK em osteoblastos nos parâmetros ósseos alveolares durante a movimentação dentária ortodôntica. Foram avaliados parâmetros ósseos do osso alveolar na região entre as raízes do primeiro molar superior esquerdo de camundongos $Col1a1^{cre/0}AMPK^{fl/fl}$ tratados ou não com tamoxifeno sem movimentação dentária ortodôntica. (A) Densidade mineral óssea. (B) Volume de tecido ósseo. (C) Porcentagem do volume ósseo trabecular sobre o tecido avaliado. (D) Espessura trabecular. (E) Número de trabéculas. (F) Espaço entre as trabéculas ósseas. * $p < 0,05$. (n=3-4).



5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Estudos realizados em modelos de remodelação óssea em ossos longos, ou *in vitro*, com células provenientes de ossos longos, assim como dados prévios do nosso grupo de pesquisa mostram um papel importante da AMPK na osteoclastogênese, de modo que a AMPK regula negativamente a diferenciação de osteoclastos e seu tamanho (LEE et al., 2010; KANG et al., 2013). Corroborando com esses dados, os resultados encontrados no presente estudo mostram um importante papel de AMPK sobre o remodelamento ósseo ao interferir na diferenciação de osteoblastos e osteoclastos. De uma maneira geral observamos uma regulação negativa da AMPK sobre a osteoclastogênese, uma vez que a deleção seletiva de AMPK em osteoclastos resultou em uma redução da fração de matriz mineral sobre a orgânica no fêmur de camundongos. Diferentemente, os achados do presente estudo mostram que a deleção seletiva de AMPK em osteoclastos tem um efeito diferente no osso alveolar, ou seja, parece ser a favor da osteoclastogênese, uma vez que observamos parâmetros ósseos mais favoráveis, e que a razão entre matriz mineral e matriz orgânica encontra-se relativamente maior, bem como uma menor expressão de catepsina K e RANKL, nesses camundongos. Por outro lado, a deleção seletiva de AMPK em osteoblastos resultou em uma menor densidade mineral óssea, um menor volume de tecido ósseo e menor espessura das trabéculas ósseas na maxila dos camundongos.

A literatura mostra que células ósseas presentes em locais específicos do esqueleto podem se comportar de forma diferente frente a sinais bioquímicos e biológicos, como por exemplo frente a uma resposta inflamatória (SODEK and MCKEE, 2000; WAN et al., 2016). Isso ocorre no osso alveolar e nos ossos longos, sendo que uma das hipóteses para esse comportamento diferente pode estar relacionada à origem das células, visto que o osso alveolar tem origem de células da crista neural e os ossos longos do mesoderma (KARAPLIS, 2002; ANDERSON, 1997; CHAI and MAXSON, 2006). Além disso, apesar de os mesmos reguladores-chave da diferenciação de osteoblastos, tais como o RUNX2 e Osterix, estarem envolvidos nos ossos alveolares e longos (DUCY et al., 1997; KOMORI et al., 1997; OTTO et al., 1997; NAKASHIMA et al., 2002), alguns fatores de crescimento, receptores e cascatas de sinalização desempenham papéis distintos nos diferentes ossos (ABZHANOV et al., 2007; DE COSTER et al., 2007; KIMMEL et al., 2007).

Células derivadas da calvária ou da mandíbula de camundongos possuem um potencial osteoclastogênico diferente daquelas derivadas de ossos longos (FALONI et al., 2011). Sendo que tanto *in vitro* quanto *in vivo*, as células derivadas da mandíbula de ratos apresentaram maior potencial osteogênico comparado às células da medula óssea de ossos longos (AGHALOO et al., 2010). Da mesma forma, osteoblastos derivados da calvária de camundongos induziram uma maior diferenciação de osteoclastos quando comparados aos osteoblastos derivados de ossos longos, o que pode ter ocorrido devido a diferenças na expressão de RANKL e OPG (WAN et al., 2016). Da mesma forma, um estudo realizado com células humanas demonstrou que células da medula mandibular ou maxilar humana apresentaram maior proliferação, senescência tardia e forte expressão de marcadores osteoblásticos em comparação com células da medula derivadas da crista ilíaca dos mesmos pacientes (AKINTOYE et al., 2006). Em contrapartida, os resultados de um outro estudo mostrou que as células derivadas do osso alveolar e do osso longo diferem na expressão de marcadores osteogênicos e na capacidade de induzir a formação de osteoclastos, entretanto, as células dos ossos longos pareciam ser mais diferenciadas e induziram mais osteoclastos comparadas às células do osso alveolar, com maior expressão de reguladores da remodelação óssea como osteopontina (OPN), RUNX2 e proteína de matriz de dentina 1 (DMP-1) (KELDER et al., 2020), apesar disso, os autores observaram que as células do osso alveolar proliferaram mais rapidamente comparado às células dos ossos longos, porém em um estado menos diferenciado (KELDER et al., 2020), o que hipoteticamente poderia estar relacionado à maior renovação óssea na mandíbula (HUJA et al., 2006). Portanto, a origem da célula parece influenciar em um perfil de resposta diferente frente ao estresse energético, neste caso desencadeado pela deleção de AMPK.

Independente da região do corpo a matriz extracelular óssea é composta por uma parte orgânica cuja principal proteína é o colágeno tipo 1 (SROGA; VASHSHTH, 2012) e a parte inorgânica, cujo componente mais presente é a apatita biológica, a qual contém elementos como íons cálcio e fosfato (BALA; FARLAY; BOIVIN, 2013). O processo de mineralização óssea se inicia com a deposição de matriz extracelular óssea e a incorporação de hidroxiapatita por essa matriz extracelular. Com o passar dos dias esses cristais de hidroxiapatita aumentam de tamanho e número e, interagem com o colágeno tipo I, essa interação faz com que

haja depósito de minerais na superfície das fibras colágenas, dessa forma matéria orgânica e inorgânica trabalham juntas para manutenção do metabolismo ósseo (LICINI; VITALE-BROVARONE; MATTIOLI-BELMONTE, 2019). Durante o processo de reabsorção óssea, os osteoclastos liberam catepsina K que degradam as fibras colágenas, iniciando o processo de reabsorção óssea (CLARKE, 2008). Nossos dados mostraram que os animais com deleção seletiva de AMPK em osteoclastos apresentam uma menor expressão gênica de catepsina K, o que levaria a uma menor degradação de fibras colágenas e, conseqüentemente, a um aumento relativo da razão entre matriz mineral e matriz orgânica, com observado por este estudo.

A literatura mostra que a deleção total de AMPK desencadeia uma piora na densidade mineral óssea (JEYABALAN et al., 2012), entretanto, no presente estudo a deleção de AMPK foi apenas em osteoclastos, dessa forma, essa proteína ainda estava presente em todas as outras células inclusive nos osteoblastos, permitindo uma boa formação de tecido ósseo alveolar nos camundongos $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{f/f}$. No presente estudo a deleção dessa proteína em osteoclastos provocou uma maior movimentação dentária, a literatura sugere que a AMPK pode influenciar as funções das células ósseas sem alterar a diferenciação dessas células, possivelmente por uma via de regulação hormonal da remodelação óssea (JEYABALAN et al., 2012), o que poderia justificar a não alteração no número de osteoclastos, bem como na expressão de marcadores de osteoblastos. Por outro lado, sabe-se que os osteoclastos são também ativados por osteoblastos (PHAN; XU; ZHENG, 2004; CHEN et al., 2018; KIM et al., 2020) e que a AMPK tem efeito sobre os osteoblastos, proporcionando uma maior formação óssea (JEYABALAN et al., 2012), o que corrobora com os achados do nosso estudo, pois ao deletar a AMPK em osteoblastos, observamos uma piora dos parâmetros ósseos, representada por menor densidade mineral óssea, volume ósseo e espessura de trabéculas. Ao deletar a AMPK seletivamente em osteoclastos, essa proteína ainda estava expressa em osteoblastos, favorecendo uma melhora nos parâmetros ósseos alveolares, e, de forma contrária, quando deletamos seletivamente a AMPK em osteoblastos, ela ainda permanecia expressa em osteoclastos, onde favorece a osteoclastogênese e provocou uma piora dos parâmetros ósseos alveolares.

Um outro fator que nos chamou a atenção foi o resultado de movimentação dentária ortodôntica, uma vez que, apesar de observarmos uma característica de proteção da AMPK para o processo de osteoclastogênese no osso alveolar,

identificada pela melhora nos parâmetros ósseos avaliados e na redução da expressão de Ctsk e RANKL, observado nos camundongos com deleção seletiva de AMPK em osteoclastos, eles apresentaram uma maior MDO quando comparado aos animais controle. Isso pode ser explicado pelos maiores níveis de IL-6 encontrados nos camundongos Ctsk^{Cre/0} AMPK^{ff/ff} em tempos iniciais, após 12 horas de aplicação da força ortodôntica, bem como níveis menores de IL-10 nesses camundongos, também em tempos iniciais, após 72 horas de aplicação da força. Esse conjunto de dados nos leva à hipótese de que os camundongos com deleção seletiva de AMPK em osteoclastos apresentam uma resposta inflamatória inicial exacerbada quando comparado aos camundongos controle. Essa maior expressão de IL-6 e menor expressão de IL-10 poderiam estar relacionadas a uma maior osteoclastogênese nesses camundongos, uma vez que são citocinas associadas à osteoclastogênese, sendo a IL-6 associada ao estímulo (SIMS, 2021) e a IL-10 associada a uma inibição desse processo (CLAUDINO et al., 2010; ZHANG et al., 2014).

Estudos *in vitro* mostram que células de camundongos com deleção seletiva de AMPK em monócitos, apresentam uma maior diferenciação de osteoclastos, com formação de células maiores, com mais núcleos, o que pode estar associado à maior atividade. Mostraram também que essa diferenciação ocorreu de forma mais precoce quando comparado às células de camundongos controle (LEE et al., 2010; KANG et al., 2013; PARK et al., 2020). Esses dados nos levam a acreditar que os camundongos Ctsk^{Cre/0} AMPK^{ff/ff} apresentaram uma resposta inflamatória exacerbada, o que levou a uma maior osteoclastogênese, além disso os osteoclastos desses camundongos podem ter se diferenciado em tempos mais precoces, com uma forma mais ativa, levando a uma maior e mais rápida movimentação dentária nesses animais. Após 10 dias de MDO, ao avaliar a expressão de marcadores de osteoclastos, esses animais já haviam atingido o pico máximo de MDO, uma vez que essa ocorreu de forma mais precoce que nos camundongos controle, justificando assim os níveis mais baixos de catepsina K e RANKL. Da mesma forma, considerando que a osteoclastogênese tenha ocorrido de forma mais precoce nos camundongos Ctsk^{Cre/0} AMPK^{ff/ff}, a nossa hipótese é que, após 12 dias de MDO, a remodelação óssea nesses camundongos já havia sido concluída há mais tempo, de forma mais bem sucedida, observada pelos melhores parâmetros ósseos alveolares. Além disso, uma revisão recentemente publicada mostra que estudos têm visto um efeito de IL-6 também em osteoblastos (SIMS, 2021), os níveis aumentados dessa

citocina nos camundongos $Ctsk^{Cre/0} AMPK^{f/f}$ em tempos iniciais da aplicação da força ortodôntica pode estar associado a uma maior atividade de osteoblastos, levando ao maior volume ósseo e menor espaço entre as trabéculas encontrados nesses camundongos após a MDO.

Do mesmo modo, os camundongos com deleção seletiva de AMPK em osteoblastos, apesar de apresentarem uma menor MDO, tiveram uma piora dos parâmetros ósseos, principalmente na densidade mineral óssea, volume ósseo e espessura das trabéculas quando comparado aos controles. Corroborando com esses resultados de piora nos parâmetros ósseos alveolares, estudos *in vitro* têm mostrado que a ativação de AMPK em culturas celulares estimulam a diferenciação de osteoblastos e a mineralização de diferentes formas, pela inibição da via do mevalonato e estimulação da expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e da proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) (KANAZAWA et al., 2009), pela indução da expressão de RUNX2 (JANG et al., 2011), ou pela indução de autofagia (LI et al., 2018). Estudos *in vivo* mostraram que a deleção seletiva de AMPK em osteoblastos em camundongos adultos provocou uma redução no volume ósseo trabecular e cortical, bem como uma redução da resistência à fratura nos ossos longos desses animais (KANAZAWA et al., 2018a) e a deleção seletiva de AMPK em osteoblastos provocou retardo no desenvolvimento ósseo pós-natal, bem como redução no volume ósseo trabecular e cortical (KANAZAWA et al., 2018b). Uma vez que a literatura mostra que a ativação de AMPK em culturas de células levam a uma maior diferenciação de osteoblastos (KANAZAWA et al., 2009; JANG et al., 2011; LI et al., 2018), poderíamos levantar a hipótese de que a deleção de AMPK levou a uma menor diferenciação de osteoblastos, o que desencadeou em uma menor MDO, uma vez que uma menor diferenciação de osteoblastos desencadearia em uma menor diferenciação e ativação de osteoclastos, entretanto, mais experimentos seriam necessários para a investigação dessa hipótese.

Os dados obtidos nesse projeto nos despertam para a hipótese de que a AMPK desempenha um papel diferente na função dos osteoclastos no processo de remodelamento ósseo alveolar. Apesar disso, mais experimentos são necessários para determinar se de fato é a AMPK a responsável por essa resposta diferente no osso alveolar, visto que seu papel na função dos osteoblastos durante o remodelamento ósseo alveolar é similar aos dados encontrados na literatura em se tratando de ossos longos ou experimentos *in vitro*. Um outro fator a ser considerado

para investigação mais a fundo é a resposta inesperada frente ao estímulo de movimentação dentária ortodôntica nos camundongos com deleção seletiva de AMPK tanto em osteoclastos quanto em osteoblastos, não só na perspectiva do papel da AMPK, mas também nos processos envolvidos durante a movimentação dentária ortodôntica os quais poderiam desencadear uma resposta oposta aos dados de parâmetros ósseos.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Nos osteoclastos a AMPK possui um papel favorável à osteoclastogênese do osso alveolar, e nos osteoblastos essa proteína desempenha um papel osteoprotetor para o osso alveolar. Além disso, a AMPK parece ter um papel sobre os osteoclastos e osteoblastos especificamente durante a movimentação dentária ortodôntica. Portanto, o presente estudo instiga novas investigações acerca do papel da AMPK sobre o processo de remodelação óssea.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. ABZHANOV, A.; RODDA, S.J.; MCMAHON, A.P.; TABIN, C.J. Regulation of skeletogenic differentiation in cranial dermal bone. **Development**, v. 134, p. 3133-3144, 2007.
2. AGHALOO, T.L.; CHAICHANASAKUL, T.; BEZOUGLAIA, O.; KANG, B.; FRANCO, R.; DRY, S.M.; ATTI, E.; TETRADIS, S. Osteogenic potential of mandibular vs. Long-bone marrow stromal cells. **J. Dent. Res.**, v. 89, p.1293–1298, 2010.
3. AHN, J. et al. The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 373, n. 4, p. 545–549, 2008.
4. AKINTOYE, S.O.; LAM, T.; SHI, S.; BRAHIM, J.; COLLINS, M.T.; ROBEY, P.G. Skeletal site-specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals. **Bone**, v.38, p.758–768, 2006.
5. ANDERSON, D.J. Cellular and molecular biology of neural crest cell lineage determination. **Trends Genet.**, v. 13, p. 276–280, 1997.
6. ANDRADE JR, I. *et al.* The role of tumor necrosis factor receptor type 1 in orthodontic tooth movement. **J Dent Res.**, v. 86, n. 11, p. 1089-94, 2007.
7. BALA, Y.; FARLAY, D.; BOIVIN, G. Bone mineralization: from tissue to crystal in normal and pathological contexts. **Osteoporos Int.**, v. 24, n. 8, p. 2153-66, 2013.
8. BALOUL S.S. Osteoclastogenesis and Osteogenesis during tooth movement. **Front Oral Biol.**, v.2016, n.18, p. 75-9, 2016.
9. CHAI, Y.; MAXSON, R.E.JR. Recent advances in craniofacial morphogenesis. **Dev Dyn**, v. 235, n. 9, p. 2353-2375, 2006.
10. CHEN X; WANG Z; DUAN N; ZHU G; SCHWARZ E.M; XIE C. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connective Tissue Research*, v. 59, n. 2, p. 99-107, 2018. GUO C; YANG W; LOBE C.G. A Cre recombinase transgene with mosaic, widespread tamoxifen-inducible action. **Genesis**, n. 32, p. 8–18, 2002.
11. CHIU, W.S.; MCMANUS, J.F.; NOTINI, A.J.; CASSADY, A.I.; ZAJAC, J.D.; DAVEY, R.A. Transgenic mice that express Cre recombinase in osteoclasts. **Genesis**, v. 39, n. 3, p.178-85, 2004.
12. CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 3, n.3, p.S131-9, 2008
13. DATTA, H,K.; NG, W.F.; WALKER, J.A.; TUCK, S.P.; VARANASI, S.S. The cell biology of bone metabolism. **J Clin Pathol.**, v. 61, n. 5, p.577–587, 2008.

14. DAVIDOVITCH, Z. Tooth Movement. **Crit Rev Oral Biol Med.**, v. 2, n. 4, p. 411-50, 1991.
15. DE COSTER, P.J.; MORTIER, G.; MARKS, L.A.; MARTENS, L.C. Cranial suture biology and dental development: genetic and clinical perspectives. **J Oral Pathol Med.**, v. 36, p.447-455, 2007.
16. DUCY, P.; ZHANG, R.; GEOFFROY, V.; RIDALL, A.L.; KARSENTY, G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. **Cell**, v. 89, n.5, p. 747-754, 1997.
17. FALONI, A.P.S.; SCHOENMAKER, T.; AZARI, A.; KATCHBURIAN, E.; CERRI, P.S.; DE VRIES, T.J.; EVERTS, V. Jaw and long bone marrows have a different osteoclastogenic potential. **Calcif. Tissue Int.**, v. 88, p. 63–74, 2011.
18. FUJITA, T. *et al.* Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling. **J Cell Biol.**, v.166, n.1, p.85–95, 2004.
19. GARLET, T.P.; COELHO, U.; SILVA, J.S.; GARLET, G.P. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. **Eur J Oral Sci.**, 115:355e62, 2007.
20. GLANTSCHNIG, H.; FISHER, J.E.; WESOLOWSKI, G.; RODAN, G.A.; RESZKA, A.A. M-CSF, TNF α and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. **Cell Death Differ.**, v.10, n. 4, p.1165-1177, 2003.
21. HARDIE, D.G.; ROSS, F.A.; HAWLEY, S.A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v.13, p. 251–62, 2012.
22. HENNEMAN, S.; VON DEN HOFF, J.W.; MALTHA, J.C. Mechanobiology of tooth movement. **Eur J Orthod.**, v. 30, p. 299e306, 2008.
23. HOWARD, P.S.; KUCICH, U.; TALIWAL, R.; KOROSTOFF, J.M. Mechanical forces alter extracellular matrix synthesis by human periodontal ligament fibroblasts. **J Periodontal Res.**, v. 33, n. 8, p. 500e8, 1998.
24. HUANG, H.; WILLIAMS, R.C.; KYRKANIDES, S. Accelerated orthodontic tooth movement: molecular mechanisms. **Am J Orthod Dentofac Orthop.**, v. 146, p.620e32, 2014.
25. HUJA, S.S.; FERNANDEZ, S.A.; HILL, K.J.; LI, Y. Remodeling dynamics in the alveolar process in skeletally mature dogs. *Anat. Rec. Part A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* v. 288, p.1243–1249, 2006.
26. ISIK, F. *et al.* Bone marker levels in gingival crevicular fluid during orthodontic intrusive tooth movement: a preliminary study. **J Contemp Dent Pract.**, v.6, n.2, p. 27-35, 2005.

27. ISIK, F; SAYINSU K; ARUN T; UNLUÇERÇİ Y. Bone marker levels in gingival crevicular fluid during orthodontic intrusive tooth movement: a preliminary study. **J. Contemp. Dent. Pract.**, v.6, n.2, p. 27-35, 2005.
28. JANG, W.G.; KIM, E.J.; LEE, K.N.; SON, H.J.; KOH, J.T. AM P-activated protein kinase (AM PK) positively regulates osteoblast differentiation via induction of Dlx5-dependent Runx2 expression in MC 3T3E1 cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 404, n.4, p.1004-1009, 2011.
29. JEYABALAN J; SHAH M; VIOLLET B; CHENU C. AMP-activated protein kinase pathway and bone metabolism. **J Endocrinol.**, v. 2012, n. 212, p. 277-90, 2012.
30. JEYABALAN, J.; SHAH, M.; VIOLLET, B.; CHENU, C. AMP-activated protein kinase pathway and bone metabolism. **J Endocrinol.**, v. 212, p.277-90, 2012.
31. KANAZAWA, I.; TAKENO, A.; TANAKA, K.I.; NOTSU, M.; SUGIMOTO, T. Osteoblast AMP-activated protein kinase regulates glucose metabolism and bone mass in adult mice. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 503, n. 3, p.1955-1961, 2018.
32. KANAZAWA, I.; TAKENO, A.; TANAKA, K.I.; NOTSU, M.; SUGIMOTO, T. Osteoblast AMP-Activated Protein Kinase Regulates Postnatal Skeletal Development in Male Mice. **Endocrinology**, v. 159, n. 2, p. 597-608, 2018.
33. KANAZAWA, I.; YAMAGUCHI, T.; YANO, S.; YAMAUCHI, M.; SUGIMOTO, T. Activation of AMP kinase and inhibition of Rho kinase induce the mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells through endothelial NOS and BMP2 expression. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 296, n.1, p. e139–46, 2009.
34. KANAZAWA, I.; YAMAGUCHI, T.; YANO, S.; YAMAUCHI, M.; SUGIMOTO, T. Metformin enhances the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3–E1 cells via AMP kinase activation as well as eNOS and BMP-2 expression. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 375, p.414–9, 2008.
35. KANAZAWA, I.; YAMAGUCHI, T.; YANO, S.; YAMAUCHI, M.; SUGIMOTO, T. Activation of AM P kinase and inhibition of Rho kinase induce the mineralization of osteoblastic MC 3T3-E 1 cells through endothelial NO S and BMP-2 expression. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 296, p. E139-E 146, 2009.
36. 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. **J Biol Chem.**, v. 288, n. 17, p. 12187–12196, 2013.
37. KARAPLIS, A. Embryonic development of bone and the molecular regulation of intramembranous and endochondral bone formation. In: Principles of bone biology. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, editors. San Diego: **Academic Press**, v. 3, p. 33-58, 2002.
38. KASAI, T. *et al.* Osteoblast differentiation is functionally associated with decreased AMP kinase activity. **Cell Physiol.**, v. 221, p. 740–9, 2009.

39. KELDER, C.; KLEVERLAAN, C.J.; GILIJAMSE, M.; BAKKER, A.D.; DE VRIES, T.J. Cells Derived from Human Long Bone Appear More Differentiated and More Actively Stimulate Osteoclastogenesis Compared to Alveolar Bone-Derived Cells. **Int J Mol Sci.**, v. 21, n. 14, p. 5072, 2020.
40. KIM J; LIN C; STAVRE Z; GREENBLATT M.B; SHIM J. Osteoblast-osteoclast communication and bone homeostasis. **Cells**, v. 9, n.9 p. 2073, 2020.
41. KIM, E.K. *et al.* Human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by AMP-activated protein kinase. **J Cell Physiol.**, v. 227, p.1680–7, 2012.
42. KIM, J.; YANG, G.; KIM, Y.; KIM, J.; HA, J. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. **Exp Mol Med.**, v.48, n. 4, p. e224, 2016.
43. KIM, J.M.; JEONG, D.; KANG, H.K.; JUNG, S.Y.; KANG, S.S.; MIN, B.M. Osteoclast precursors display dynamic metabolic shifts toward accelerated glucose metabolism at an early stage of RANKL-stimulated osteoclast differentiation. **Cell Physiol Biochem.**, v. 20, p. 935-46, 2007.
44. KIMMEL, C.B.; WALKER, M.B.; MILLER, C.T. Morphing the hyomandibular skeleton in development and evolution. **J Exp Zool B Mol Dev Evol**, v. 308, p.609-624, 2007.
45. KOMORI, T.; YAGI, H.; NOMURA, S.; YAMAGUCHI, A.; SASAKI, K.; DEGUCHI, K., *et al.* Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. **Cell**, v. 89, n.5, p.755-764, 1997.
46. KRISHNAN, V.; DAVIDOVITCH, Z. Cellular, molecular, and tissue level reactions to orthodontic force. **Am J Orthod Dentofac Orthop.**, v.129, p. 469.e1e32, 2006.
47. KRISHNAN, V.; DAVIDOVITCH, Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*, v. 129, n. 4, p. 1-32, 2006.
48. KRISHNAN, V.; DAVIDOVITCH, Z. On a path to unfolding the biological mechanisms of orthodontic tooth movement. **J Dent Res**, v. 88, p. 597e608, 2009.
49. LAUDINO, M.; GARLET, T.P.; CARDOSO, C.R.; DE ASSIS, G.F.; TAGA, R.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S.; GARLET, G.P. Down-regulation of expression of osteoblast and osteocyte markers in periodontal tissues associated with the spontaneous alveolar bone loss of interleukin-10 knockout mice. **Eur J Oral Sci.**, v. 118, n. 1, p. 19-28, 2010.
50. LEE, Y. *et al.* AMP kinase acts as a negative regulator of RANKL in the differentiation of osteoclasts. **Bone**, v. 2010, n. 47, p. 926-37, 2010.
51. LENER, U.H. Osteoblasts, Osteoclasts, and Osteocytes:Unveiling Their intimate-associated responses to applied orthodontic forces. **Seminars in Orthodontics**, v. 18, n. 4, p. 237-48, 2012.

-
52. LI Y; JACOX L.A; LITTLE A.H; KO C. Orthodontic tooth movement: The biology and clinical implications. **Kaohsiung J Med Sci.**, v. 34, n. 4, p. 207-14, 2018.
53. LI, Y.; JACOX, L.A.; LITTLE, S.H.; KO, C.C. Orthodontic tooth movement: The biology and clinical implications. **Kaohsiung J Med Sci.**, v. 34, n. 4, p. 207-214, 2018.
54. LI, Y.; SU, J.; SUN, W.; CAI, L.; DENG, Z. AMP-activated protein kinase stimulates osteoblast differentiation and mineralization through autophagy induction. **Int J Mol Med.**, v. 41, n.5, p.2535-2544, 2018.
55. LICINI, C.; VITALE-BROVARONE, C.; MATTIOLI-BELMONTE, M. Collagen and non-collagenous proteins molecular crosstalk in the pathophysiology of osteoporosis. **Cytokine Growth Factor Rev.** v. 49, p. 59-69, 2019.
56. MADISEN, L., *et al.* A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain **Nat Neurosci.**, v. 13, n. 1, p. 133–140, 2010.
57. NAKASHIMA, K.; ZHOU, X.; KUNKEL, G.; ZHANG, Z.; DENG, J.M.; BEHRINGER, R.R., *et al.* The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. **Cell**, 108:17-29, 2002.
58. NIKLAS, A.; PROFF, P.; GOSAU, M.; ROMER, P. The role of hypoxia in orthodontic tooth movement. **Int J Dent.**, 841840, 2013.
59. OH, S.J.; GU, D.R.; JIN, S.H.; PARK, K.H.; LEE, S.H. Cytosolic malate dehydrogenase regulates RANKL-mediated osteoclastogenesis via AMPK / c-FOS / NFATc1 signaling. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.2016, n. 475, p. 125-32, 2016.
60. OTTO, F.; THORNELL, A.P.; CROMPTON, T.; DENZEL, A.; GILMOUR, K.C.; ROSEWELL, I.R., *et al.* Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. **Cell**, v. 89, p.765-771, 1997.
61. PANTOVIC, A. *et al.* Coordinated time-dependent modulation of AMPK/Akt/mTOR signaling and autophagy controls osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Bone**, v. 52, p. 524–31, 2013.
62. PARK, H.J.; BAEK, K.H.; LEE, H.L.; KWON, A.; HWANG, H.R.; QADIR, A.S., *et al.* Hypoxia inducible factor-1alpha directly induces the expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in periodontal ligament fibroblasts. **Mol Cells.**, v. 31, n. 6, p. 573e8, 2011.
63. PARK, S.H. *et al.* Metformin coordinates osteoblast/osteoclast differentiation associated with ischemic osteonecrosis See-Hyoung. **Aging (Albany NY)**. v. 12, n. 6, p. 4727–4741, 2020.

64. PENG, L.Y.; CHENG, T.; YUAN, W.P. Commonly used cre transgenic mice and their applications in hematopoietic system. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.**, v. 22, n. 5, p. 1442-7, 2014.
65. PHAN, T.C.A.; XU, J.; ZHENG, M.H. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. **Histol Histopathol.**, v.19, n.9, p.1325-44, 2004.
66. RAGGATT, L.J.; PARTRIDGE, N.C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. **J Biol Chem.**, v. 285, n. 33, p. 25103-8, 2010.
67. REN, Y.; VISSINK, A. Cytokines in crevicular fluid and orthodontic tooth movement. **Eur J Oral Sci.**, v. 116, p.89e97, 2008.
68. ROBLING, A.G.; CASTILLO, A.B.; TURNER, C.H. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. **Annu Rev Biomed Eng.**, v.8, p. 455–498, 2006.
69. SHAH, M. *et al.* AMP-activated protein kinase (AMPK) activation regulates in vitro bone formation and bone mass. **Bone**, v. 47, p. 309–19, 2010.
70. SIMS, N.A. Influences of the IL-6 cytokine family on bone structure and function. **Cytokine**, v. 146, p.155655, 202.
71. SODEK, J.; MCKEE, M.D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontol**, v. 24, p. 99-126, 2000.
72. SROGA, G.E.; VASHISHTH, D. Effects of bone matrix proteins on fracture and fragility in osteoporosis. **Curr Osteoporos Rep**. v. 10, n. 2, p. 141-50, 2012.
73. TADDEI, S.R. *et al.* The Role of CCR2 in Orthodontic Tooth Movement. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, v. 141, n. 2, p. 153-60, 2012.
74. TAKAHASHI, N.; UDAGAWA, N.; SUDA, T. A New Member of Tumor Necrosis Factor Ligand Family , ODF / OPGL / TRANCE / RANKL , Regulates osteoclast differentiation and function. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 256, n. 3, p. 449-55, 1999.
75. TEITELBAUM, S.L.; ROSS, F.P. Genetic regulation of osteoclast development and function. **Nature reviews Genetics**, v. 4, n. 8, p. 638-49, 2003.
76. TIEDEMANN, K.L.E.; NIHOJANNEN, D.; FONG, J.E.; HUSSEIN, O.; BARRALET, J.E.; KOMAROVA, S.V. Regulation of Osteoclast Growth and Fusion by mTOR/raptor and mTOR/riCTOR/. **Front Cell Dev Biol.**, v.5, p.54, 2017.
77. WAN, Q.; SCHOENMAKER, T.; JANSEN, I.D.C.; BIAN, Z.; DE VRIES, T.J.; EVERTS, V. Osteoblasts of calvaria induce higher numbers of osteoclasts than osteoblasts from long bone. **Bone**, v. 86, p. 10–21, 2016.
78. WAN, Q.; SCHOENMAKER, T.; JANSEN, I.D.C.; BIAN, Z.; DE VRIES, T.J.; EVERTS, V. Osteoblasts of calvaria induce higher numbers of osteoclasts than osteoblasts from long bone. **Bone**, v. 86, p.10–21, 2016.

79. WANG, C.; LIN, K.; CHANG, J.; SUN, J. Osteogenesis and angiogenesis induced by porous CaSiO/PDLGA composite scaffold via activation of AMPK/ERK1/2 and PI3K/Akt pathways. **Biomaterials**, v. 34, p. 64–77, 2013.
80. WANG, Y.G. *et al.* Functional differences between AMPK alpha1 and alpha2 subunits in osteogenesis, osteoblast-associated induction of osteoclastogenesis, and adipogenesis. **Scientific Reports**, v. 6, p. 32771, 2016.
81. WISE, G.E.; KING, G.J. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. **J Dent Res**, v. 87, p. 414e34, 2008.
82. ZHANG, Q.; CHEN, B.; YAN, F.; GUO, J.; ZHU, X.; MA, S.; YANG, W. Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. **Biomed Res Int.**, 284836, 2014.

ANEXO

ANEXO



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO

Certificamos a proposta intitulada "Papel da AMPK sobre a remodelação óssea em modelo experimental de movimentação dentária", registrada sob nº 19.1.782.60.2, sob a responsabilidade de Leticia Fernanda Duffles Rodrigues e Sandra Yasuyo Fukada Alves, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada na reunião de 03/12/2019 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica			
Vigência da Autorização	15/12/2019 a 30/09/2022			
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo <i>Knockout</i>			
	Ctsk ^{Cre00}	Ctsk ^{CreAMPK^{fl/fl}}	Col2a1 ^{Cre00}	Col2a1 ^{CreAMPK^{fl/fl}}
Nº de animais	56	56	56	56
Peso/Idade	18-20 g/ 6-8 semanas			
Sexo	Macho			
Origem	Biotério da FCFRP I			

Ribeirão Preto, 04 de dezembro de 2019.


Ana Patrícia Yatsuda Natsui
 Coordenadora da CEUA-FCFRP