

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

Mariana de Souza Santos

**O PAPEL DA FOSFATIDILINOSITOL-3-CINASE (PI3K) NA REMODELAÇÃO
DOS OSSOS MAXILARES**

Belo Horizonte

2020

Mariana de Souza Santos

**O PAPEL DA FOSFATIDILINOSITOL-3-CINASE (PI3K) NA REMODELAÇÃO
DOS OSSOS MAXILARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Profa. Dra. Soraia Macari

Belo Horizonte

2020

043

Santos, Mariana de Souza.

O papel da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) na remodelação dos ossos maxilares [manuscrito] / Mariana de Souza Santos. – 2020.

69 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Soraia Macari.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Remodelação Óssea. 3. Arcada Osseodentária. 4. Fosfatidilinositol 3-Quinases. 5. Osteoclastos. 6. Osteoblastos. I. Macari, Soraia. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

MARIANA DE SOUZA SANTOS

229/2020
entrada
2º/2018
2018717051

Às nove horas do dia 30 de outubro de 2020, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "O PAPEL DA FOSFATIDILINOSITOL-3-CINASE (PI3K) NA REMODELAÇÃO DOS OSSOS MAXILARES", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Soraia Macari**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Soraia Macari	UFMG	APROVADA
Dra. Luciano José Pereira	UFLA	APROVADA
Dra. Gleide Fernandes de Avelar	UFMG	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 30 de outubro de 2020.**

Dr^a. Soraia Macari (Orientadora)

Dra. Luciano José Pereira

Dr^a. Gleide Fernandes de Avelar

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Erika Cristina Jorge
Coordenadora do Programa de Pós Graduação
em Biologia Celular ICB/UFMG

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Soraia Macari, orientadora deste trabalho, por todo conhecimento compartilhado com muita paciência e dedicação, pela confiança e pelo carinho.

À Profa. Tarcília Silva pela colaboração.

Ao Prof. Flávio Amaral por ceder seu espaço e animais para elaboração deste trabalho.

Aos funcionários e técnicos do ICB, e da FaO-UFMG especialmente Domênico, Mara e Dani.

A todos os professores e equipe do Colegiado de Pós-Graduação em Biologia Celular.

Aos meus queridos colegas de caminhada: Janine Silva, Isabella Bittencourt, Sicília Oliveira, Livia Barroso, Alessandra Souza, Bianca Duffles, José Alcides, Tatiana Fernandes, Natália Couto, agradeço a convivência prazerosa ao longo desses anos.

À minha amada família. Meus pais, Valdir e Germânia, agradeço por acreditarem que a educação é o caminho. À minha companheira e irmã, Sabrina, amo vocês.

Às minhas amigas Mayla e Joana por estarem comigo nessa jornada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

A Deus por me dar além do que preciso.

O anti-intelectualismo tem sido uma ameaça constante se insinuando na nossa vida política e cultural, alimentado pela falsa noção de que a democracia significa que “a minha ignorância é tão boa quanto o seu conhecimento”.

Isaac Asimov

RESUMO

Introdução: O osso é um tecido dinâmico que sofre remodelação fisiológica constante. O processo de remodelação óssea é coordenado por diversos fatores locais e sistêmicos, e a fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) tem sido associada a função das células ósseas. Entretanto, não há estudos que demonstrem a relação da PI3K γ no processo de remodelação óssea induzida na maxila. **Objetivo:** Investigar o papel da PI3K γ no processo de remodelação óssea mecanicamente induzida do osso maxilar. **Métodos:** Neste estudo foram utilizados camundongos machos C57BL6/J selvagens (WT), camundongos machos deficientes para PI3K γ (PI3K $\gamma^{-/-}$), e camundongos machos com perda da atividade cinase da enzima PI3K γ (PI3K $\gamma^{KD/KD}$). A indução da remodelação óssea foi realizada de duas maneiras: por meio de movimentação dentária ortodôntica (OTM) pela instalação de uma mola posicionada entre o primeiro molar superior direito e os incisivos centrais, e por meio da expansão rápida da maxila (ERM) pela instalação de disjuntor palatino posicionado nos molares. Após a eutanásia, as maxilas foram analisadas por microtomografia computadorizada (microCT), análise histomorfométrica, análise da expressão gênica de marcadores de osteoblastos (OBL), osteoclastos (OCL) e moléculas inflamatórias por reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), a via de sinalização PI3K foi avaliada por Western blot. Os fêmures foram analisados por microCT, e as células da medula óssea foram diferenciadas em OBL e OCL em cultura de células. **Resultados:** Os ossos maxilares e palatinos dos animais PI3K $\gamma^{-/-}$ e PI3K $\gamma^{KD/KD}$ demonstraram aumento da microarquitetura óssea comparados com os animais WT. Após a indução da remodelação óssea nos animais PI3K $\gamma^{-/-}$ verificou-se redução da OTM e ERM, com maior número de OBL e menor contagem de OCL nos ossos maxilares após OTM. Corroborando com estes achados, houve aumento dos marcadores de formação óssea, *Runx2* e *Alp*, redução do gene pró-inflamatório *Il-6*, assim como falta de responsividade a genes indutores da reabsorção óssea como *Rankl*. Os ossos maxilares dos animais PI3K $\gamma^{-/-}$ apresentaram menor atividade da proteína da via de sinalização p-Akt. A raiz dentária e o fêmur dos animais PI3K $\gamma^{-/-}$ apresentaram fenótipo semelhante ao do osso maxilar. A cultura celular revelou uma maior área de mineralização por osteoblastos nas células dos animais PI3K $\gamma^{-/-}$ e menor diferenciação de osteoclastos. A ausência de PI3K γ proporcionou aumento da microarquitetura óssea e radicular demonstrando ser uma importante molécula na diferenciação e cascata de sinalização das células ósseas. Os dados obtidos poderão ser úteis para conduzir futuras estratégias terapêuticas na modulação óssea.

Palavras-chave: remodelação óssea; maxila; fosfatidilinositol-3-cinase; osteoclasto; osteoblasto.

ABSTRACT

Introduction: Bone is a dynamic tissue that undergoes constant physiological remodeling. The bone remodeling process is coordinated by several local and systemic factors, and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) has been associated with bone cell function. However, as far as we are concerned, there are no studies that investigated PI3K γ function on induced bone remodeling in the maxilla. **Aim:** To investigate the role of PI3K γ in the mechanically induced bone remodeling. **Methods:** In this study, male wild C57BL6 / J (WT) mice, male mice deficient for PI3K γ (PI3K γ ^{-/-}), and male mice with loss of the kinase activity of the enzyme PI3K γ (PI3K γ ^{KD/KD}). The induction of bone remodeling was performed by orthodontic tooth movement (OTM). A spring was installed and positioned between the first right upper molar and the central incisors, and opening loops were positioned on the molars with aim of rapid maxillary expansion (RME). After euthanasia, the jaws were analyzed by computerized microtomography (microCT), histomorphometric and gene expression was performed for osteoblast markers (OBL), osteoclasts (OCL), and inflammatory molecules by polymerase chain reaction (RT-PCR). The PI3K signaling pathway was evaluated by Western blot. The femurs were analyzed by microCT and bone marrow cells were differentiated into OBL and OCL. **Results:** The maxillary and palate bones of PI3K γ ^{-/-} and PI3K γ ^{KD/KD} animals showed an increase in bone microarchitecture compared with WT animals. After inducing bone remodeling in PI3K γ ^{-/-} animals, there was a reduction in OTM and RME, with a greater number of OBL and a lower OCL count in the maxillary bones after OTM. Corroborating these findings, there was an increase in bone formation markers, Runx2 and Alp, a reduction in the pro-inflammatory gene Il-6, as well as a lack of responsiveness to bone resorption inducing genes such as Rankl. The maxillary bones of PI3K γ ^{-/-} animals showed less protein activity in the p-Akt signaling pathway. The tooth root and femur of the PI3K γ ^{-/-} animals showed a phenotype similar to that of the maxillary bone. Cell culture revealed a greater area of osteoblast mineralization in the cells of PI3K γ ^{-/-} animals and less differentiation of osteoclasts. The absence of PI3K γ provided an increase in bone and root microarchitecture, proving to be an important molecule in the differentiation and signaling cascade of bone cells. The data obtained are fundamental in order to conduct future therapeutic strategies in bone modulation.

Keywords: bone remodeling; jaw; phosphatidylinositol-3-kinase; osteoclast; osteoblast.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via de sinalização Wnt/ β -catenina.....	18
Figura 2 – Via de sinalização RANK-RANKL/OPG.....	20
Figura 3 – Estrutura do osteoclasto e processo de reabsorção.....	21
Figura 4 – Via de sinalização PI3K/AKT.....	23
Figura 5 – Instalação de mola ortodôntica.....	30
Figura 6 – Instalação de disjuntor palatino.....	31
Figura 7 – Esquema de corte da maxila para histologia.....	34
Figura 8 – Histologia HE junção cimento-esmalte.....	35
Figura 9 – Análise microCT microarquitetura óssea da maxila.....	40
Figura 10 – Análise ABC-CEJ.....	41
Figura 11 – Análise da região de sutura palatina mediana sem disjunção.....	42
Figura 12 – Análise expansão de sutura palatina mediana.....	44
Figura 13 – Análise da área da sutura palatina mediana.....	44
Figura 14 - Análise da região de sutura palatina mediana com disjunção.....	45
Figura 15 – Análise microCT OTM.....	46
Figura 16 – Análise histomorfometria OTM.....	46
Figura 17 – Análise histológica - contagem de osteoblastos.....	47
Figura 18 - Análise histológica - contagem de osteoclastos.....	48
Figura 19 – Análise de expressão gênica.....	49
Figura 20 – Western Blot.....	50
Figura 21 – Análise radicular 3D sem movimentação ortodôntica.....	50
Figura 22 - Análise radicular 3D com movimentação ortodôntica.....	51
Figura 23 - Análise histológica - contagem de odontoclastos.....	51

Figura 24 - Análise microCT microarquitetura óssea do fêmur.....	53
Figura 25 - Cultura de osteoblastos.....	54
Figura 26 - Cultura de osteoclastos.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC - Do inglês, *Alveolar bone crests* (Crista óssea alveolar)

AKT - Proteína quinase B

ALP - Fosfatase alcalina

ATP - Trifosfato de adenosina

α -MEM - Do inglês, *α -Minimal essential medium* (Meio mínimo essencial alfa)

BMD - Densidade mineral óssea

BV - Volume ósseo

BV/TV% - Porcentagem de volume ósseo/volume total

CCL2 - Proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1)

CCL3 - Proteína inflamatória de macrófagos-1 α (MIP-1 α)

CCL5 - Ligante 5 de CC quimiocina

cDNA - Do inglês, *Complementary deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico complementar)

CEJ- Do inglês, *cemento-enamel junction* (Junção cimento esmalte)

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

c-Fms - Receptor do fator 1 estimulador de colônias

CO₂ - Gás carbônico

CTH – Células tronco hematopoiéticas

CXCL8 – Proteína ligante 8 de quimiocina

CXCL12 - Fator derivado do estroma da medula óssea

CXCR2 - Receptor de quimiocina CXC tipo 2

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERM – Expansão rápida da maxila

GAPDH - Do inglês, *Glycer-aldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)

GPCR – Receptor acoplado a proteína G

GSK-3 - glicogênio sintase quinase 3

HE – Hematoxilina e eosina

IL-1 – Interleucina-1

IL-1 β – Interleucina 1beta

IL-6 - Interleucina-6

IL-8 – Interleucina-8

IL-10 - Interleucina-10
IL-37- Interleucina-37
IS – Superfície de interseção
kg – Quilograma
KO – Knockout
kV - Kilovolt
LP – Ligamento periodontal
M-CSF – Fator estimulante de colônia de macrófagos
mTORC2 - Complexo alvo de rapamicina de mamíferos 2
mg - Miligrama
microTC - Microtomografia computadorizada
ml - Mililitro
mm - Milímetro
mTOR – Complexo alvo de rapamicina de mamíferos
 μ M - Micromolar
 μ m - Micrômetro
 μ g - Microgramas
 μ l – Microlitro
NF κ B – Fator nuclear kappa B
NiTi- Níquel-Titânio
N – Newtons
nm – Nanômetro
NO- óxido nítrico
OPG - Osteoprotegerina
OPN - Osteopontina
OTM – Do inglês, *Orthodontic tooth movement* (Movimentação dentária ortodôntica)
OBL – Osteoblasto
OCL – Osteoclasto
OC - Osteocalcina
PDK1 - Proteína cinase-1 dependente de 3-fosfoinosídeo
PDGFR α - Receptor A do fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE₂ – Prostaglandina E₂
PH - Domínios de Homologia à Plecstrina
PHLPP - Domínio de PH e proteína fosfatase de repetição rica em leucina

PI3K – Fosfatidilinositol-3-cinase
PI3K/Akt - Fosfatidilinositol-3-cinase/serina-treonina cinase
PI3K $\gamma^{-/-}$ - Animais deficientes para PI3K γ
PI3K $\gamma^{KD/KD}$ - Animais com perda da atividade de PI3K γ
PIP2 – Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3 - Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PTEN - Fosfatase e tensina homólogo
RT-PCR - Do inglês, *Reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase)
RANK - Ativador do fator nuclear kappa B
RANKL - Ligante para o receptor ativador de fator nuclear-kappa B
RNA - Do inglês, *Ribonucleic Acid* (Ácido ribonucléico)
RUNX2 - Fator de transcrição relacionado ao runt 2
RTKs – Receptores tirosina cinase
SFB - Soro fetal bovino
SMI – Índice de modelo estrutural
Tb.N – Número de trabéculas
Tb.Sp – Separação das trabéculas
Tb.Th – Espessura das trabéculas
TGF- β – Fator de crescimento transformante beta
TGF- β 1 – Fator de crescimento transformante beta 1
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
TRAP - Fosfatase ácida resistente ao tartarato
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
WT – Do inglês, *Wild type* (animal selvagem)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
TECIDO ÓSSEO	17
CÉLULAS ÓSSEAS.....	17
Células mesenquimais indiferenciadas	17
Osteoblastos	17
Osteócitos.....	19
Osteoclastos	19
REMODELAÇÃO ÓSSEA	21
VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K.....	22
MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA ORTODÔNTICA (OTM)	24
EXPANSÃO RÁPIDA DA MAXILA (ERM)	26
3 OBJETIVOS GERAIS.....	28
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
5 MATERIAIS E MÉTODOS	29
Animais.....	29
Indução da remodelação óssea por meio da movimentação dentária induzida (OTM).....	29
Expansão rápida da maxila (ERM).....	30
Microtomografia computadorizada (microCT).....	31
Processamento histológico.....	33
Análise histomorfométrica.....	34
Medida da movimentação dentária ortodôntica (OTM)	34
Contagem de osteoblastos.....	35
Contagem de osteoclastos no osso alveolar e odontoclastos na superfície radicular	35
Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).....	36
Western Blot	37
Cultura de células.....	37
Isolamento de células da medula óssea.....	37
Cultura de osteoclastos	38
Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP).....	38
Cultura de osteoblastos	39
Avaliação da formação de matriz mineralizada por vermelho de alizarina.....	39
ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
6 RESULTADOS	40

7 DISCUSSÃO	55
8 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXO	69

1 INTRODUÇÃO

O osso é um tecido altamente dinâmico que está em constante processo de remodelação para manutenção da saúde do esqueleto. Este processo é coordenado por diversos fatores locais e sistêmicos sendo de suma importância a compreensão dos mecanismos envolvidos na diferenciação, recrutamento e ativação das células ósseas (TRESGUERRES et al., 2020).

O movimento dentário, durante o tratamento ortodôntico, é realizado pelo remodelamento do osso alveolar em resposta à força mecânica, gerando área de tensão e compressão do ligamento periodontal (LP) (LI et al., 2018). Como resultado dessa carga mecânica, é gerada uma resposta inflamatória aguda asséptica, com liberação de mediadores químicos, tais como: citocinas, quimiocinas e metabólitos do ácido araquidônico. Citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8), são liberadas e exercem uma função importante na movimentação dentária ortodôntica, regulando a diferenciação de osteoblastos (OBL) e osteoclastos (OCL) (MEIER et al., 1989). Fatores que possam interferir na produção de citocinas, função de células do sistema imune, e células ósseas podem desempenhar efeitos na taxa de remodelação óssea e movimentação dentária. A via da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) está relacionada com a atividade de diferentes tipos celulares (GHIGO et al., 2010; VANHAESEBROECK et al., 2001), estando envolvida na cascata de diferenciação de osteoblastos (MUKHERJEE; ROTWEIN, 2009), no desenvolvimento do citoesqueleto dos osteoclastos (CHELLAIAH et al., 1998; CHELLAIAH; HRUSKA, 1996; LAKKAKORPI et al., 1997; PILKINGTON; SIMS; DIXON, 1998), e atividade de leucócitos (OKKENHAUG; VANHAESEBROECK, 2003).

As PI3Ks produzem segundos mensageiros lipídicos que são responsáveis por realizarem o controle de um conjunto de vias de sinalização intracelular que são responsáveis por várias funções celulares, tais como: crescimento e proliferação celular, adesão, migração bem como sobrevivência e apoptose (ROMMEL; CAMPS; JI, 2007). Tendo em vista a importância da PI3K tanto na atividade e desenvolvimento de osteoblastos, osteoclastos e células do sistema imune, e sendo estas células diretamente envolvidas no processo de remodelação do osso maxilar durante tratamentos ortodônticos, fica claro a importância de elucidar do papel dessa enzima no controle da homeostase óssea maxilar.

Ainda não há relatos na literatura de quais efeitos a PI3K pode exercer nos ossos maxilares e compreender a biologia básica da remodelação óssea é um fator importante para o esclarecimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos durante o tratamento ortodôntico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado, composto por células e matriz extracelular que se apresenta calcificada. As células que compõe esse tecido são células mesenquimais indiferenciadas, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. A parte orgânica da matriz óssea é composta em sua maioria por colágeno do tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas. A matriz inorgânica é constituída por fosfato de cálcio que se apresenta na forma de cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ (ROSS e PAWLINA, 2016).

CÉLULAS ÓSSEAS

Células mesenquimais indiferenciadas

As células tronco mesenquimais podem dar origem a diferentes tipos celulares conforme o estímulo recebido. Para que ocorra a diferenciação em osteoblastos, essas células recebem o estímulo do fator de transcrição relacionado ao runt 2 (*Runx2/Cbfa1*). Essa proteína controla a diferenciação, proliferação e maturação dos osteoblastos, além de regular vários outros genes que são responsáveis pelo desenvolvimento de células osteogênicas (JENSEN; GOPALAKRISHNAN; WESTENDORF, 2010; KARSENTY, 2000).

Após a ativação do *Runx2*, as células tronco mesenquimais se diferenciam em pré-osteoblastos. A diferenciação de pré-osteoblastos em osteoblastos se dá em 3 etapas, e cada uma é caracterizada por uma expressão específica de marcadores moleculares. Na primeira etapa as células em proliferação expressam fibronectina, colágeno, fator de crescimento transformante β 1 (TGF β -1) e osteopontina (OPN). Na segunda etapa começa a diferenciação e a expressão de fosfatase alcalina (ALP) e colágeno. Na terceira etapa ocorre a mineralização da matriz extracelular (RUTKOVSKIY; STENSLØKKEN; VAAGE, 2016).

Osteoblastos

Os osteoblastos se apresentam morfológicamente como células de citoplasma basófilo, cuboides quando estão em intensa atividade, e são encontrados na superfície do tecido ósseo (RUTKOVSKIY; STENSLØKKEN; VAAGE, 2016). Essas células são responsáveis por secretar a parte orgânica da matriz óssea. Os OBLs produzem colágeno tipo I, proteínas de ligação do cálcio como osteocalcina, osteonectina, e fazem o controle da mineralização da matriz extracelular através da expressão de fosfatase alcalina (JENSEN; GOPALAKRISHNAN; WESTENDORF, 2010; VIMALRAJ, 2020). Quando essas células se tornam envolvidas pela matriz extracelular que produzem, elas se diferenciam em osteócitos.

Importante via de sinalização que regula a formação óssea por osteoblastos é a Wnt/ β -catenina. Wnt (proteína *Wingless*) por meio de ativação da β -catenina estimula a proliferação e diferenciação dos osteoblastos. Wnt se liga a um complexo de receptores incluindo o receptor *frizzled* (Fz) e os co-receptores proteína relacionada ao receptor de LDL5/6, resultando na ativação da proteína *dishevelled* que inibe a atividade da glicogênio sintase cinase 3 β (GSK-3 β). Quando ocorre ausência de ligação ao ligante, GSK-3 β fosforila a β -catenina o que gera sua ubiquitinação com posterior degradação via proteassoma. Quando ocorre a inibição de GSK-3 β , a β -catenina se transloca para o núcleo se ligando a fatores de transcrição iniciando assim a diferenciação dos osteoblastos. Osteócitos são capazes de inibir a formação óssea através da liberação de esclerostina, uma proteína que inibe a via Wnt/ β -catenina, estimulando o ligante para o receptor ativador de fator nuclear-kappa B (RANKL) derivado de osteócitos favorecendo a reabsorção óssea (BARON; KNEISSEL, 2013; KULAR et al., 2012; TRESGUERRES et al., 2020).

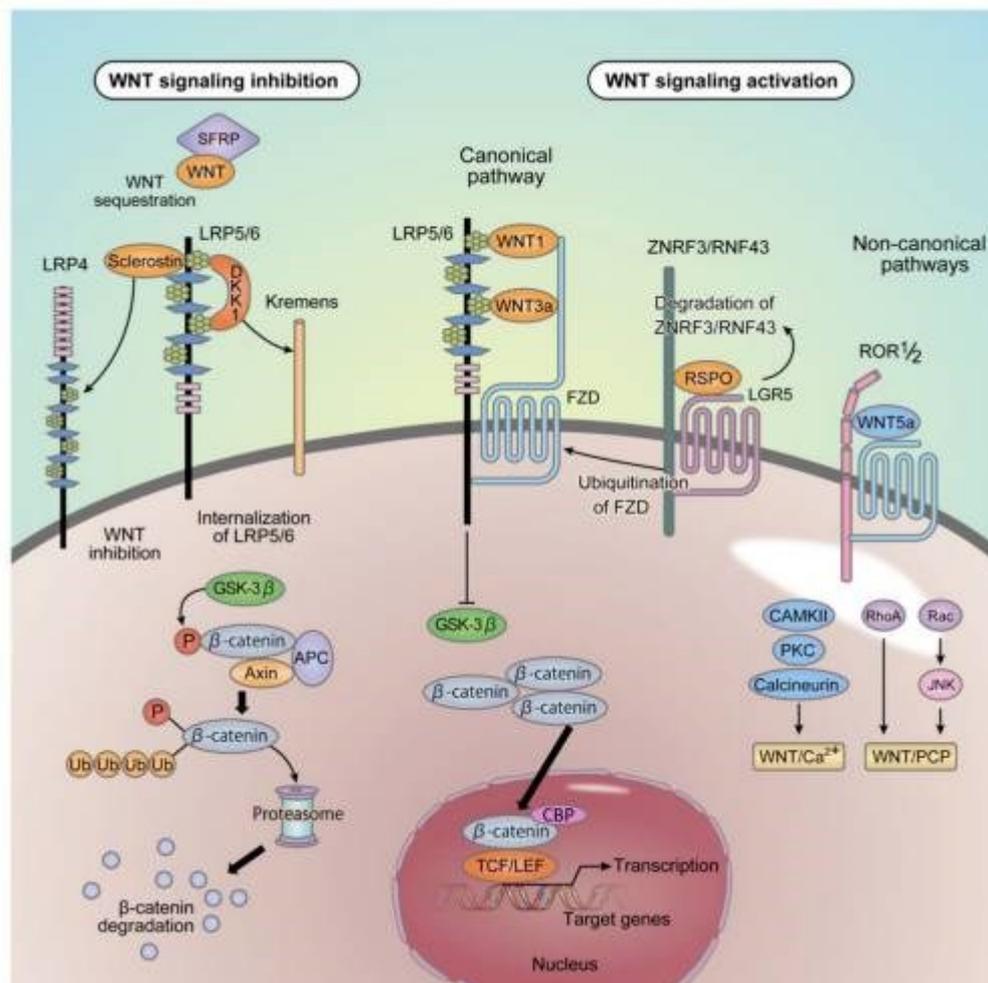


Figura 1 – Via de sinalização Wnt/ β -catenina (MAEDA et al., 2019).

Os osteoblastos desempenham papel importante no recrutamento, diferenciação e regulação da atividade dos osteoclastos, por meio de sinalização parácrina ou interação direta entre estes dois tipos celulares. Os principais reguladores da diferenciação de osteoclastos regulados pelos osteoblastos são: o fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF), RANKL, e a osteoprotegerina (OPG) (KATAGIRI; TAKAHASHI, 2002).

Osteócitos

Os osteócitos estão localizados em lacunas dentro da matriz óssea mineralizada. Essas células apresentam prolongamentos enviados pelos canalículos, e se comunicam com os prolongamentos dos osteócitos vizinhos através de junções comunicantes (junções GAP). O fluido canalicular é o responsável por manter a viabilidade dessa célula fornecendo oxigênio e nutrientes. Essa célula desempenha papel na regulação da atividade de osteoblastos através da liberação de moléculas de sinalização como óxido nítrico (NO) e prostaglandina E₂ (PGE₂) em resposta a estímulos mecânicos que produzem efeitos anabólicos diretos sobre os OBL (ROCHEFORT; PALLU; BENHAMOU, 2010) e osteoclastos (DALLAS; PRIDEAUX; BONEWALD, 2013), através da expressão de RANKL e OPG (SILVESTRINI et al., 2005).

Osteoclastos

A origem dos osteoclastos ocorre por meio da fusão de monócitos da corrente sanguínea (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; HUANG et al., 2006), que por sua vez, são responsáveis por reabsorver o tecido ósseo mineralizado (TEITELBAUM, 2000).

O sistema RANK-RANKL/OPG é uma das principais vias de diferenciação dos osteoclastos, no entanto, estudos indicaram a participação de diversos mediadores inflamatórios e/ou hormonais na osteoclastogênese (AOKI et al., 2010; IMAI et al., 2010). O M-CSF expresso por osteoblastos e células estromais, e o RANKL encontrado na membrana plasmática dos osteoblastos são indispensáveis para que ocorra a diferenciação de progenitores de osteoclastos. Este processo de diferenciação do osteoclasto é realizado quando M-CSF e RANKL ligam-se aos seus respectivos receptores, o receptor do fator 1 estimulador de colônias (c-Fms) e o receptor ativador do NF-kappa B (RANK) expressos nos precursores de osteoclastos (BOYCE; XING, 2008; HSU et al., 1999; TANAKA et al., 1993). A osteoprotegerina (OPG), também chamada de fator inibidor da osteoclastogênese, é um receptor solúvel do RANKL expresso por osteoblastos que regula negativamente a diferenciação dos osteoclastos através da interrupção da interação OBL-OCL (SIMONET et al., 1997).

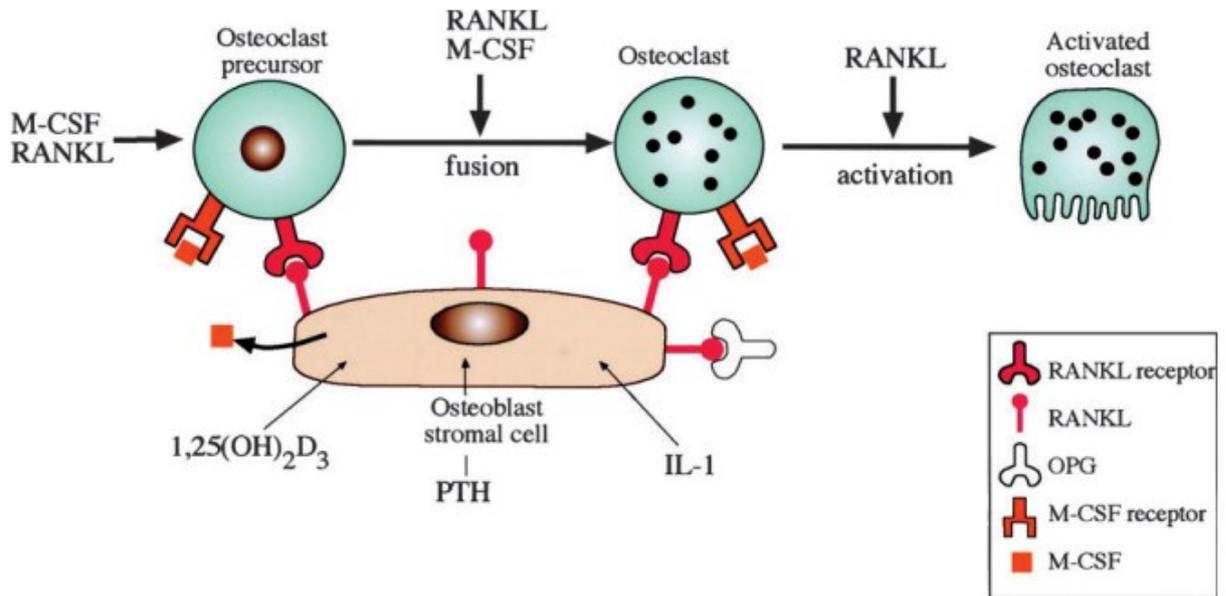


Figura 2 – Via de sinalização RANK-RANKL/OPG (MEIKLE, 2006).

Os osteoclastos ocupam regiões de depressões rasas no tecido ósseo chamadas lacunas de Howship. Essas células se tornam polarizadas após se ligarem ao osso, e seus núcleos se encontram na superfície anti-reabsortiva. A superfície reabsortiva dessa célula é chamada borda pregueada, e é a região celular diretamente envolvida no processo de reabsorção óssea. A borda pregueada é formada pelo anel de actina, que é responsável pela formação de uma região denominada zona de vedação que promove um microambiente isolado altamente acidificado, no qual os componentes da matriz óssea são degradados por meio da liberação de prótons H⁺ que acidificam o meio, e enzimas líticas como a catepsina K e metaloproteinases (BARON et al., 1985; NOVACK; FACCIO, 2011; NOVACK; TEITELBAUM, 2008).

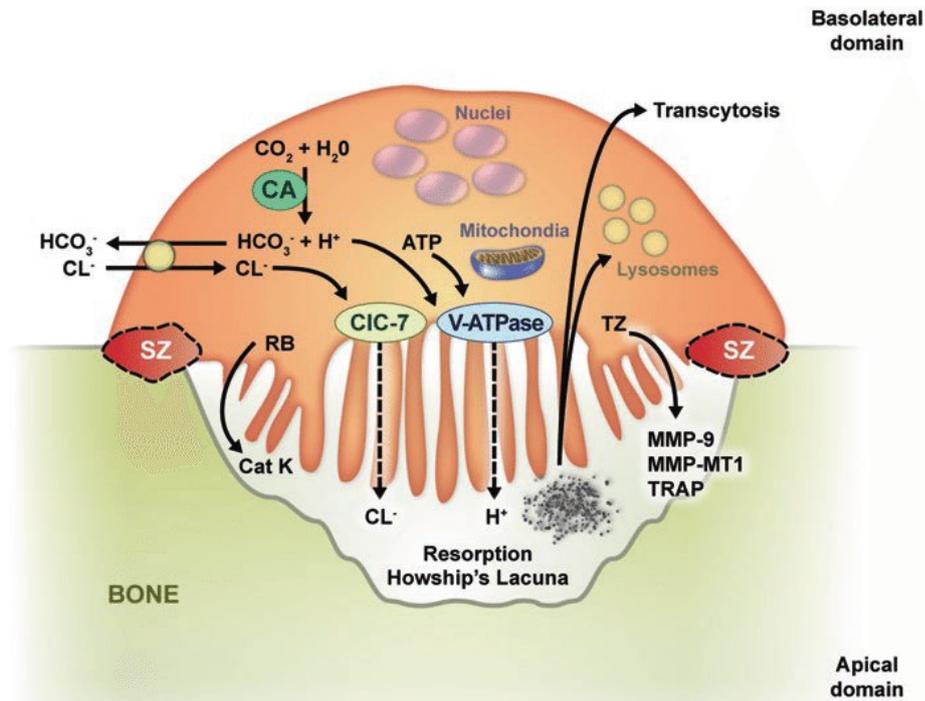


Figura 3 – Estrutura do osteoclasto e processo de reabsorção demonstrando a zona de vedação (SZ), borda pregueada (RB), núcleos e lacuna de Howship (GASSER; KNEISSEL, 2017).

REMODELAÇÃO ÓSSEA

A remodelação óssea promove a renovação do osso através da reabsorção e deposição do tecido ósseo e depende de um equilíbrio entre formação de osso por osteoblastos e reabsorção por osteoclastos (GOLDRING, 2003). Esse processo é fortemente influenciado por fatores sistêmicos e locais (ERIKSEN, 2010) dentre eles, alterações relacionadas ao desgaste fisiológico e patológico, mudança de carga mecânica recebida pelo osso causadas por alterações de peso ou prática de atividades físicas, e uma série de mediadores como fatores de crescimento, hormônios, quimiocinas e citocinas (BOYCE; XING, 2008; BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; GOLDRING, 2003; HSU et al., 1999; PEREIRA et al., 2020; YANO et al., 2005), sendo estes, portanto, responsáveis por controlar a proliferação, recrutamento, diferenciação, atividade e sobrevivência das células ósseas (RAGGATT; PARTRIDGE, 2010). As principais células envolvidas nesses eventos são os osteócitos, osteoblastos e osteoclastos.

Entre as várias cascatas de sinalização envolvidas no processo de remodelação óssea, existem indícios consideráveis de que a via de sinalização fosfatidilinositol-3-cinase/serina-treonina cinase (PI3K/Akt) é fundamental para o crescimento, desenvolvimento e integridade óssea (GHOSH-CHOUDHURY et al., 2002; LIU et al., 2007; OSYCZKA; LEBOY, 2005; PENG et al., 2003).

VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K

Para que a célula desempenhe determinada função é necessário que ela faça interpretação de sinais enviados por outras células, determinando assim o seu comportamento. Esse processo é chamado transdução de sinal, e começa quando a proteína receptora da célula alvo capta o sinal extracelular e os converte em sinais intracelulares que ditam o comportamento celular (ALBERTS, 2011).

Proteínas cinases são enzimas responsáveis por transferir o grupo fosfato do trifosfato de adenosina (ATP) para uma proteína-alvo no qual geram sucessões de eventos moleculares responsáveis por ampla variedade de atividades da célula (ADAMS, 2001).

As fosfatidilinositol-3-cinases (PI3Ks), são membros da família de cinases lipídicas intracelulares que catalisam a adição de fosfato à posição 3'-OH no anel inositol da molécula lipídica fosfatidilinositol, após ativação por diferentes receptores de superfície celular, gerando produtos que servem como segundos mensageiros lipídicos (BILANGES; POSOR; VANHAESEBROECK, 2019; RAMEH et al., 1999; VANHAESEBROECK; WATERFIELD, 1999; WHITMAN et al., 1988; WYMANN; PIROLA, 1998; XIE et al., 2019).

A transdução de sinal via PI3K controla grande variedade de respostas celulares tais como: proliferação, motilidade, metabolismo, crescimento e sobrevivência celular, diferenciação e migração, em vários tipos celulares (BILANGES; POSOR; VANHAESEBROECK, 2019; FRANKE; KAPLAN; CANTLEY, 1997; RÜCKLE; SCHWARZ; ROMMEL, 2006; SHEPHERD; WITHERS; SIDDLE, 1998), e sua desregulação tem sido relacionada a formação de tumores (THORPE; YUZUGULLU; ZHAO, 2015).

As PI3Ks podem ser agrupadas em três classes distintas (I, II e III) conforme sua estrutura, especificidade do substrato e modo de regulação. Cada classe é encontrada em tecidos diferentes de acordo com sua especificidade e função fisiológica (ENGELMAN; LUO; CANTLEY, 2006).

A Classe I é subdividida em duas subclasses: IA e IB de acordo com seu modo de regulação (XING; HUMPHREY, 2014). Essa classe da PI3K catalisa a fosforilação do fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂), dando origem ao fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃). Esse segundo mensageiro não é detectado nas células em repouso, porém após estimulação seus níveis podem ser identificados de forma transitória (ROMMEL; CAMPS; JI, 2007).

Os receptores de superfície celular controlam direta ou indiretamente a ativação da PI3K de Classe I. A subclasse IA é um heterodímero encontrado em 3 isoformas (PI3K α , PI3K β e PI3K δ) contendo uma subunidade catalítica p110 e uma reguladora p85, e é ativada através de

receptores tirosina quinase (RTKs), receptores acoplados a proteína G (GPCRs), e alguns oncogenes como a proteína G Ras (KOYASU, 2003; LIU et al., 2009). A subclasse IB que tem como representante a PI3K γ também é um heterodímero que possui uma subunidade catalítica p110 γ associada a uma das duas subunidades reguladoras, p101 e p84, porém, é ativada exclusivamente por meio de receptores acoplados a proteína G. As isoformas PI3K α , PI3K β são expressas em todos os tipos celulares, já as isoformas PI3K δ e PI3K γ são predominantes nos leucócitos. O resultado da ativação da subclasse IB está relacionada ao recrutamento de células (OKKENHAUG; VANHAESEBROECK, 2003; ROMMEL; CAMPS; JI, 2007).

Após a estimulação de GPCR, ocorre o recrutamento para a membrana plasmática de PI3K γ resultando em sua ativação. PI3K γ então fosforila o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) produzindo fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). Os locais de membrana onde ocorre o acúmulo de PIP3 recrutam o AKT inativo que se encontra no citosol, AKT se liga à PIP3 através do domínio PH, e isso leva a fosforilação de AKT em T308 por PDK1 e S473 por mTORC2, resultando na ativação completa de AKT. Dessa forma, AKT com máxima ativação regula as funções celulares através da fosforilação de diversos substratos a jusante. As fosfatases PTEN e PHLPP são responsáveis pela regulação negativa dessa via (MANNING; TOKER, 2017).

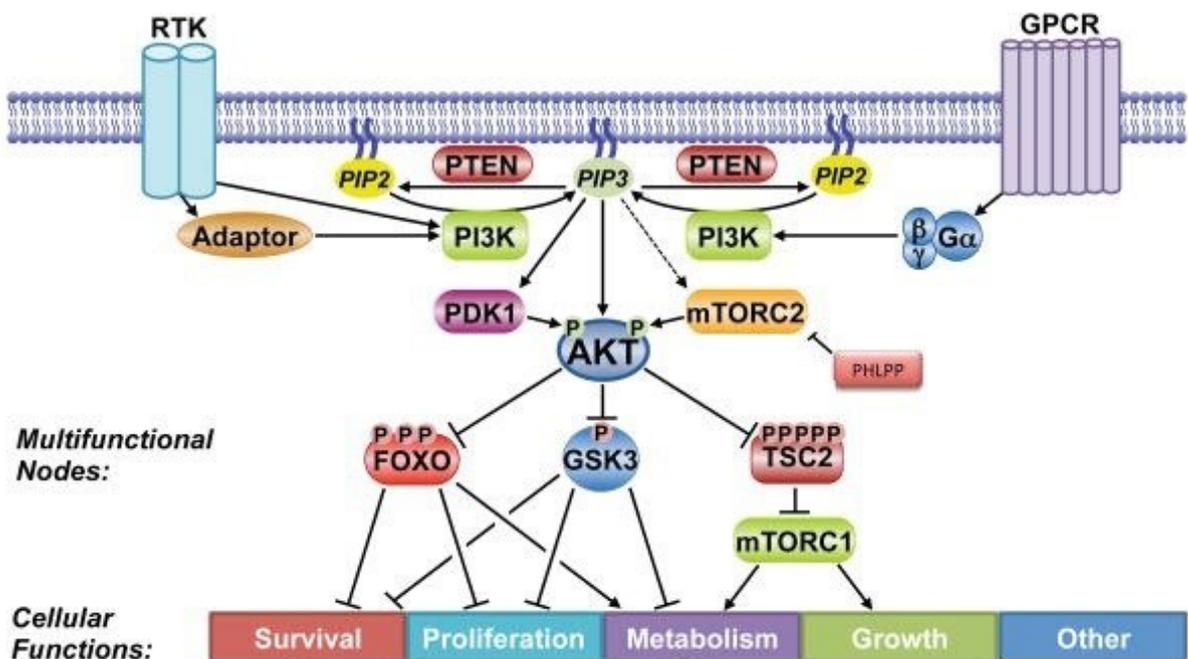


Figura 4 – Via de sinalização PI3K/AKT adaptada (MANNING; TOKER, 2017).

A classe II apresenta apenas uma subunidade catalítica similar a p110, e utiliza fosfatidilinositol ou fosfatidilinositol 4-fosfato como substrato (LIU et al., 2009). A classe III

contém a isoforma catalítica (Vps34) e regulatória p150 e fosforila apenas o fosfatidilinositol (MARTINEZ-MARTÍ; FELIP, 2012).

Tanto a Classe II como a Classe III estão envolvidas no transporte intracelular de vesículas, movimento de proteínas através do lisossomo e na autofagia (BACKER, 2008; KONG; YAMORI, 2010; ODORIZZI; BABST; EMR, 2000).

No presente estudo foram utilizados camundongos $PI3K\gamma^{-/-}$ e $PI3K\gamma^{KD/KD}$, animais ausentes para a enzima $PI3K\gamma$, e animais com perda da atividade cinase respectivamente. Os animais $PI3K\gamma^{-/-}$ são viáveis, férteis e apresentam expectativa de vida normal em condições experimentais padrão. Os neutrófilos, macrófagos e esplenócitos desses animais não apresentam expressão dessa enzima. A ausência de $PI3K\gamma$ nesses camundongos ocasiona prejuízo no recrutamento de polimorfonucleares (PMNs) em respostas a quimiocinas. Os animais $PI3K\gamma^{KD/KD}$ também apresentam resposta inflamatória reduzida, porém esses animais reproduzem apenas parcialmente o fenótipo dos animais $PI3K\gamma^{-/-}$ (HIRSCH et al., 2000; PATRUCCO et al., 2004).

O foco deste estudo será a $PI3K\gamma$, pois é de conhecimento que essa isoforma da PI3K está presente em níveis elevados em células hematopoiéticas, estando envolvidas em processos inflamatórios (LIMA et al., 2019). Além disso, a ligação do complexo quimiocina/receptor, importante no processo de remodelação óssea induzida mecanicamente pode levar a ativação de PI3Ks, incluindo a $PI3K\gamma$, que participa da sinalização através de receptores acoplados a proteínas G (ENGELMAN; LUO; CANTLEY, 2006; KANG et al., 2010).

MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA ORTODÔNTICA (OTM)

Os ossos maxilares são submetidos a remodelação óssea induzida durante o processo de movimentação dentária ortodôntica. O dente é ligado ao osso alveolar subjacente por uma rede de fibras de tecido conjuntivo fibroso constituído de fibras colágenas tipo I, células (fibroblastos, osteoblastos, cementoblastos, osteoclastos cementoclastos, células mesenquimais indiferenciadas, macrófagos, mastócitos, linfócitos e células epiteliais), componentes neurais, vasculares e fluidos teciduais que auxiliam na dissipação da carga mecânica recebida pelo dente. Esse conjunto de estruturas é denominado ligamento periodontal (LI et al., 2018; NANCI; BOSSHARDT, 2006). O ligamento periodontal é inserido no cimento da superfície radicular de um lado, e no tecido ósseo em uma região relativamente densa, denominada lâmina dura. Como resposta a função normal, o osso alveolar e cimento radicular são constantemente remodelados, mas em escalas reduzidas (PROFFIT e FIELDS, 2002).

A força aplicada sobre um elemento dental a partir da instalação de um dispositivo ortodôntico é transmitida ao osso alveolar através do LP, e afeta a matriz extracelular e células da polpa dental, LP, osso alveolar e gengiva. Esses eventos de natureza física e química estão ligados e correlacionados (KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2009). A movimentação dentária ortodôntica é um processo inflamatório agudo asséptico. A aplicação de força causa alterações no fluxo vascular do LP (GIANELLY, 1969). O lado que sofre compressão das fibras do LP tem o fluxo vascular reduzido, enquanto que o lado que sofre tensão tem a perfusão sanguínea mantida ou aumentada. Essa alteração do fluxo sanguíneo altera os níveis de oxigênio, e o ambiente inicia a liberação de mediadores químicos como prostaglandinas, citocinas e quimiocinas (LI et al., 2018).

A teoria pressão-tensão afirma que após a aplicação de uma carga mecânica, as fibras do LP sofrem tensão do lado em que as fibras foram estiradas, e compressão na direção em que o dente foi movimentado, gerando a remodelação óssea induzida e conseqüentemente o movimento dentário devido a alterações moleculares que funcionam como estímulo à diferenciação celular (LI et al., 2018).

As citocinas relacionadas ao processo de remodelação óssea induzida exercem papel direto ou indireto na diferenciação, ativação e apoptose de células ósseas (TADDEI et al., 2012). RANKL e M-CSF são citocinas expressas por osteoblastos, e são as mais importantes no processo de recrutamento, diferenciação, ativação e sobrevivência de osteoclastos (BOYCE; XING, 2008). Algumas citocinas pró-inflamatórias também podem alterar a diferenciação de células osteogênicas como: TNF- α , interleucina 1 beta (IL-1 β), IL-6 (HUANG; WILLIAMS; KYRKANIDES, 2014; HUH; LEE, 2013; KRISHNAN; DAVIDOVITCH, 2006; LEE et al., 2007; XIE et al., 2018) que aumentam a inflamação favorecendo a reabsorção óssea. A interleucina 8 (IL-8) e interleucina 37 (IL-37) aumentam a regeneração óssea através da via PI3K/AKT mediada por receptor de quimiocina CXC tipo 2 (CXCR2) (YANG et al., 2018).

No lado de tensão do LP predomina a expressão de citocinas como interleucina 10 (IL-10), fator de crescimento transformante beta (TGF- β) que aumentam os níveis de OPG e reduzem a produção de RANKL pelos osteoblastos, o que favorece a deposição óssea pela queda da diferenciação de osteoclastos (DI DOMENICO et al., 2012; GARLET et al., 2007).

As quimiocinas também exercem um importante papel na remodelação óssea durante a movimentação ortodôntica, e estudos relatam aumento na expressão de proteína quimiotática de monócitos 1 (CCL2), proteína inflamatória de macrófagos-1 α (CCL3), ligante 5 de CC quimiocina (CCL5), proteína ligante 8 de quimiocina (CXCL8) e fator derivado do estroma da

medula óssea (CXCL12) em murinos e humanos após aplicação de carga mecânica (ASANO et al., 2011; GARLET et al., 2007).

A força ortodôntica aplicada ao elemento dental atua com a mesma magnitude no osso e cimento. O cimento apresenta maior resistência a reabsorção que o osso alveolar, por isso, a força aplicada geralmente leva a reabsorção óssea que causa a movimentação dentária (BREZNIAK; WASSERSTEIN, 1993). Porém, a reabsorção radicular pode acontecer como consequência da movimentação dentária ortodôntica (AMARO et al., 2020). Esse processo consiste na remoção de cimento e dentina radicular pelos odontoclastos. Essas células apresentam forma e função semelhante aos osteoclastos e são responsáveis pela reabsorção radicular (IGLESIAS-LINARES; HARTSFIELD, 2017; WANG; MCCAULEY, 2011).

É de conhecimento que a isoforma γ da PI3K é ativada por receptores acoplados a proteína G (GPCR). Esses tipos de receptores são ativados por quimiocinas e prostaglandinas, que exercem um importante papel na remodelação óssea induzida por força mecânica (TADDEI et al., 2012b). No entanto, não há estudos que tenham verificado importância da via de sinalização da PI3K durante o processo de remodelação óssea maxilar induzida pela movimentação dentária ortodôntica.

EXPANSÃO RÁPIDA DA MAXILA (ERM)

Outra possibilidade de remodelação óssea maxilar de forma induzida ocorre por meio da expansão rápida da maxila. As suturas craniofaciais são locais de crescimento ósseos dinâmicos que respondem a estímulos mecânicos (HERRING, 1972, 2008). Essa estrutura faz a união entre os processos palatinos da maxila, e permite que ocorra o crescimento transversal da maxila. As suturas são flexíveis, e a ortopedia dos maxilares utiliza de carga mecânica para estimular ou frear o crescimento ósseo de forma a controlar e modificar a direção de crescimento (YU et al., 2007). Diferentemente dos humanos onde a sutura palatina mediana é constituída por tecido conjuntivo e a formação óssea é do tipo intramembranosa, nos camundongos esta estrutura é composta por tecido conjuntivo fibroso rico em colágeno tipo II entre duas regiões de cartilagem (KATEBI et al., 2012), tornando-se assim um importante modelo de estudo de remodelação de ossos formados a partir de tecido cartilaginoso (GUERRERO et al., 2020).

A aplicação de força na sutura palatina mediana em camundongos induz a remodelação óssea através da ativação de osteoclastos e aumento da diferenciação e proliferação de células osteogênicas. Além disso, promove a redução da cartilagem secundária e estimula formação de nova cartilagem dentro da sutura. Como resultado desse processo de expansão ocorre a

formação de cartilagem do lado de cada processo palatino conectadas por tecido conjuntivo fibroso na linha média e osso imaturo nas bordas do osso secundário do processo palatino (HOU; FUKAI; OLSEN, 2007; WU et al., 2017).

A utilização do modelo de ERM em camundongos $PI3K\gamma^{-/-}$ visa esclarecer o papel dessa enzima no processo de remodelação óssea estimulada por força mecânica em ossos de origem cartilaginosa.

3 OBJETIVOS GERAIS

Investigar o papel da PI3K γ no processo de remodelação óssea mecanicamente induzida do osso maxilar em camundongos.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os parâmetros ósseos da maxila de animais deficientes para PI3K γ (PI3K $\gamma^{-/-}$) e animais com perda da atividade cinase de PI3K γ (PI3K $\gamma^{KD/KD}$), comparando-os com animais selvagens (WT) na ausência de remodelação óssea induzida: análise da microarquitetura óssea, crista óssea alveolar e osso palatino.
2. Avaliar o efeito da PI3K γ no osso maxilar na presença da remodelação óssea induzida por expansão rápida da maxila (ERM) nos animais PI3K $\gamma^{-/-}$: avaliação da disjunção da sutura palatina mediana e qualidade do osso palatino.
3. Avaliar o efeito da PI3K γ no osso maxilar na presença da remodelação óssea induzida por movimentação dentária ortodôntica (OTM) nos animais PI3K $\gamma^{-/-}$: análise da quantidade de OTM, contagem de osteoblastos e osteoclastos, análise de biomarcadores da remodelação óssea, e avaliar a cascata de sinalização da enzima PI3K γ no osso maxilar por meio da expressão da proteína fosforilada p-AKT;
4. Avaliar o efeito da PI3K γ na raiz dentária na ausência ou presença de movimentação dentária ortodôntica (OTM): análise do volume e densidade mineral das raízes, e contagem de odontoclastos após OTM.
5. Por motivos de comparação sistêmica, serão avaliados os parâmetros ósseos do fêmur dos mesmos animais deficientes para PI3K (PI3K $\gamma^{-/-}$), e animais com perda da atividade cinase de PI3K (PI3K $\gamma^{KD/KD}$), comparando-os com animais selvagens (WT) por meio de microtomografia computadorizada (microCT);
6. Avaliação *in vitro* do efeito da deficiência da enzima PI3K γ na diferenciação celular de osteoblastos e osteoclastos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (protocolo: 302/2018) (ANEXO). Nos experimentos foram utilizados camundongos machos C57BL/6 selvagens (WT) obtidos no Biotério Central da UFMG, camundongos machos deficientes para PI3K γ (PI3K $\gamma^{-/-}$) e camundongos machos com perda da atividade cinase de PI3K γ (PI3K $\gamma^{KD/KD}$), ambos obtidos no Biotério de Imunofarmacologia/ICB/UFMG, com 8 semanas de vida (n = 5) por grupo. Os animais foram mantidos sob condições experimentais (residindo em gaiolas de plástico, dieta composta de ração e água *ad libitum*; mantidos em ciclo de 12 horas claro/escuro). Os experimentos nos camundongos machos deficientes para PI3K γ (PI3K $\gamma^{-/-}$) e seus respectivos controles (WT) foram realizados em triplicata para realização das seguintes análises: (1) microCT e histomorfometria; (2) análise molecular através de RT-PCR; (3) Western Blot.

Indução da remodelação óssea por meio da movimentação dentária induzida (OTM)

Os animais foram anestesiados com quetamina:xilazina 100:10 mg/kg intraperitoneal. Após anestesia, os camundongos foram posicionados em mesa cirúrgica personalizada, desenvolvida de forma a manter o animal imobilizado e permitir livre acesso a cavidade oral (Figura 2). A mucosa jugal do camundongo foi afastada utilizando-se afastador confeccionado com fio de aço mantendo-se maior amplitude da abertura bucal. Para auxiliar na visualização do campo operatório, foram utilizados estereomicroscópio (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil) e iluminação por fibra óptica (Multi-Position Fiber Optic Illuminator System, Cole-Parmer Instrument Company Ltda, Londres, Inglaterra). A movimentação ortodôntica foi realizada conforme descrito por (TADDEI et al., 2012). O primeiro passo para instalação da mola ortodôntica foi a limpeza da superfície oclusal do primeiro molar superior utilizando acetona, que foi aplicada com o auxílio de *microbrush* durante 10 segundos. Após limpeza, para fixação do aparelho foi utilizado selante auto-adesivo (self-etching primer, Unitek/3M, Mineapolis, EUA) e resina fotopolimerizável (Transbond, Unitek/3M, Mineapolis, EUA). A mola ortodôntica aberta de NiTi 0,25 x 0,76 mm (Lancer Orthodontics, San Marcos, CA, EUA) foi posicionada sobre a resina aplicada na superfície oclusal do primeiro molar superior direito, e ancorada nos incisivos centrais. A calibração da força aplicada foi realizada com o auxílio de dinamômetro (Shimpo Corp., Tóquio, JHS, Japão) instalado sobre uma plataforma para registrar a carga de 0,35 N aplicada no sentido mesial dos molares. O hemiarco esquerdo da maxila sem aparelho foi utilizado como controle (Cont), e o hemiarco direito como

lado experimental (OTM). Durante os 12 dias após instalação do dispositivo ortodôntico os animais foram mantidos com dieta pastosa trocada diariamente. No 12º dia a eutanásia foi realizada por meio de sangria sob anestesia geral (quetamina:xilazina 100:10mg/kg). Os ossos maxilares e fêmures foram coletados para as análises.

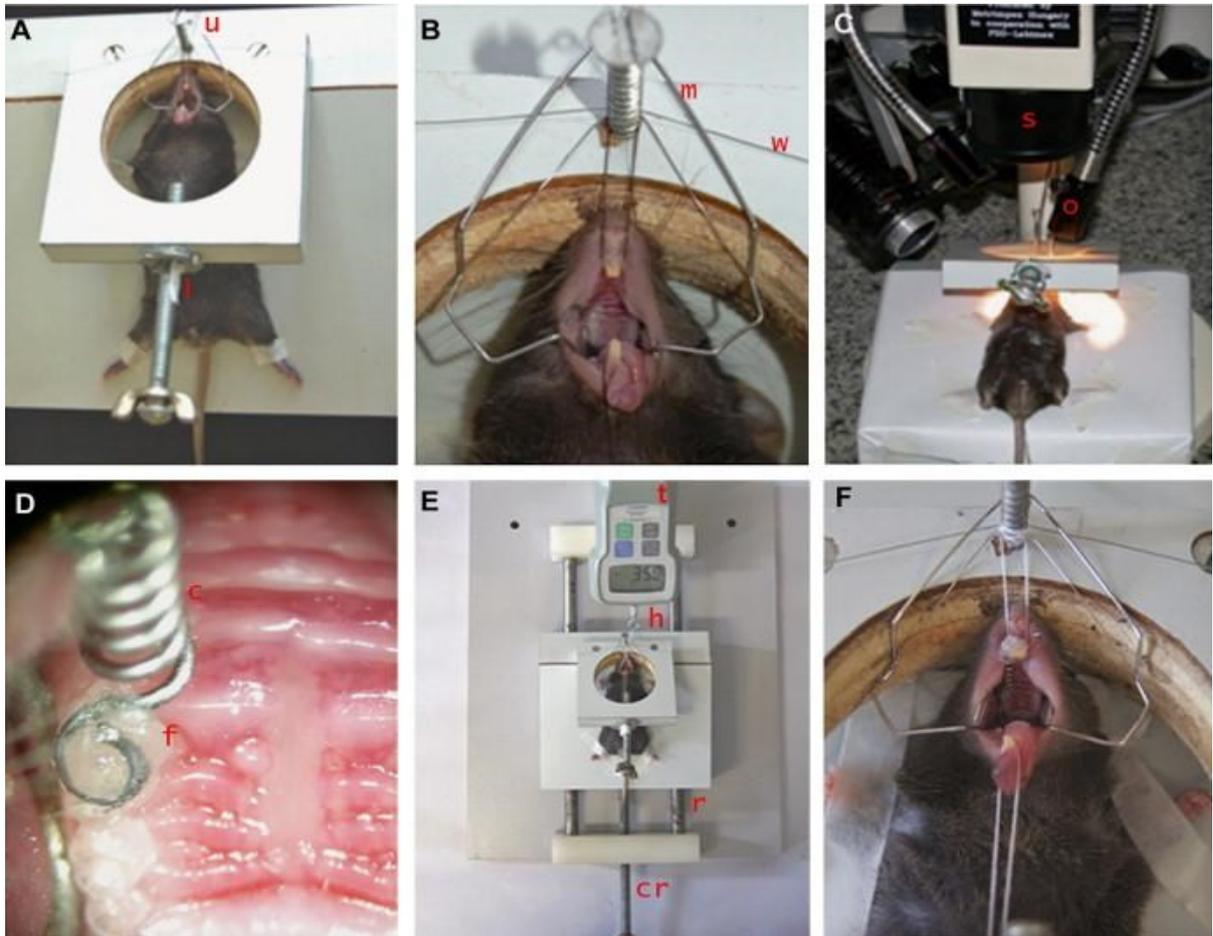


Figura 5 - (A) Camundongo posicionado na mesa cirúrgica. (B) Abertura bucal realizada com o auxílio de afastador. (C) Mesa cirúrgica, estereomicroscópio e iluminação por fibra ótica. (D) Fixação da mola ortodôntica sobre o primeiro molar superior direito. (E) Mesa cirúrgica posicionada na plataforma para utilização do dinamômetro mostrando aplicação de força de 0,35 N. (F) Mola ortodôntica instalada. Parafuso superior (*u*), parafuso inferior (*l*), Fio (*w*), abridor de boca (*m*), estereomicroscópio (*s*), dispositivo de fibra ótica (*o*), primeiro molar superior (*f*), mola helicoidal (*c*), gancho do dinamômetro (*h*), trilho (*r*), manivela (*cr*) e dinamômetro (*t*) (TADDEI et al., 2012).

Expansão rápida da maxila (ERM)

Os animais foram anestesiados com quetamina:xilazina 100:10 mg/kg intraperitoneal. Após anestesia, os camundongos foram posicionados em mesa cirúrgica personalizada, desenvolvida de forma a manter o animal imobilizado e permitir livre acesso a cavidade oral. Afastador confeccionado com fio de aço foi utilizado para afastar a mucosa jugal do animal e manter maior amplitude da abertura bucal. Para auxiliar na visualização do campo operatório,

foram utilizados estereomicroscópio (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil) e iluminação por fibra óptica (Multi-Position Fiber Optic Illuminator System, Cole-Parmer Instrument Company Ltda, Londres, Inglaterra). O disjuntor foi confeccionado com fio ortodôntico de aço inoxidável de 0,014 polegadas (GAC International Inc., Bohemia, NY). O primeiro passo para instalação do disjuntor maxilar foi a limpeza da superfície oclusal do primeiro molar e segundo molar superior utilizando acetona aplicada com o auxílio de *microbrush* durante 10 segundos. O disjuntor foi previamente calibrado com o auxílio de dinamômetro (Shimpo Corp., Tóquio, JHS, Japão) para exercer a força de abertura de 0,42 N conforme protocolo descrito por Guerrero et al., 2020. Após limpeza, para fixação do disjuntor foi utilizado selante auto-adesivo (self-etching primer, Unitek/3M, Mineapolis, EUA) e resina fotopolimerizável (Transbond, Unitek/3M, Mineapolis, EUA). Após 7 dias da instalação do dispositivo, os animais foram eutanasiados por meio de sangria sob anestesia geral (quetamina:xilazina 100:10mg/kg). Os ossos maxilares foram coletados para análise (Figura 3).

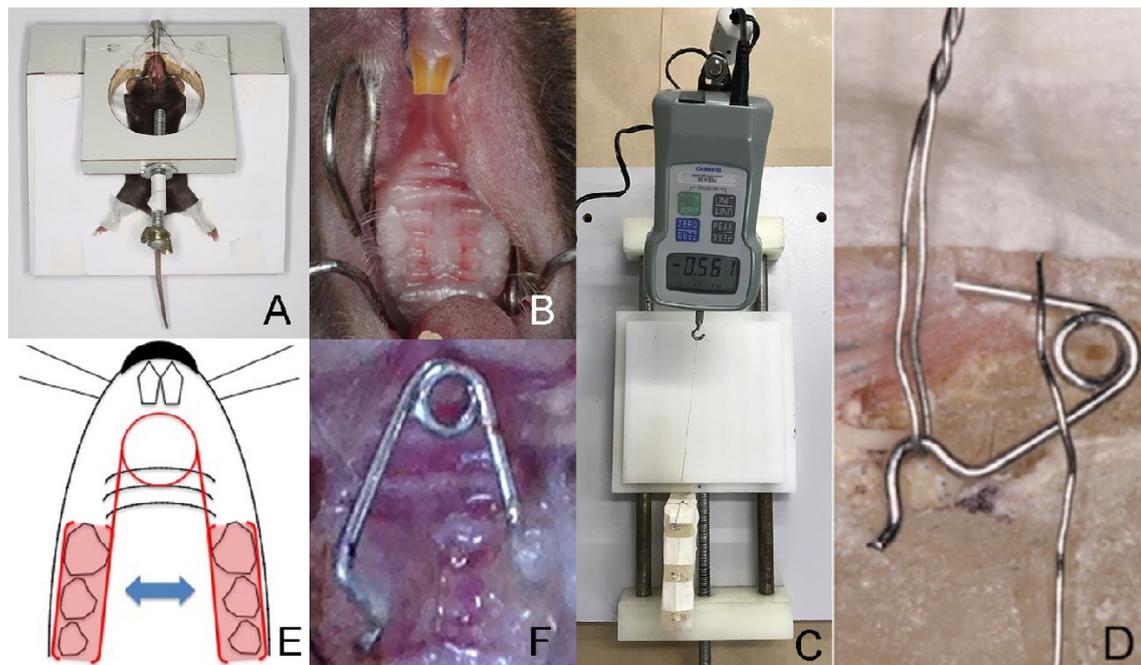


Figura 6 - (A) Camundongos posicionados na mesa cirúrgica (B) Abertura bucal realizada com o auxílio de afastador (C) Mesa cirúrgica posicionada na plataforma para utilização do dinamômetro com exemplo de calibração de força de 0.56 N. (D) A ativação do loop de abertura (E) Esquema ilustrando força aplicada pelo disjuntor (F) Alças de abertura coladas à superfície oclusal dos molares superiores (GUERRERO et al., 2020).

Microtomografia computadorizada (microCT)

Os ossos maxilares e fêmures foram escaneados utilizando tomógrafo microcomputadorizado de alta resolução (microCT) (Skyscan 1174 X-Ray microtomograph,

Aartselaar, Bélgica) no Laboratório de Biomateriais da Escola de Engenharia da UFMG para avaliação da arquitetura do trabeculado ósseo. Os seguintes parâmetros foram utilizados para o escaneamento: voxel isotrópico de 5 μm (60 kV, filtro de alumínio de 0,5 mm, ângulo de rotação de 0,5°). O tempo de escaneamento foi de aproximadamente 30 minutos para cada osso. As imagens obtidas foram reconstruídas utilizando o software NRecon (Skyscan, Bélgica). Os ossos foram posicionados para padronização da área analisada utilizando o software DataViewer (Chauvin Arnoux[®], EUA), e analisados utilizando CTAn software (Skyscan, Bélgica). Para a realização de cálculos mais precisos na análise da densidade óssea mineral, o programa foi calibrado por meio de phantoms de hidroxiapatita que possuem densidade previamente conhecida.

A análise do osso maxilar foi realizada empregando-se cinco parâmetros distintos:

1. Análise da microarquitetura óssea maxilar na região da furca do primeiro molar e sutura palatina mediana:

Na região da furca do primeiro molar superior, e na região da sutura palatina mediana, os seguintes parâmetros foram analisados: densidade mineral óssea (BMD; g/cm^{-3}), porcentagem da relação volume ósseo/volume total (BV/TV; %), volume ósseo (BV; $\mu\text{m}^3 \times 10^8$), índice de modelo estrutural (SMI), espessura das trabéculas (Tb.Th; μm), número de trabéculas (Tb.N; μm^{-1}), separação das trabéculas (Tb.Sp; μm), e superfície de interseção (I.S; $\mu\text{m}^2 \times 10^6$).

2. Análise da área da crista óssea alveolar:

A área da crista óssea alveolar foi quantificada através da medida da distância entre a crista óssea alveolar e a junção cimento-esmalte (ABC-CEJ) da superfície mesial do primeiro molar superior até a superfície distal do terceiro molar superior na face palatina com o auxílio do software ImageJ e ferramenta *freehand line* (National Institutes of Health, MD, EUA).

3. Medida da movimentação dentária ortodôntica (OTM):

Imagens dos primeiros e segundos molares superiores no sentido sagital foram obtidas a partir do escaneamento dos ossos maxilares por microCT com o auxílio do software DataViewer (Chauvin Arnoux[®], EUA). O software CTAn (Skyscan, Bélgica) foi empregado para quantificar a discrepância na medida da OTM pela distância linear entre a junção cimento-esmalte (CEJ) dos primeiros e segundos molares da hemi-maxila direita (OTM) em relação a hemi-maxila esquerda (Cont) do mesmo animal, utilizando a ferramenta *line*. Foram analisada cinco imagens sagitais por animal, e foi calculada a média dessas medidas.

4. Análise da sutura palatina mediana:

Para quantificar a distância linear em μm da expansão da sutura palatina mediana, as maxilas foram posicionadas no plano coronal utilizando o software DataViewer (Chauvin Arnoux[®], EUA). A área de expansão da sutura foi avaliada em 2 pontos com o auxílio do CTAn software (Skyscan, Bélgica), utilizando a ferramenta *line*. O primeiro ponto utilizado como referência foi o terço médio do canal radicular da raiz palatina do primeiro molar superior, e o segundo ponto utilizado como referência foi o terço apical da raiz palatina do primeiro molar superior.

A área da expansão da sutura palatina mediana foi quantificada utilizando imagens da maxila posicionadas no plano transaxial com o auxílio do software DataViewer (Chauvin Arnoux[®], EUA). A extensão antero-posterior do primeiro molar superior foi utilizado como referência posterior para a medida da abertura da sutura palatina mediana e a sutura entre a maxila e o septo nasal como referência anterior (GUERRERO et al., 2020).

5. Análise da reabsorção radicular:

A reabsorção radicular foi avaliada na raiz disto-vestibular do primeiro molar superior e os parâmetros analisados foram: densidade mineral radicular (RMD; g/cm^{-3}), porcentagem de volume radicular/volume total (RV/TV; %) (AMARO et al., 2020).

Para a análise do osso trabecular na metáfise distal do fêmur os seguintes parâmetros foram utilizados: densidade mineral óssea (BMD; g/cm^{-3}), porcentagem da relação volume ósseo/volume total (BV/TV; %), volume ósseo (BV; $\mu\text{m}^3 \times 10^8$), índice de modelo estrutural (SMI), espessura das trabéculas (Tb.Th; μm), número de trabéculas (Tb.N; μm^{-1}), separação das trabéculas (Tb.Sp; μm), e superfície de interseção (I.S; $\mu\text{m}^2 \times 10^6$).

Processamento histológico

Após a eutanásia dos animais os maxilares foram dissecados e imediatamente imersos em solução de formol 10% tamponada, pH 7.2, por 48 horas, para fixação. Em seguida, as peças foram descalcificadas em solução de EDTA 14% (pH 7.4), por 21 dias com trocas diárias de solução. Posteriormente, as peças foram lavadas *overnight* em água corrente, e foi realizado o processamento histológico de rotina. Para a obtenção de secções longitudinais padronizadas, 2 cortes com uma navalha foram realizados nas maxilas, o primeiro corte para remoção dos incisivos, e o segundo corte no sentido póstero-anterior na região da sutura palatina perpendicular ao plano oclusal, para separar o lado controle do lado experimental (Figura 4).

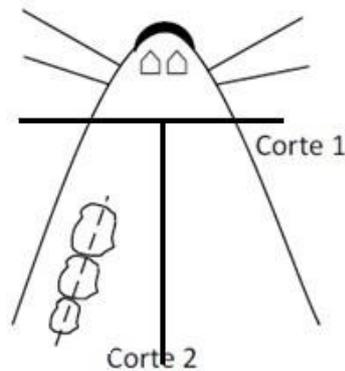


Figura 7 – Esquema representativo de secções realizadas na maxila para remoção dos incisivos (corte 1), separação dos lados controle e experimental (corte 2). Imagem adaptada gentilmente concedida pelo Dr. Ildeu Andrade Jr (Tese de Doutorado – Departamento de Biologia Celular – ICB/UFMG, 2007).

Os blocos de parafina foram cortados com 5 μm de espessura empregando-se um micrótomo rotatório (Jung, Histocut 820, Mussioch, Alemanha). As lâminas selecionadas da maxila foram então coradas com hematoxilina e eosina (HE), coloração histoquímica por meio da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), e tricrômio de Masson.

Análise histomorfométrica

Medida da movimentação dentária ortodôntica (OTM)

Para avaliação da quantidade de movimentação dentária ortodôntica do primeiro molar superior as lâminas coradas com HE foram fotografadas com o auxílio de um microscópio (Carl Zeiss, Göttingen, Niedersachsen, Alemanha) com câmera acoplada (PowerShot A620, Canon, Tóquio, Honshu, Japão), na objetiva de 10x. A medida foi realizada com o auxílio do software ImageJ (National Institutes of Health, MD, EUA). Após calibração do software, a ferramenta *straight line* foi utilizada para realizar a medida linear da distância entre a junção cimento-esmalte (JCE) da face distal do primeiro molar superior até a junção cimento-esmalte da face mesial do segundo molar superior. Essa medida foi realizada em 3 cortes histológicos por animal e a média dos valores foi obtida. A quantidade de movimentação dentária foi obtida através da diferença do valor obtido da distância da CEJ do lado experimental (OTM) em relação ao lado controle do mesmo animal, e então foi realizada a comparação da movimentação dentária entre os grupos WT e PI3K $\gamma^{-/-}$.

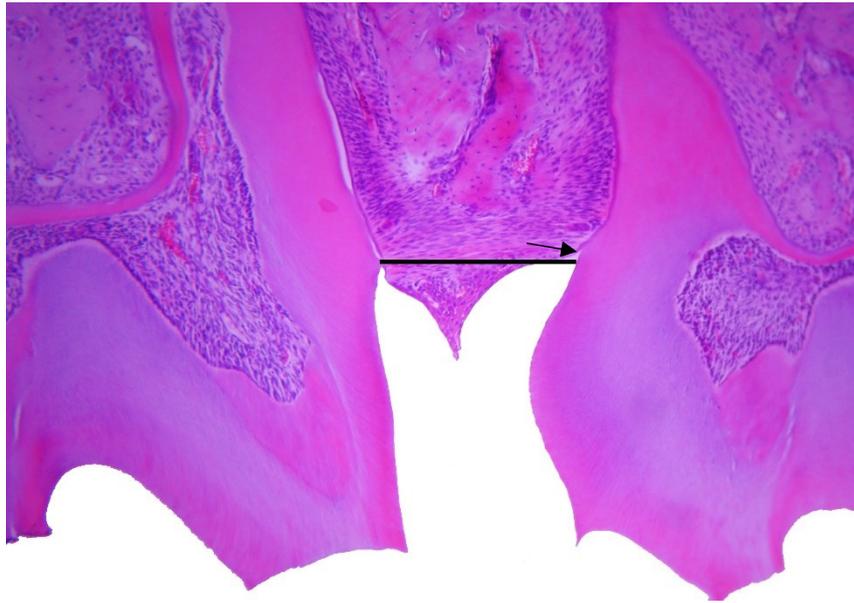


Figura 8 - Raiz disto-vestibular do primeiro molar superior e raiz mesio-vestibular do segundo molar superior. Seta preta indicando a junção cimento-esmalte (JCE), referência utilizada para realizar a medida linear da distância entre os dentes. Corte histológico corado em HE aumento 10x (acervo pessoal).

Contagem de osteoblastos

Utilizando um microscópio (Carl Zeiss, Göttingen, Niedersachsen, Alemanha) equipado com uma câmera (PowerShot A620, Canon, Tóquio, Honshu, Japão) e uma objetiva de 40x, foram capturadas imagens da raiz disto-vestibular do primeiro molar superior na região de tensão do ligamento periodontal em lâminas coradas por tricômio de Masson. A contagem dos osteoblastos foi realizada ao longo da extensão do osso alveolar na área de tensão do LP em 3 cortes histológicos por animal. Foi realizada a média de valores da contagem dos osteoblastos (ObN/BPm) por animal. Esse protocolo foi realizado no lado experimental (OTM) e lado controle (Cont) das maxilas.

Contagem de osteoclastos no osso alveolar e odontoclastos na superfície radicular

Após a marcação histoquímica por TRAP (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e a contra coloração com hematoxilina (Sigma-Aldrich), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante, foram capturadas imagens da raiz disto-vestibular do primeiro molar superior na região de compressão do ligamento periodontal. Para isso, foi utilizado um microscópio (Carl Zeiss, Göttingen, Niedersachsen, Alemanha) com câmera acoplada (PowerShot A620, Canon, Tóquio, Honshu, Japão) e objetiva de 40x foram obtidas imagens da raiz disto-vestibular do primeiro molar superior na região de compressão do ligamento periodontal. A contagem dos

osteoclastos foi realizada ao longo da extensão do osso alveolar na área de compressão do LP, onde essas células multinucleadas foram encontradas dentro das lacunas de Howship. A contagem foi efetuada em 3 secções por animal. Foi realizada a média de valores para a obtenção do número de osteoclastos por animal (*Osteoclast number*). Esse protocolo foi realizado no lado experimental e controle das maxilas.

A reabsorção radicular foi analisada ao longo da extensão da raiz disto-vestibular no lado de compressão do LP, onde os odontoclastos foram encontrados em depressões na superfície do cimento. A contagem foi efetuada em 3 secções por animal. Foi realizada a média de valores para a obtenção do número de odontoclastos por animal (*Resorption gaps/RPm*).

Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Para realizar a análise por meio de RT-PCR as amostras de maxila foram isoladas de forma a preservar apenas o osso da região dos molares. As mucosas do palato e da região vestibular da maxila foram descartadas. A extração de RNA foi executada conforme instruções do fabricante Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As amostras de osso foram colocadas em um criotubo com 500 µl de trizol e 2 beads metálicas. O criotubo foi colocado em amalgamador adaptado para triturar os ossos. Depois de triturar o tecido, foram adicionados 200 µl de clorofórmio, e as amostras foram centrifugadas a 15.000 g durante 25 minutos. Após centrifugação a fase aquosa foi separada da fase proteica e colocada em um novo tubo. Foi adicionado 500 µl de isopropanol, levado ao freezer -20° por 20 minutos. A amostra foi centrifugada, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi lavado em etanol 75%. Após o descarte do álcool aguardamos a secagem dos tubos por 15 minutos e o *pellet* foi ressuspensionado em 20 µl de água Depec. O RNA foi quantificado. A partir do RNA foi realizado a transcrição para obtenção do cDNA, para isso foi utilizado termociclador (BioRad T100, Hercules, Califórnia, EUA) e a enzima transcriptase reversa SuperScript VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). O sistema StepOnePlus Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) foi utilizado para a análise, e o SYBR[®] Green PCR Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific) foi utilizado. A expressão gênica dos seguintes marcadores foi avaliada: marcadores de osteoclastos e reguladores negativos de reabsorção óssea - ativador do fator nuclear kappa B (*Rank*); ligante para o receptor ativador de fator nuclear kappa (*Rankl*), Osteoprotegerina (*Opg*) e a proporção (*Rankl/Opg*), marcadores de osteoblastos - fator de transcrição relacionado ao runt 2 (*Runx2*) e fosfatase alcalina (*Alp*), e biomarcadores de inflamação - fator de necrose tumoral alfa (*Tnf-α*) e Interleucina-6 (*Il-6*). Como controle foi utilizada expressão do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). O método Delta-

Delta CT ($\Delta\Delta CT$) foi empregado para análise dos dados. O ΔCT de cada amostra foi calculado, e foi subtraído o valor de CT (threshold cycle ou ciclo limiar) de GAPDH, dos valores de CT dos genes avaliados. O cálculo do $\Delta\Delta CT$ foi realizado utilizando a seguinte fórmula [ΔCT (amostra) - ΔCT (GAPDH)]. Após obtenção do valor de $\Delta\Delta CT$, a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi utilizada para comparação da expressão gênica dos ossos do grupo WT e PI3K $\gamma^{-/-}$ lado controle e lado experimental.

Western Blot

Para a extração de proteínas da maxila os ossos foram acondicionados em criotubo com 150 μ l da solução de lise (Triton X-100 1%, Tris/HCL 100mM, pH 8,00, glicerol 10%, EDTA 0,2mM, NaCl 200mM, DTT 1mM, PMSF 1mM, NaF 25mM; leupeptina 2,5 μ g/ml; aprotinina 5 μ g/ml e ortovanadato de sódio 1mM), e foram triturados com o auxílio de amalgamador adaptado. As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos a 4°, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e as proteínas foram quantificadas usando o teste de Bradford por espectrofotometria através do Kit Bio-Rad Assay (Bio Rad Laboratories, EUA). O sistema vertical de eletroforese Mini-PROTEAN (Bio-Rad Laboratories, EUA) foi utilizado e 50 μ g de proteínas total de cada amostra foram separadas por eletroforese utilizando gel de poliacrilamida pelo sistema SDS-PAGE. Após separação das proteínas, foi realizada a transferência para a membrana de nitrocelulose utilizando solução tampão de transferência. A membrana foi incubada com o anticorpo primário p-AKT, e a β -actina foi utilizada como controle. Após a remoção do anticorpo primário por lavagem, a membrana foi incubada com a solução de anticorpo secundário anti-rabbit. As membranas foram reveladas no ChemiDoc (XRS + Bio-Rad Laboratories).

Cultura de células

Isolamento de células da medula óssea

As culturas de osteoblastos e osteoclastos foram realizadas no laboratório de Cultivo Celular da Faculdade de Odontologia da UFMG, através do protocolo de diferenciação de células tronco hematopoiéticas da medula óssea (CTH). Os animais da linhagem C57BL/6 selvagens (WT) e deficientes para PI3K (PI3K $\gamma^{-/-}$), foram eutanasiados por meio de sangria sob anestesia geral (quetamina:xilazina 100:10mg/kg). Os ossos longos dos camundongos (fêmures e tíbias) foram dissecados e acondicionados em falcon contendo meio Alfa-MEM incompleto (α -MEM, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), e transferidos para o laboratório. As CTHs foram removidas da cavidade medular através de um corte realizado na epífise. Os ossos foram

colocados em eppendorfs de 0,5 ml com a extremidade perfurada. Esse eppendorf foi colocado dentro de outro eppendorf de 1,5 ml e centrifugados a 10.000 rpm durante 30 segundos. Os ossos foram descartados e o pellet obtido por esse processo foi ressuspensionado em 1 ml de Lysis Buffer. A solução contendo as células e a solução de lise foi centrifugada novamente por 7 minutos 360g 4°C. Após essa etapa a solução foi descartada, e o *pellet* de células ressuspensionado em 5 ml de meio α -MEM completo. As células foram filtradas utilizando-se cell strainer de 100 nm. Acrescentou-se 5 ml de meio Alfa-MEM completo (α -MEM, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) e essa solução foi novamente filtrada. Uma alíquota das células de 10 μ l foi colocada na câmara de Neubauer e prosseguiu a contagem do número de células.

Cultura de osteoclastos

As células da medula óssea foram cultivadas em meio Alfa-MEM completo (α -MEM, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) suplementado com soro fetal bovino a 10% (SFB Gibco, CA, EUA) e fator estimulador de colônias de macrófago M-CSF (M-CSF 30 ng/ml, R&D Systems, MN, EUA), incubadas a 37°C, a 5% de CO₂ por 3 dias para a geração de pré-osteoclastos. Após a obtenção de confluência dos pré-osteoclastos as células foram plaqueadas em placa de 96 poços (Corning Inc., Corning, NY, EUA) e cultivadas em meio Alfa-MEM completo contendo M-CSF (30 ng/ml, R&D Systems) e ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL, 10 ng/ml, R&D Systems) a uma densidade de 2×10^4 células por poço.

Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP)

Após 9 dias do início do cultivo celular, o meio de cultura dos osteoclastos foi removido, as células foram lavadas com PBS e fixadas com solução de fixação contendo: citrato, acetona e formaldeído a 37%. Após 5 minutos os poços foram lavados com água destilada e seguiu-se a secagem da placa. Foi então realizada a coloração das células com o kit TRAP (Sigma-Aldrich) conforme recomendações do fabricante. A placa foi acondicionada na estufa 37° 5% CO₂ durante 60 minutos ao abrigo da luz. A coloração foi removida, os poços foram lavados e seguiu-se a secagem da placa *overnight*. A contagem das células foi realizada com auxílio de um microscópio invertido (Labomed[®], TCM 400), por um operador cego e calibrado. As células resistentes ao tartarato e contendo acima de 3 núcleos foram consideradas osteoclastos.

Cultura de osteoblastos

Para diferenciação de osteoblastos, as células da medula óssea foram cultivadas em meio contendo 10% SFB, 100 μ M ácido L-ascórbico-2-fosfato, 10 nM dexametasona, 5mM de β -glicerofosfato. Os depósitos de cálcio formados após 21 dias de estímulo foram corados utilizando a coloração de vermelho de alizarina.

Avaliação da formação de matriz mineralizada por vermelho de alizarina

Após 21 dias de cultivo celular, foi realizada a coloração com vermelho de alizarina que tem como objetivo marcar a matriz mineralizada produzida. Para isso, o meio de cultura presente nos poços foram retirados, os poços foram lavados com PBS e fixados com isopropanol a 70% por 10 minutos. Após a fixação os poços foram lavados com água destilada, e os depósitos de minerais foram então corados por vermelho de alizarina a 1% (Sigma-Aldrich) com pH 4,2 durante 30 minutos. Os poços foram cuidadosamente lavados com PBS, e colocados para secagem *overnight* em temperatura ambiente. A placa foi escaneada e a quantificação da área mineralizada foi realizada utilizando-se o software ImagJ (National Institutes of Health, MD, EUA). O plugin *color threshold* foi utilizado para transformar a imagem em preto e branco, e assim selecionar apenas as áreas marcadas em vermelho que corresponde a deposição mineral. Após o tratamento das imagens, a quantificação foi realizada utilizando-se o plugin *analyze particles*, sendo a área referente aos depósitos minerais obtidas em pixels. Os resultados foram expressos como percentual de área mineralizada (*Porcentage %*) e densidade óptica (*Optical density value*).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram construídas no software GraphPad Prism (version 5.01, GraphPad Software, San Diego, CA) e o intervalo de confiança considerado para todos os testes foi de 95%, refletindo uma significância de 0,05. Os resultados foram expressos como a média \pm DPM (desvio padrão da média). Como todos os dados possuíam as premissas necessárias para utilização de testes paramétricos com objetivo de determinar se as médias de três ou mais grupos foram diferentes seguiu-se com as análises de variância (ANOVA) de uma via (One-Way ANOVA) e de duas vias (Two-Way ANOVA). Para comparar as médias de dois grupos teste-t de student foi utilizado.

6 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados seguindo sequência dos objetivos específicos propostos.

Efeito da PI3K γ no osso maxilar na AUSÊNCIA de remodelação óssea induzida

ANIMAIS COM AUSÊNCIA OU PERDA DA ATIVIDADE DA ENZIMA PI3K γ APRESENTAM AUMENTO DA MICROARQUITETURA ÓSSEA MAXILAR

A análise do osso maxilar por microCT da região de furca do primeiro molar superior no lado controle revelou aumento de BMD, BV/TV e Tb.Th nos animais PI3K γ ^{-/-} quando comparados ao grupo WT. Com exceção da BMD, os animais PI3K γ ^{KD/KD} também demonstraram maior BV/TV, BV, I.S. e Tb.Th em comparação aos animais WT. No entanto, o grupo PI3K γ ^{KD/KD} apresentou menor BMD que os grupos PI3K γ ^{-/-} e WT; e aumento de BV, I.S. em relação aos animais PI3K γ ^{-/-}. Os parâmetros Tb.N, Tb.Sp e SMI não apresentaram diferença estatística entre os grupos (Figura 9A e B).

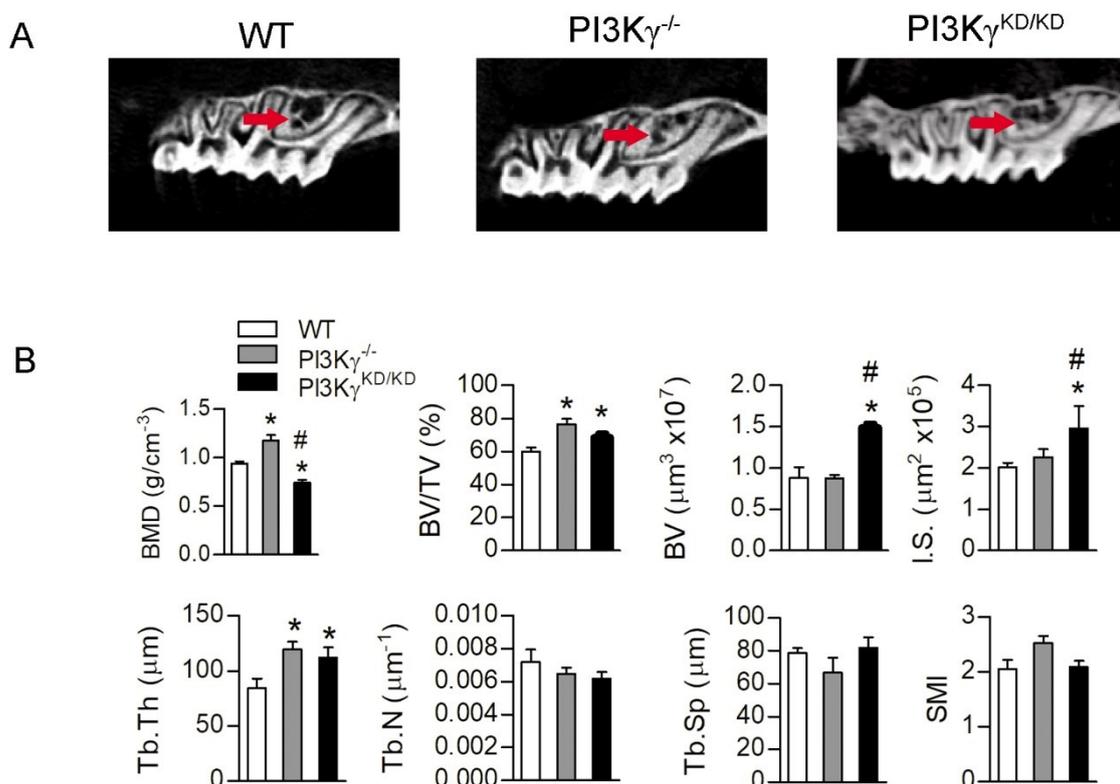


Figura 9 - Morfologia do trabeculado ósseo da região de furca do primeiro molar superior de camundongos machos C57BL/6 selvagens (WT), camundongos machos deficientes para PI3K γ (PI3K γ ^{-/-}), e camundongos machos com perda da atividade da enzima PI3K γ (PI3K γ ^{KD/KD}). (A) Imagens representativas da hemi-maxila esquerda (lado controle) de camundongos machos WT, PI3K γ ^{-/-} e PI3K γ ^{KD/KD}. (B) Resultados da análise de microCT da maxila. Parâmetros ósseos avaliados: densidade

mineral óssea (BMD; g/cm^3), porcentagem de volume ósseo/volume total (BV/TV; %), volume ósseo (BV; $\mu\text{m}^3 \times 10^8$), índice de modelo estrutural (SMI), espessura das trabéculas (Tb.Th; μm), número de trabéculas (Tb.N; μm^{-1}), separação das trabéculas (Tb.Sp; μm), e superfície de interseção (I.S; $\mu\text{m}^2 \times 10^6$). Setas indicam região analisada. ($n = 5$) * $p < 0,05$ diferença estatística do WT. # $p < 0,05$ diferença estatística do $\text{PI3K}\gamma^{-/-}$. One-way ANOVA.

AUSÊNCIA OU PERDA DA ATIVIDADE DE $\text{PI3K}\gamma$ NÃO ALTERA REMODELAÇÃO DA CRISTA ÓSSEA ALVEOLAR

A análise quantitativa da distância entre a crista óssea alveolar (ABC) e a junção cimento-esmalte (CEJ) realizada na face palatina do primeiro, segundo e terceiro molares superiores no lado controle da maxila, revelou que a ausência ($\text{PI3K}\gamma^{-/-}$) ou perda da atividade da enzima $\text{PI3K}\gamma$ ($\text{PI3K}\gamma^{\text{KD/KD}}$) não alteram a remodelação óssea da crista alveolar (Figura 10A e B).

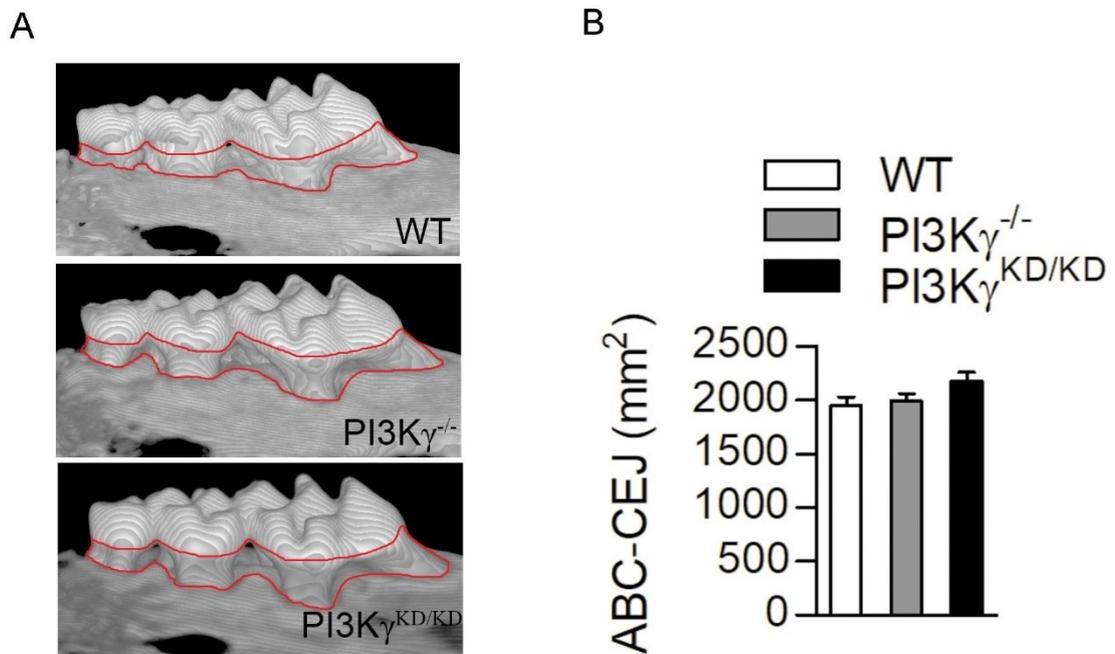


Figura 10 – (A) Imagem representativa em 3D da crista óssea alveolar. (B) Quantificação da perda da crista óssea alveolar na face palatina da região do primeiro, segundo e terceiro molar superior. Contorno demonstrando região analisada. ($n = 5$). $p < 0,05$. One-way ANOVA.

EFEITOS DA AUSÊNCIA OU PERDA DA ATIVIDADE DA ENZIMA PI3K γ NA REMODELAÇÃO ÓSSEA DO PALATO

A microarquitetura óssea do palato analisada por meio de microCT demonstrou aumento nos parâmetros de BMD, IS e Tb.N dos animais PI3K $\gamma^{-/-}$ quando comparados aos animais WT. Os animais PI3K $\gamma^{KD/KD}$ apresentaram maior BV, I.S, Tb.Th que os animais WT e PI3K $\gamma^{-/-}$. Porém, apresentaram menor BMD, e Tb.N que os animais PI3K $\gamma^{-/-}$ (Figura 11A e B).

A

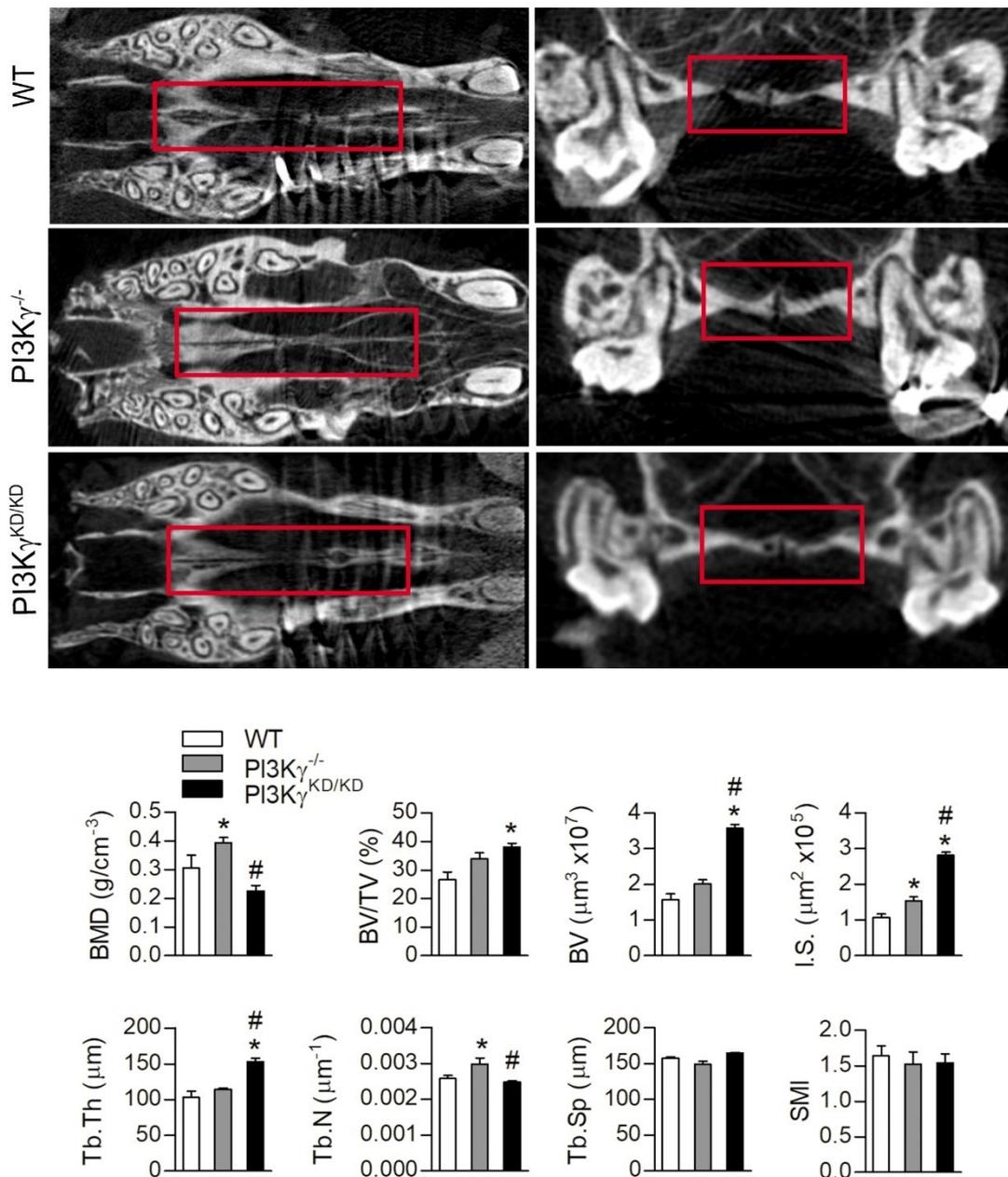


Figura 11 - (A) Morfologia do trabeculado ósseo da região de sutura palatina mediana de camundongos machos C57BL/6 selvagens (WT), camundongos machos deficientes para PI3K γ (PI3K $\gamma^{-/-}$), e

camundongos machos com perda da atividade da enzima PI3K γ (PI3K $\gamma^{KD/KD}$). (B) Resultados da análise de microCT da região de sutura palatina mediana da maxila. Parâmetros ósseos avaliados: densidade mineral óssea (BMD; g/cm³), porcentagem de volume ósseo/volume total (BV/TV; %), volume ósseo (BV; $\mu\text{m}^3 \times 10^8$), índice de modelo estrutural (SMI), espessura das trabéculas (Tb.Th; μm), número de trabéculas (Tb.N; μm^{-1}), separação das trabéculas (Tb.Sp; μm), e superfície de interseção (I.S; $\mu\text{m}^2 \times 10^6$). Retângulos indicam região analisada. (n = 5). * $p < 0,05$ diferença estatística do WT. # $p < 0,05$ diferença estatística do PI3K $\gamma^{-/-}$. One-way ANOVA.

Esses resultados sugerem que tanto os animais com ausência da enzima PI3K γ (PI3K $\gamma^{-/-}$) quanto os animais com perda da atividade da enzima PI3K γ (PI3K $\gamma^{KD/KD}$) sem estímulo mecânico para remodelação óssea, apresentaram maior volume de osso e maior espessura das trabéculas ósseas na maxila, quando comparados ao grupo WT. Porém os animais PI3K $\gamma^{KD/KD}$ apresentaram menor densidade mineral óssea que os grupos WT e PI3K $\gamma^{-/-}$.

Uma vez que o fenótipo ósseo de ambas linhagens de camundongos PI3K $\gamma^{-/-}$ e PI3K $\gamma^{KD/KD}$ foi bem semelhante optou-se por prosseguir as etapas de indução da remodelação óssea alveolar por estímulos mecânicos apenas com os animais que apresentavam ausência da enzima PI3K γ (PI3K $\gamma^{-/-}$).

Efeito da PI3K γ no osso maxilar na PRESENÇA de dois modelos de remodelação óssea induzida: expansão rápida da maxila (ERM) e movimentação dentária ortodôntica (OTM)

MODELO DE EXPANSÃO RÁPIDA DA MAXILA (ERM)

AUSÊNCIA DE PI3K γ REDUZ A ABERTURA E ÁREA DE DISJUNÇÃO DA SUTURA PALATINA MEDIANA

A quantificação da expansão da sutura palatina mediana através da mensuração linear da distância do terço médio e apical da raiz palatina do primeiro molar superior (Figura 12A e B) e da área de abertura da disjunção (Figura 13A e B) revelou que nos animais PI3K $\gamma^{-/-}$ ocorreu uma menor abertura dos processos palatinos quando comparados aos animais WT.

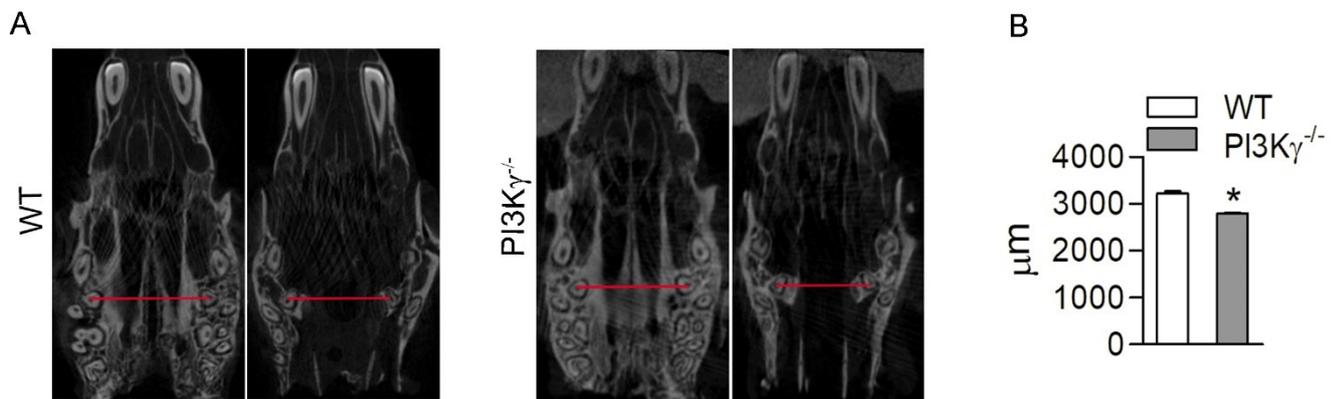


Figura 12 - (A) imagem representativa da expansão da sutura palatina mediana após ERM. (B) Quantificação da expansão da sutura palatina mediana. Medidas realizadas a partir do canal radicular da raiz palatina no terço médio e terço apical. (n = 5) * $p < 0,05$. Teste t de Student.

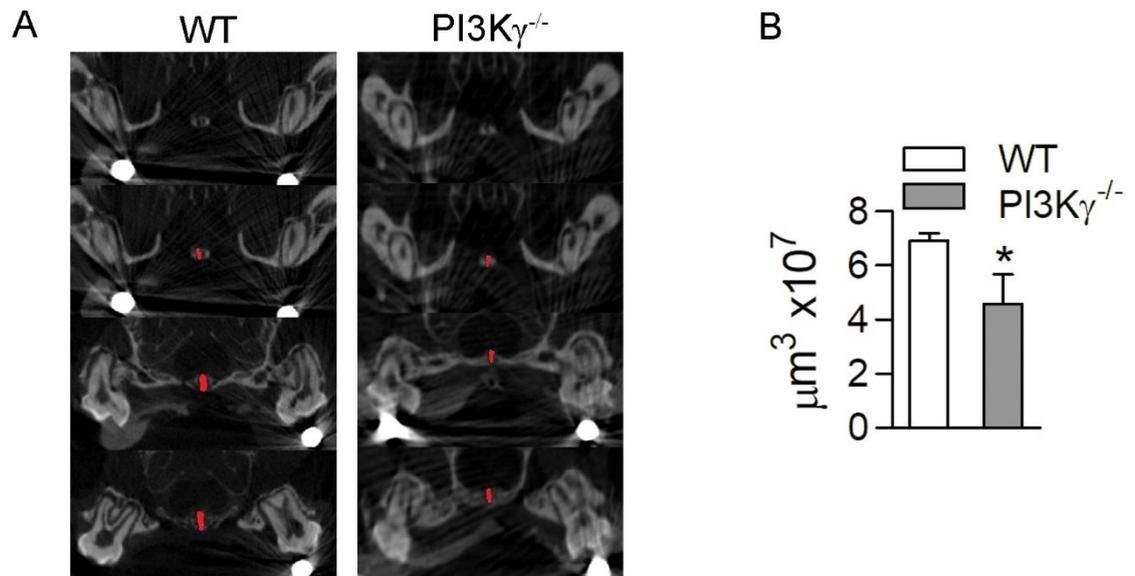


Figura 13 - Área de abertura da sutura palatina mediana após ERM. (A) Imagem representativa dos ossos palatinos indicando a área de abertura da sutura palatina mediana de camundongos machos C57BL/6 selvagens (WT), e camundongos machos deficientes para PI3K γ (PI3K γ ^{-/-}) (B) Quantificação da abertura da sutura palatina mediana após expansão da maxila. (n = 5) * $p < 0,05$. Teste t de Student.

AUMENTO DA MICROARQUITETURA DO OSSO PALATINO NA AUSÊNCIA DE PI3K γ APÓS EXPANSÃO RÁPIDA DA MAXILA

Após expansão rápida da maxila, a análise da microarquitetura óssea através da microCT do osso palatino demonstrou maior BMD, BV/TV, BV, IS e Tb.N nos animais PI3K γ ^{-/-} quando comparados aos animais WT. Os parâmetros Tb.Th, Tb.Sp e SMI não apresentaram significância estatística (Figura 14A e B).

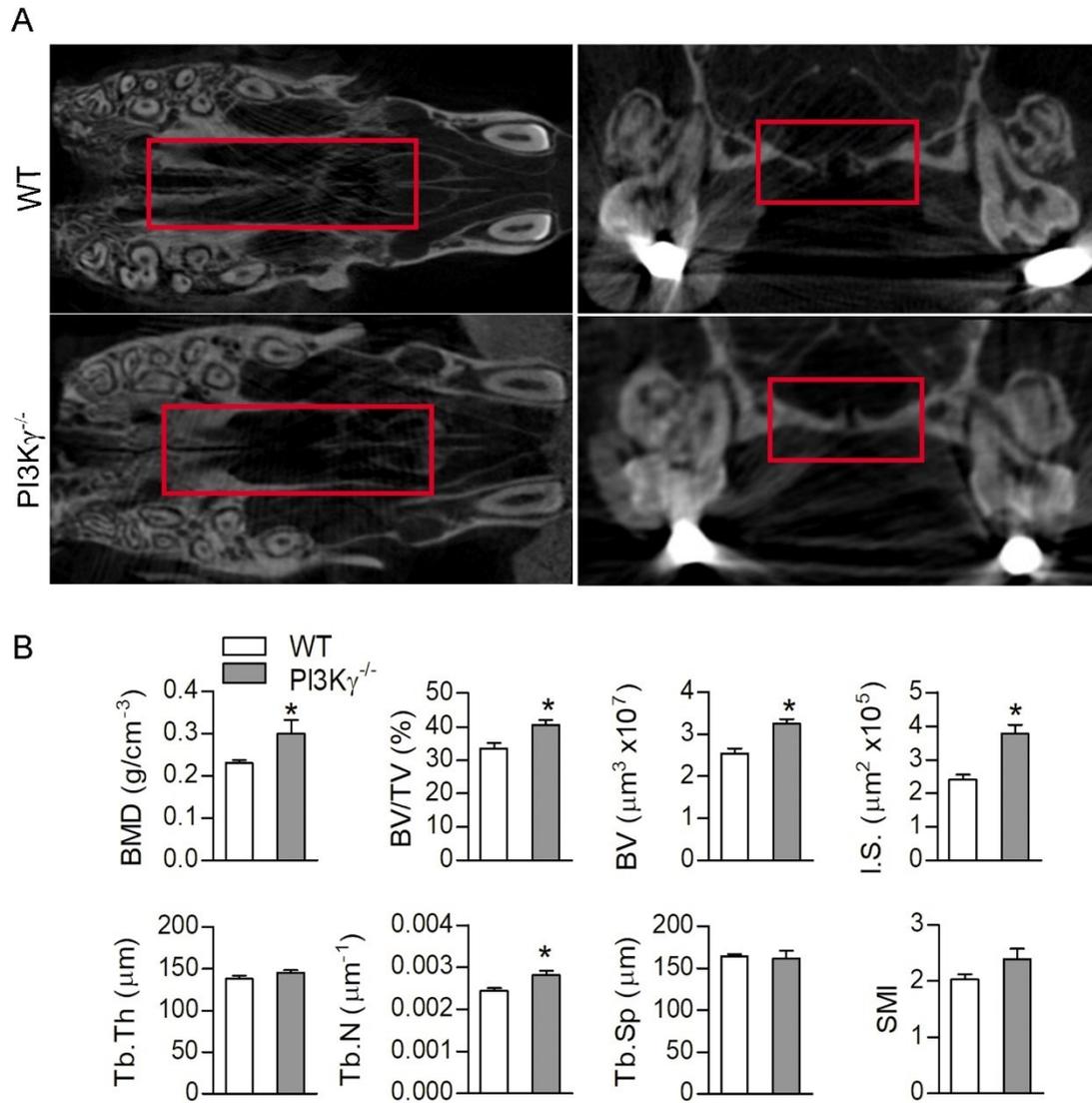


Figura 14 - (A) Morfologia do trabeculado ósseo da região de sutura palatina mediana após ERM de camundongos machos C57BL/6 selvagens (WT), e camundongos machos deficientes para PI3K γ (PI3K $\gamma^{-/-}$). (B) Resultados da análise de microCT da região de sutura palatina mediana da maxila. Parâmetros ósseos avaliados: densidade mineral óssea (BMD; g/cm^3), porcentagem de volume ósseo/volume total (BV/TV; %), volume ósseo (BV; $\mu\text{m}^3 \times 10^8$), índice de modelo estrutural (SMI), espessura das trabéculas (Tb.Th; μm), número de trabéculas (Tb.N; μm^{-1}), separação das trabéculas (Tb.Sp; μm), e superfície de interseção (I.S; $\mu\text{m}^2 \times 10^6$). Retângulos indicam região analisada. (n = 5) * $p < 0,05$. Teste t de Student.

MODELO DE MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA ORTODÔNTICA (OTM)

AUSÊNCIA DE PI3K γ REDUZ MOVIMENTAÇÃO DENTÁRIA ORTODÔNTICA

A análise da movimentação dentária ortodôntica realizada por microCT (Figura 15A e B) e por meio de histomorfometria (Figura 16A e B) demonstraram que a ausência da isoforma γ da enzima PI3K reduziu a movimentação dentária ortodôntica do primeiro molar superior direito quando comparados aos animais WT

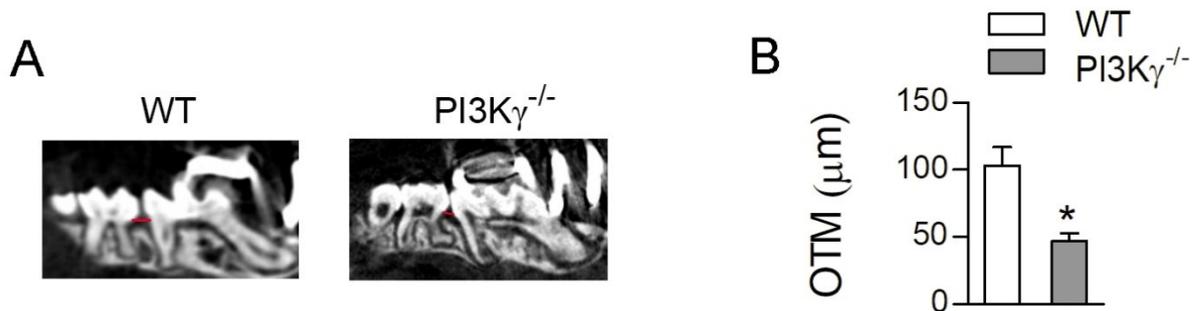


Figura 15 - (A) Imagem representativa da movimentação ortodôntica do primeiro molar superior direito. (B) Quantificação do movimento dentário ortodôntico do primeiro molar superior direito após 12 dias da aplicação de carga mecânica de 0,35 N. (n = 5) * $p < 0,05$ diferença estatística do WT. Teste t de Student.

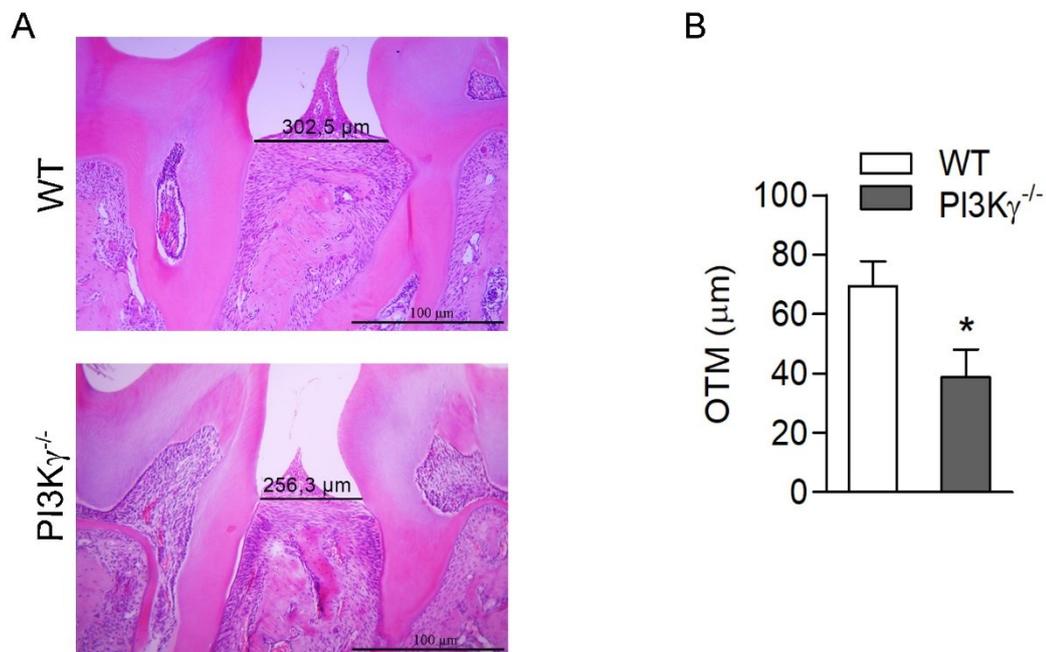


Figura 16 - (A) Primeiro e segundo molar superior direito de camundongos WT e PI3K γ ^{-/-}. (B) Quantificação do movimento dentário ortodôntico do primeiro molar superior direito após 12 dias da aplicação de carga mecânica de 0,35 N. Corte histológico do lado experimental da maxila de camundongos. Coloração hematoxilina e eosina aumento objetiva 10x. (n = 5) * $p < 0,05$. Teste t de Student.

OSSO ALVEOLAR DOS ANIMAIS KNOCKOUT PARA A ENZIMA PI3K γ TEM AUMENTO NO NÚMERO DE OSTEÓBLASTOS E MENOR NÚMERO DE OSTEÓCLASTOS

A movimentação dentária ortodôntica (OTM) induziu o aumento da contagem de osteoblastos nos animais selvagens (WT) em comparação ao lado controle (Cont) (Figura 17A e B). Os animais deficientes para a enzima PI3K γ (PI3K $\gamma^{-/-}$) apresentaram maior número de osteoblastos no lado sem a movimentação dentária ortodôntica (Cont) quando comparados aos WT (Figura 17A e B). Entretanto, a quantificação de osteoblastos realizada no osso alveolar no lado de tensão do ligamento periodontal da raiz disto-vestibular do lado experimental (OTM), realizada através da análise histológica, não apresentou significância estatística entre PI3K $\gamma^{-/-}$ e WT (Figura 17A e B).

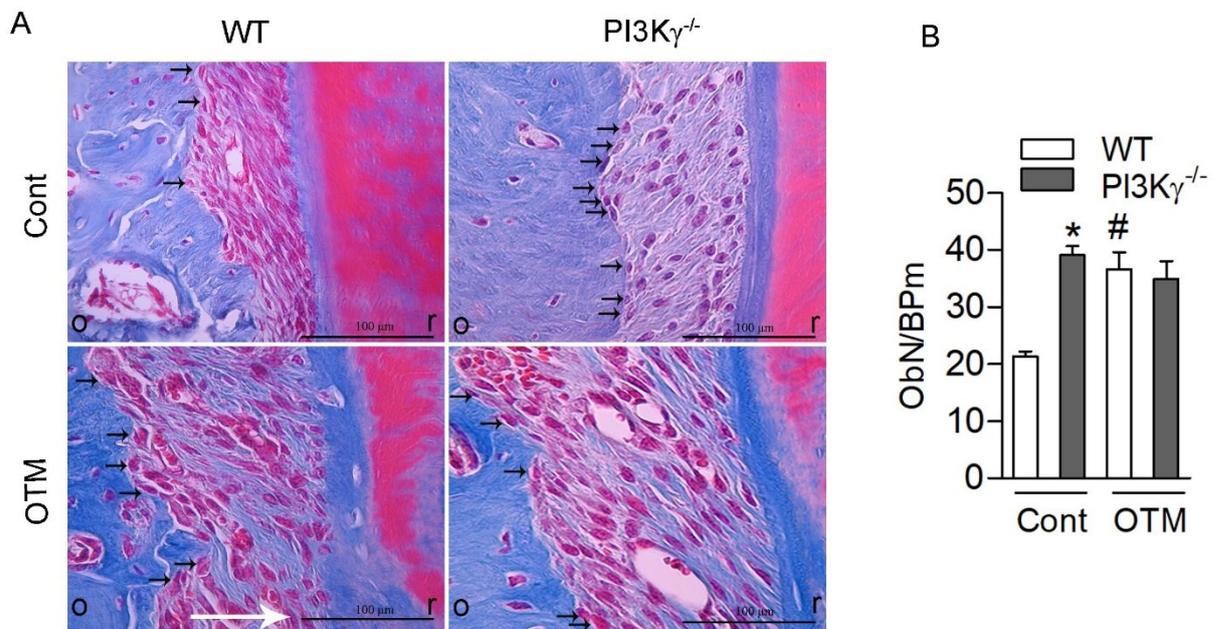


Figura 17 - (A) Animais WT sem movimentação ortodôntica (Cont); Animais WT com movimentação ortodôntica (OTM); Animais PI3K $\gamma^{-/-}$ sem movimentação ortodôntica (Cont); Animais PI3K $\gamma^{-/-}$ com movimentação ortodôntica (OTM). (B) Contagem do número de osteoblastos no osso alveolar do lado de tensão do ligamento periodontal da raiz disto-vestibular do primeiro molar superior. (r) superfície radicular. (o) osso alveolar. Seta preta indicando osteoblasto. Seta branca indicando direção da aplicação de força. Coloração tricômio de Masson, aumento objetiva de 40x. (n = 5) * $p < 0,05$ diferença estatística do WT. # $p < 0,05$ diferença estatística entre lado controle e experimental. Two-way ANOVA.

A movimentação dentária ortodôntica (OTM) induziu aumento da contagem de osteoclastos nos animais WT e PI3K $\gamma^{-/-}$ quando comparados ao lado controle (Cont) (Figura 18A e B). A contagem realizada através de histoquímica (TRAP) no lado de compressão da raiz

disto-vestibular do primeiro molar indicou menor número de osteoclastos nos animais $PI3K\gamma^{-/-}$ quando comparados aos animais WT no lado experimental com OTM (Figura 18A e B).

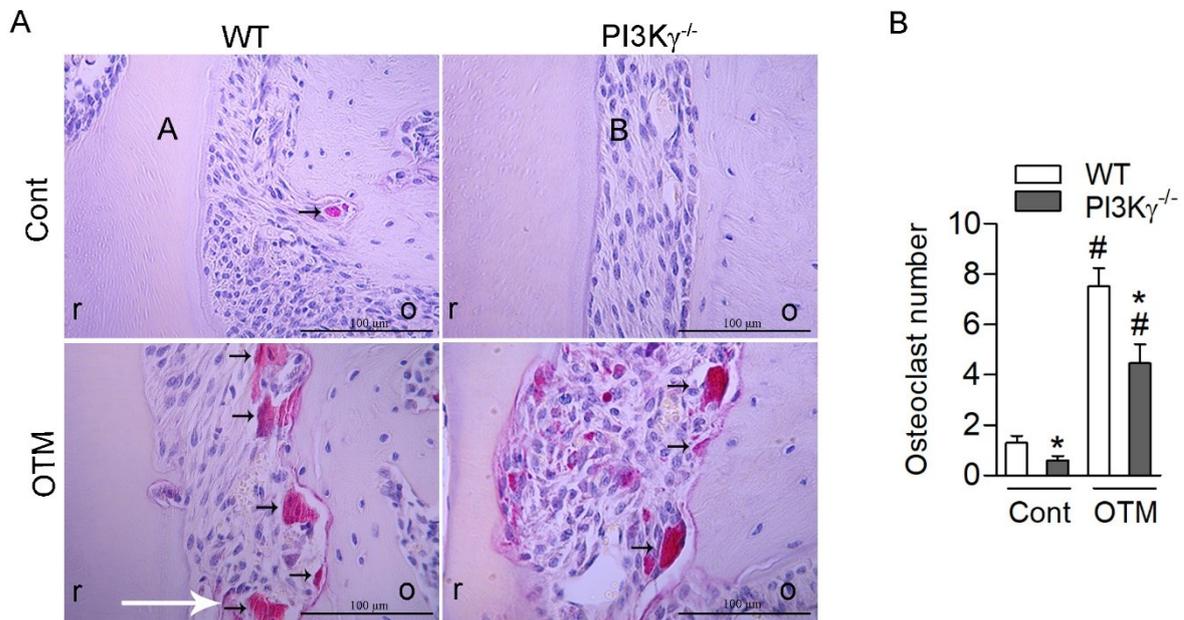


Figura 18. (A) Animais WT sem movimentação ortodôntica (Cont); Animais WT com movimentação ortodôntica (OTM); Animais $PI3K\gamma^{-/-}$ sem movimentação ortodôntica (Cont); Animais $PI3K\gamma^{-/-}$ com movimentação ortodôntica (OTM). (B) Contagem do número de osteoclastos no osso alveolar do lado de compressão do ligamento periodontal da raiz disto-vestibular do primeiro molar superior. As setas apontam osteoclastos na lacuna de Howship TRAP⁺, aumento de 40x. Seta preta indicando osteoclasto. Seta branca indicando direção da aplicação de força. (n = 5) **p* < 0,05 diferença estatística do WT. #*p* < 0,05 diferença estatística entre lado controle e experimental. Two-way ANOVA.

AUSÊNCIA DA ENZIMA $PI3K\gamma$ INDUZIU AUMENTO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE OSTEÓBLASTOS E NÃO ATIVAÇÃO DE MARCADORES DA OSTEÓCLASTOGÊNESE E MARCADORES DE INFLAMAÇÃO NA REMODELAÇÃO ÓSSEA MAXILAR

A avaliação por meio de RT-PCR revelou que a movimentação dentária ortodôntica (OTM) nos animais WT aumentou os níveis de marcadores de osteoblastos, *Runx2* e *Alp*, de biomarcadores inflamatórios, *Tnf-α* e *Il-6*, e marcadores da osteoclastogênese, *Rankl* e proporção *Rankl/Opg* quando comparados ao grupo WT controle (Cont); não houve diferença estatística nos genes *Rank* e *Opg* entre os grupos WT OTM e WT Cont (Figura 19A – H).

A ausência da enzima $PI3K\gamma$ ($PI3K\gamma^{-/-}$) no lado sem movimentação dentária ortodôntica (Cont) induziu o aumento de marcadores de osteoblastos, *Runx2* e *Alp* quando comparados aos animais WT com o mesmo tratamento experimental (Figura 19A e B). Não houve significância estatística nos biomarcadores inflamatórios e marcadores de osteoclastogênese entre os animais $PI3K\gamma^{-/-}$ Cont e WT Cont (Figura 19C – H).

Corroborando com os achados histomorfométricos, a expressão de *Runx2* e *Alp* nos animais do grupo $PI3K\gamma^{-/-}$ OTM foi similar aos valores encontrados para os animais WT OTM e $PI3K\gamma^{-/-}$ Cont (Figura 19A e B), demonstrando a deficiência da enzima $PI3K\gamma$ proporciona aumento da expressão dos marcadores de osteoblastos embora a indução da remodelação óssea da maxila por meio de OTM não tenha gerado acréscimo destes níveis. Os níveis de *Il-6*, *Rankl* e a proporção *Rankl/Opg* foram mitigados na ausência da enzima $PI3K\gamma$ ($PI3K\gamma^{-/-}$ OTM) após indução da remodelação óssea quando comparados ao grupo WT OTM, não havendo diferença estatística entre os animais do grupo $PI3K\gamma^{-/-}$ Cont e $PI3K\gamma^{-/-}$ OTM (Figura 19D, F e H). Os demais marcadores não apresentaram significância estatística.

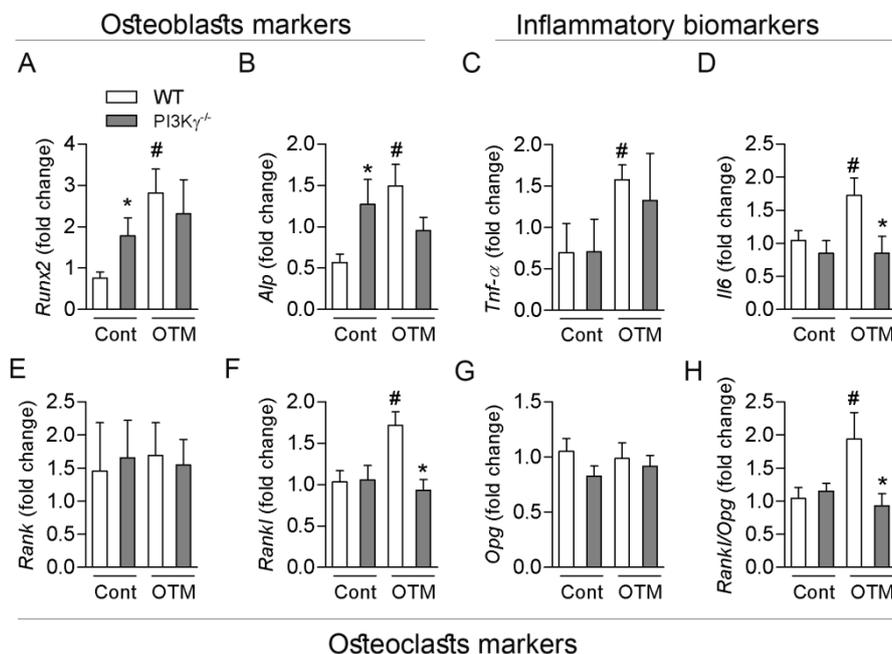


Figura 19 - (A – H) Expressão de marcadores de remodelação óssea da maxila de camundongos machos C57BL/6 selvagens (WT), e camundongos machos deficientes para $PI3K\gamma$ ($PI3K\gamma^{-/-}$). (n = 5) * $p < 0,05$ diferença estatística entre WT e $PI3K\gamma^{-/-}$ no mesmo modelo experimental. # $p < 0,05$ diferença estatística entre lado controle e experimental (OTM). Two-way ANOVA.

ANIMAIS $PI3K\gamma^{-/-}$ APRESENTAM MENOR EXPRESSÃO DE PROTEÍNA p-AKT

Para avaliação das vias de sinalização da $PI3K\gamma$ na homeostase óssea maxilar, foi avaliada a expressão da proteína p-AKT. Sua expressão está relacionada à regulação de atividades celulares tais como, motilidade do citoesqueleto, e sobrevivência celular. A ausência da enzima $PI3K\gamma$ diminui expressão da proteína p-AKT quando comparado ao grupo WT (Figura 20).

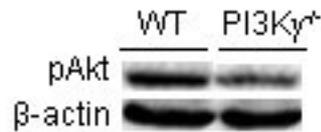


Figura 20 - Expressão da proteína p-Akt na maxila de camundongos WT e PI3K γ ^{-/-}.

Efeito da PI3K γ na raiz dentária na AUSÊNCIA ou PRESENÇA de movimentação dentária ortodôntica (OTM)

ANIMAIS PI3K γ ^{-/-} APRESENTARAM MAIOR VOLUME RADICULAR

Os animais PI3K γ ^{-/-} apresentaram maior volume radicular quando comparados aos animais WT representado pelos maiores valores de RV/TV e RMD na ausência da movimentação dentária ortodôntica (Figura 21A e B), e aumento apenas de RV/TV na presença da força mecânica (OTM) (Figura 22A e B). Não houve significância estatística na RMD entre os animais WT e PI3K γ ^{-/-} após indução da movimentação dentária ortodôntica (Figura 22A e B).

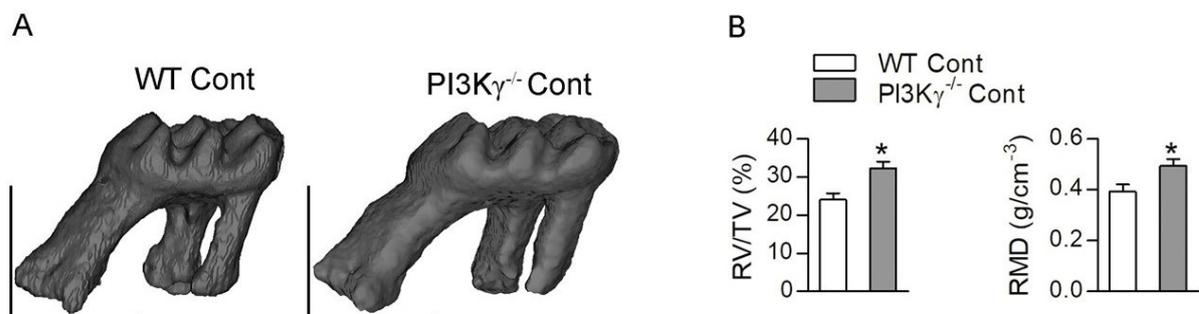


Figura 21 - Avaliação da raiz disto-vestibular do primeiro molar superior dos animais do grupo WT e PI3K γ ^{-/-}. (A) Imagem representativa em 3D do primeiro molar superior esquerdo. (B) Resultados da análise de microCT da raiz disto-vestibular do primeiro molar superior esquerdo. Parâmetros radiculares avaliados: porcentagem de volume radicular/volume total (RV/TV; %), densidade mineral radicular (RMD; g/cm⁻³). (n = 5) * $p < 0,05$ diferença estatística do WT. Teste t de Student.

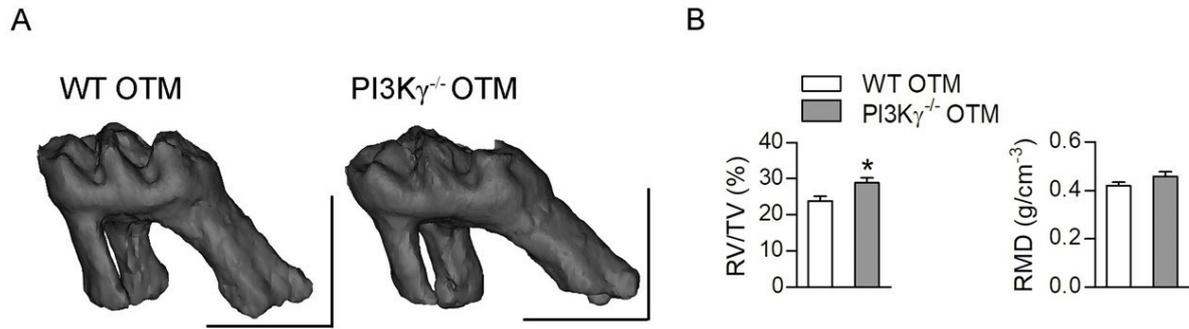


Figura 22 - Avaliação da reabsorção radicular após movimentação ortodôntica. (A) Imagem representativa em 3D do primeiro molar superior direito. (B) Resultados da análise de microCT da raiz disto-vestibular do primeiro molar superior direito. Parâmetros radiculares avaliados: porcentagem de volume radicular/volume total (BV/TV; %), densidade mineral radicular (RMD; g/cm $^{-3}$). (n = 5) * p < 0,05 diferença estatística do WT. # p < 0,05 diferença estatística do PI3K $\gamma^{-/-}$. One-way ANOVA.

CONTAGEM DE ODONTOCLASTOS NA SUPERFÍCIE RADICULAR DOS ANIMAIS PI3K $\gamma^{-/-}$

A movimentação dentária ortodôntica induziu o aumento do número de odontoclastos nos animais do grupo WT na superfície radicular do lado de compressão da raiz disto-vestibular do primeiro molar superior (Figura 23A e B). Embora os animais com ausência da enzima PI3K γ tenham demonstrado pequeno aumento dos odontoclastos, não houve significância estatística na contagem entre os animais WT e PI3K $\gamma^{-/-}$ no lado controle (sem movimentação dentária ortodôntica) e entre os animais PI3K $\gamma^{-/-}$ com e sem OTM (Figura 23A e B).

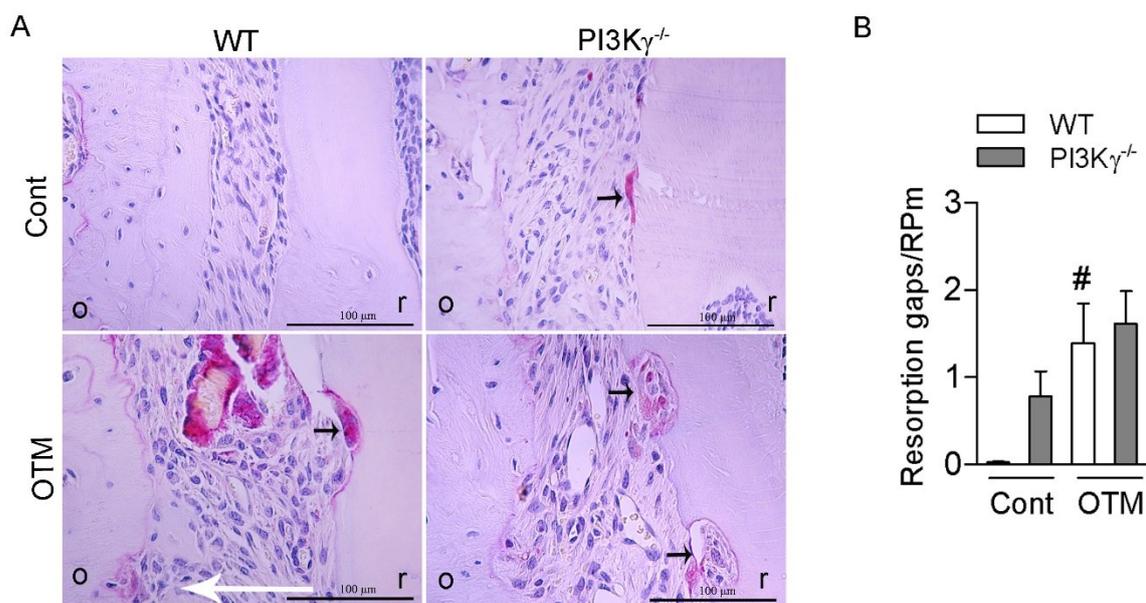


Figura 23. (A) Animais WT sem movimentação ortodôntica (Cont); Animais WT com movimentação ortodôntica (OTM); Animais PI3K $\gamma^{-/-}$ sem movimentação ortodôntica (Cont); Animais PI3K $\gamma^{-/-}$ com

movimentação ortodôntica (OTM). (B) Contagem do número de odontoclastos na superfície radicular da raiz disto-vestibular do primeiro molar superior do lado de compressão do ligamento periodontal. (r) superfície radicular. (o) osso alveolar. Seta preta indicando odontoclasto. Seta branca indicando direção da aplicação de força. Aumento de 40x. (n = 5) * $p < 0,05$ diferença estatística do WT. # $p < 0,05$ diferença estatística entre lado controle e experimental. Two-way ANOVA.

Análise do efeito da PI3K γ no fêmur de animais PI3K $\gamma^{-/-}$ e PI3K $\gamma^{KD/KD}$

AUSÊNCIA OU PERDA DA ATIVIDADE DE PI3K γ AUMENTA QUALIDADE ÓSSEA DO FÊMUR

Os fêmures foram analisados por motivos de comparação de diferentes sítios ósseos. A análise da metáfise distal do fêmur por microCT revelou que os animais PI3K $\gamma^{-/-}$ apresentam maior qualidade óssea que pode ser verificado pelo aumento de BMD, BV/TV, I.S, Tb.Th, e redução do SMI, quando comparados com os animais WT. Não foram observadas significância estatística nos parâmetros BV, Tb.N; Tb.Sp. Os animais com perda da atividade da enzima PI3K γ (PI3K $\gamma^{KD/KD}$) apresentaram maior BV/TV, BV, e menor SMI quando comparados aos animais WT. Porém, apresentaram menor BMD quando comparados aos animais WT e PI3K $\gamma^{-/-}$. Além disso, apresentaram maior I.S, e maior Tb.Th quando comparados aos animais WT e PI3K $\gamma^{-/-}$ (Figura 24A e B).

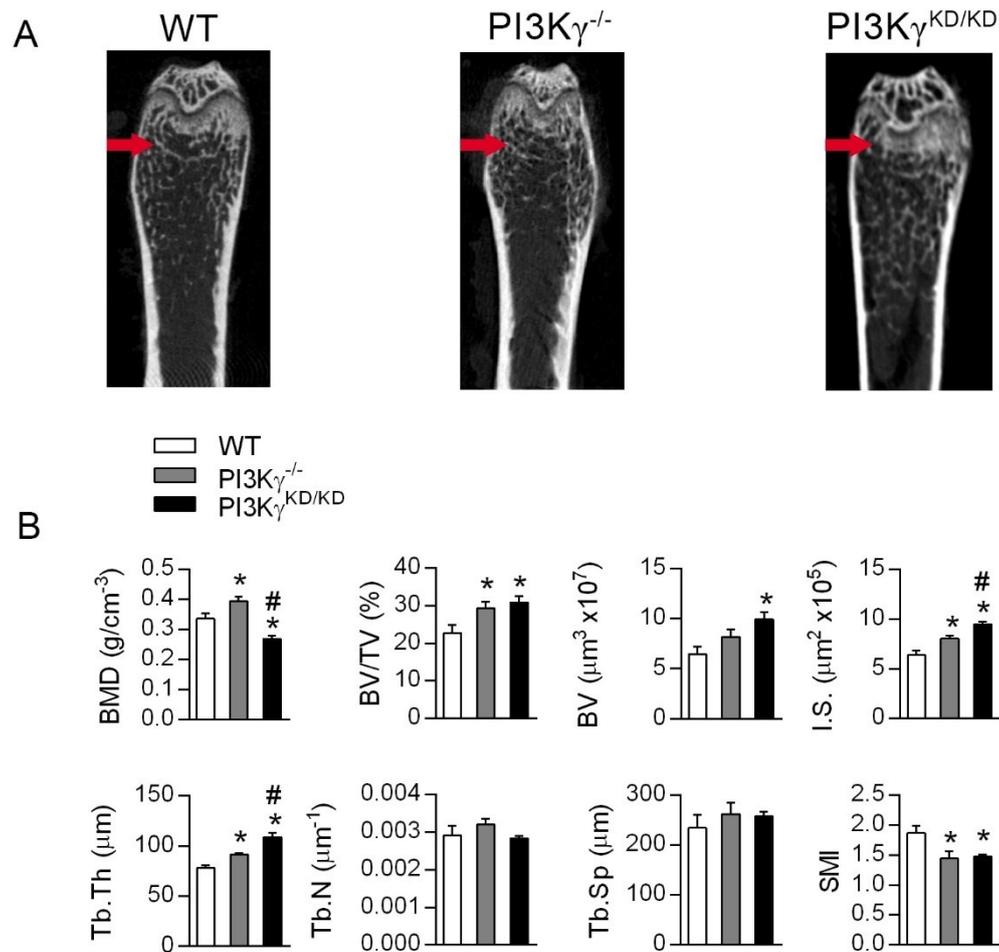


Figura 24. Morfologia do trabeculado ósseo da extremidade distal do fêmur de camundongos machos C57BL/6 selvagens (WT), camundongos machos deficientes para PI3K γ (PI3K $\gamma^{-/-}$), e camundongos machos com perda da atividade da PI3K γ (PI3K $\gamma^{KD/KD}$). (A) Imagens representativas de fêmur dos camundongos WT, PI3K $\gamma^{-/-}$, PI3K $\gamma^{KD/KD}$. (B) Resultados da análise de microCT do fêmur. Parâmetros ósseos avaliados: densidade mineral óssea (BMD; g/cm³), porcentagem de volume ósseo/volume total (BV/TV; %), volume ósseo (BV; $\mu\text{m}^3 \times 10^8$), índice de modelo estrutural (SMI), espessura das trabéculas (Tb.Th; μm), número de trabéculas (Tb.N; μm^{-1}), separação das trabéculas (Tb.Sp; μm), e superfície de interseção (I.S; $\mu\text{m}^2 \times 10^6$). Setas indicam região analisada. (n = 5) * $p < 0,05$ diferença estatística do WT. # $p < 0,05$ diferença estatística do PI3K $\gamma^{-/-}$. One-way ANOVA.

Esses dados em conjunto sugerem fenótipo ósseo com aumento da microarquitetura óssea nos fêmures tanto dos animais ausentes para PI3K γ (PI3K $\gamma^{-/-}$) quanto os animais com perda da atividade da enzima PI3K γ (PI3K $\gamma^{KD/KD}$).

Avaliação do efeito da deficiência da enzima PI3K γ na diferenciação celular de osteoblastos e osteoclastos *in vitro*

ANIMAIS PI3K γ ^{-/-} APRESENTAM MAIOR DEPÓSITO DE NÓDULOS DE MINERALIZAÇÃO *IN VITRO*

A cultura de osteoblastos a partir da diferenciação de células da medula óssea dos animais ausentes para PI3K γ apresentaram maior área de deposição mineral coradas por vermelho de alizarina quando comparados aos animais WT, apresentando maiores valores de densidade óptica e porcentagem (Figura 25A e B).

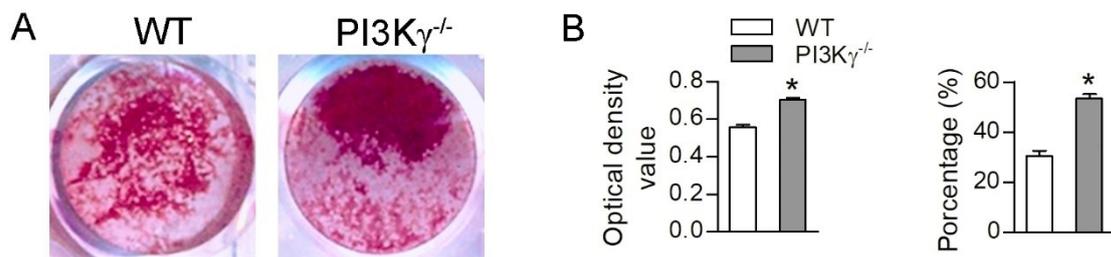


Figure 25 - Ausência de PI3K γ aumenta a formação de depósitos de nódulos de mineralização em cultura de osteoblastos. (A) Áreas de mineralização por osteoblastos diferenciados de células da medula óssea de camundongos machos C57BL/6 selvagens (WT) e camundongos machos deficientes para PI3K γ (PI3K γ ^{-/-}). (B) Quantificação das áreas de mineralização expressas em densidade óptica e porcentagem. * $p < 0,05$. Teste t de Student.

ANIMAIS PI3K γ ^{-/-} APRESENTAM MENOR NÚMERO DE OSTEOCLASTOS *IN VITRO*

A contagem de células multinucleadas TRAP⁺ demonstrou menor número de osteoclastos diferenciados na cultura de células da medula óssea dos animais PI3K γ ^{-/-} quando comparados ao grupo WT (Figura 26A e B).

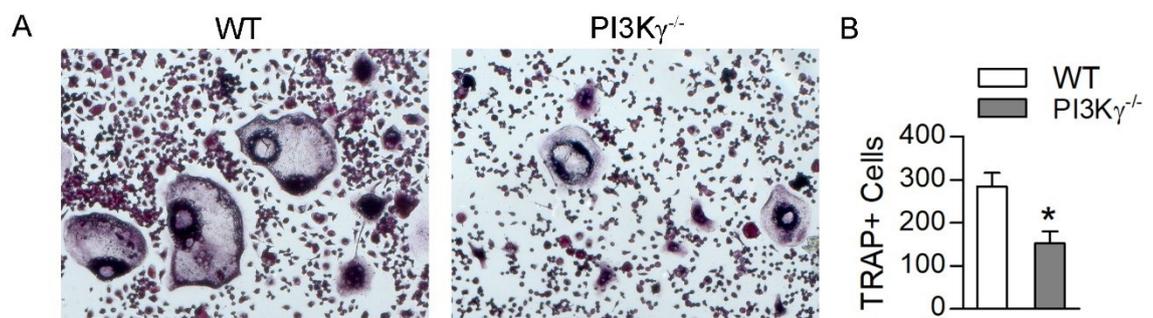


Figure 26 - Ausência de PI3K γ reduz a diferenciação de osteoclastos *in vitro*. (A) Osteoclastos diferenciados de células da medula óssea de camundongos machos C57BL/6 selvagens (WT) e camundongos machos deficientes para PI3K γ (PI3K γ ^{-/-}). (B) Contagem de células TRAP⁺. * $p < 0,05$. Teste t de Student.

7 DISCUSSÃO

As importantes ações resultantes da atividade da PI3K para o controle de respostas celulares como proliferação celular, motilidade do citoesqueleto, metabolismo, crescimento, sobrevivência, e diferenciação celular estimulou pesquisas em diversas áreas da saúde na solução de doenças como osteoporose (CUI et al., 2020), gota (GALVÃO et al., 2019; TAVARES et al., 2019) e doenças inflamatórias (LIMA et al., 2019). O presente estudo foi o primeiro a demonstrar que a PI3K γ exerce importante papel na remodelação óssea maxilar induzida por força mecânica. A ausência da enzima PI3K γ e a perda da sua atividade cinase aumentou a microarquitetura óssea maxilar. Os animais ausentes para a enzima PI3K γ demonstraram diminuição da remodelação óssea induzida por carga mecânica no osso alveolar e maxilar com menor movimentação dentária ortodôntica (OTM) e redução da abertura da sutura palatina mediana (ERM). Esses achados foram relacionados com maior diferenciação de osteoblastos por meio do aumento da expressão de *Runx2* e *Alp*, e redução no número de osteoclastos pela mitigação da resposta inflamatória via redução de *Il-6* e a falta de responsividade dos animais ausentes de PI3K γ aos marcadores da osteoclastogênese, estando a via de sinalização da p-Akt envolvida neste processo de sinalização. Além dos efeitos ósseos na maxila, a falta da enzima PI3K γ causou efeito em outras estruturas como maior volume radicular associado à falta de atividade clástica e aumento da estrutura trabecular do fêmur com aumento da diferenciação dos osteoblastos e redução da contagem dos osteoclastos *in vitro*.

O desenvolvimento de camundongos com deleção de diferentes isoformas da enzima PI3K tem sido importante para melhor definição das funções específicas de cada isoforma nos tecidos e células (FRUMAN et al., 2017). Nesse estudo foram utilizados camundongos PI3K γ ^{-/-} e PI3K γ ^{KD/KD}, animais ausentes para a enzima e animais com perda da atividade cinase, respectivamente (HIRSCH et al., 2000; PATRUCCO et al., 2004). Esses animais apresentam comprometimento no recrutamento de células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos, uma vez que a PI3K IB é expressa majoritariamente em células de origem hematopoiéticas e atua na remodelação do citoesqueleto e mobilidade leucocitária (HIRSCH et al., 2000; PATRUCCO et al., 2004). A falta de PI3K γ foi associada à diminuição da reabsorção óssea no fêmur (KANG et al., 2010) por meio da supressão da osteoclastogênese através da inibição da via de sinalização PI3K/AKT (CUI et al., 2020). Entretanto não há relato na literatura sobre os efeitos da enzima PI3K γ sobre os ossos maxilares, sendo portanto o objetivo de nosso estudo.

O efeito da PI3K γ no osso maxilar na ausência da remodelação óssea induzida foi avaliado por microCT, através da análise da microarquitetura óssea da região de furca do primeiro molar superior, crista óssea alveolar e osso palatino nos animais PI3K γ ^{-/-} e PI3K γ ^{KD/KD}.

Nossos resultados revelam que os animais com ausência ou perda da atividade da enzima apresentam aumento da arquitetura óssea. Não há relatos na literatura sobre o fenótipo do osso maxilar na ausência da PI3K γ no processo de remodelação óssea fisiológica. Entretanto, a via de sinalização da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) participa do desenvolvimento e manutenção do esqueleto resultando na ativação de diversas cascatas de sinalização intracelular (FANTAUZZO; SORIANO, 2014; KLINGHOFFER et al., 2002; WANG et al., 2020). Estudos prévios em camundongos transgênicos onde a PI3K não era capaz de se ligar ao PDGFR α (receptor A do fator de crescimento derivado de plaquetas) (animais $Pdgfra^{PI3K/PI3K}$) resultaram em defeitos craniofaciais severos nos embriões resultando na ausência de fusão dos processos maxilares e fissuras palatinas (FANTAUZZO; SORIANO, 2014; KLINGHOFFER et al., 2002). Adicionalmente, animais deficientes para o receptor de neutrofina (p75NTR) demonstraram redução da massa óssea alveolar da maxila por meio do aumento da via de sinalização da PI3K/Via Akt/ β -catenina (WANG et al., 2020). Estes achados indicam o importante papel da via de sinalização da PI3K na homeostase óssea maxilar.

A remodelação óssea maxilar induzida por meio da instalação de mola ortodôntica (TADDEI et al., 2012) e disjuntor maxilar (GUERRERO et al., 2020) desencadeia um processo inflamatório agudo asséptico, no qual moléculas inflamatórias são liberadas no ambiente ósseo causando ativação e recrutamento de células. A indução da remodelação óssea intramembranosa através da aplicação força ortodôntica (OTM) e endocondral por meio de força ortopédica (ERM) foi avaliada por microCT em nosso estudo. Os dados revelaram menor movimentação dentária ortodôntica nos ossos maxilares assim como redução da expansão da sutura palatina mediana nos animais $PI3K\gamma^{-/-}$. Corroborando com nossos resultados, Watabe et al., (2011) verificaram a importância da via PI3K/Akt para o aumento da expressão de marcadores de remodelação óssea em osteoblastos mandibulares (osso com formação intramembranosa) de camundongos após indução mecânica por meio de mecanotransdução induzida por ultrassom pulsado de baixa intensidade terapêutica (LIPUS). Estudos em humanos mostraram grande variabilidade da expressão de PI3K e Akt no ligamento periodontal durante a ativação de força ortodôntica, sugerindo que a via PI3K/Akt juntamente com mTOR/P70S6 K está envolvida na movimentação dentária ortodôntica e desempenha um papel no processo de remodelação do periodonto (XU et al., 2017). Em adição, estudos avaliaram que a via PI3K regula o crescimento do osso endocondral por meio de controle da diferenciação hipertrófica de condrócitos (DENG et al., 2014; ULICI et al., 2008).

Na ausência de PI3K γ , o osso maxilar que não foi submetido à força mecânica apresentou na análise histológica maior contagem de osteoblastos. No entanto, embora Kang et

al., (2010) não tenham encontrado diferenças na contagem dessas células na ausência de indução mecânica da remodelação óssea no fêmur de camundongos $PI3K\gamma^{-/-}$, estudos *in vitro* demonstraram que a inibição da via PI3K apresenta-se como potente inibidor da diferenciação dos osteoblastos (FUJITA et al., 2004; GUNTUR; ROSEN, 2011, 2011; KE et al., 2016; LI et al., 2020; MCGONNELL et al., 2012; XI et al., 2015), resultados que se opõem a nossos achados. Os estudos supracitados foram realizados em sua grande maioria em cultura de células precursoras de osteoblastos MC3T3 derivadas de *Mus musculus* calvária (DANCIU et al., 2003; FUJITA et al., 2004) células pluripotentes C3H10T1/2 (MUKHERJEE; ROTWEIN, 2009) ou células de medula óssea, entretanto de animais ovariectomizados (CUI et al., 2020; KE et al., 2016; LI et al., 2020) diferentemente de nosso trabalho onde as análises dos osteoblastos foram realizadas nos ossos maxilares de animais $PI3K\gamma^{-/-}$.

Por meio da histologia também foi possível observar menor contagem de osteoclastos na maxila de animais $PI3K\gamma^{-/-}$ tanto no lado onde houve a indução da remodelação óssea (OTM), quanto no lado onde não houve indução da remodelação óssea (Cont). Corroborando com nossos achados, Kang et al., 2010 observaram menor número de osteoclastos na análise histológica da tíbia de animais $PI3K\gamma^{-/-}$ na ausência da indução de remodelação óssea.

Nossos achados demonstraram que a ausência de $PI3K\gamma$ induziu o aumento da expressão de marcadores de osteoblastos, mitigou a expressão do marcador inflamatório *Il-6* e induziu falta de responsividade aos marcadores da osteoclastogênese, independentemente de *Tnf- α* . Watabe et al., (2011) afirmam que após aplicação de estímulo mecânico LIPUS nos osteoblastos da mandíbula de camundongos, os marcadores de osteoblastos como *Runx2* e *Alp*, apresentam-se aumentados. Estes achados corroboram com nossos resultados uma vez que ambos genes apresentaram-se aumentados em animais $PI3K\gamma^{-/-}$ e permanecendo com alta expressão após indução de OTM.

Watabe et al., (2011) afirmaram através de estudo *in vitro* que após estimulação mecânica, a razão *Rankl/Opg* apresenta-se aumentada indicando dessa forma osteoclastogênese local e aumento da remodelação óssea. Nossos achados revelam que nos animais $PI3K\gamma^{-/-}$ tanto a expressão do gene *Rankl* como a relação *Rankl/Opg* não foram alteradas com ou sem o estímulo mecânico para a remodelação óssea, indicando menor reatividade a diferenciação de osteoclastos na maxila nestes animais. Em consonância com nossos achados, outros estudos confirmaram a participação da PI3K na no processo de diferenciação, atividade e sobrevivência dos osteoclastos *in vivo* (KANG et al., 2010) e *in vitro* (CUI et al., 2020; GOLDEN; INSOGNA, 2004; LEE et al., 2002).

Hirsch et al., (2000) relatam que os animais $PI3K\gamma^{-/-}$ apresentam deficiência no recrutamento de células inflamatórias que, conseqüentemente, são responsáveis pela expressão de moléculas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α , e são liberadas após a aplicação de força sobre o tecido ósseo (MACARI et al., 2018a, 2018b). A redução da expressão dessas moléculas regulam negativamente a expressão de RANKL, gerando uma menor diferenciação e ativação de osteoclastos, e como consequência diminui a remodelação óssea. Embora nossos dados demonstrem que a homeostase óssea dos animais deficientes de $PI3K\gamma$ seja independente de TNF- α , a análise de expressão gênica indicou mitigação da expressão da citocina pró-inflamatória *Il-6* e do gene osteoclastogênico *Rankl*.

A expressão da proteína p-Akt nos ossos maxilares foi verificada por Western Blot. Sua expressão está relacionada à regulação de atividades celulares tais como, motilidade do citoesqueleto, e sobrevivência celular. A ausência da enzima $PI3K\gamma$ diminuiu expressão da proteína p-Akt, corroborando com achados já descritos na literatura (ANDREWS; STEPHENS; HAWKINS, 2007; CUI et al., 2020; DENG et al., 2014; WANG et al., 2020).

A reabsorção radicular patológica que ocorre após aplicação de força em um elemento dentário, é semelhante ao que acontece na reabsorção óssea induzida, sendo um efeito colateral da movimentação dentária ortodôntica (SASAKI, 2003). Nossa análise da estrutura radicular revelou que na ausência de movimentação ortodôntica, os animais $PI3K\gamma^{-/-}$ apresentaram maior volume e densidade radicular, e mesmo após a indução da movimentação ortodôntica continuaram apresentando maior volume radicular. Corroborando com os achados de microCT, embora tenha havido tendência de maior número de odontoclastos nos animais deficientes para $PI3K\gamma$ no lado controle, esta não foi estatisticamente significativa quando comparados aos animais selvagens. Diferentemente dos animais WT, não houve aumento destas células após indução de OTM nos animais $PI3K\gamma^{-/-}$. Esses dados sugerem um papel protetor da ausência de $PI3K\gamma$ na reabsorção radicular, que pode estar relacionada com a mitigação da expressão de *IL-6* e falta de responsividade ao *Rankl* dos ossos maxilares.

Com o intuito de comparar a remodelação óssea fisiológica em diferentes sítios, os fêmures dos camundongos $PI3K\gamma^{-/-}$ e $PI3K\gamma^{KD/KD}$ foram analisados por microCT. O fenótipo ósseo do fêmur destes animais apresentou padrão semelhante ao osso maxilar demonstrado pelos parâmetros BMD, BV/TV, BV, I.S, e Tb.Th, em corroboração com Kang et al., 2010.

Estudos realizados por Mukherjee; Rotwein, (2009); Osyczka; Leboy, (2005) e Gámez et al., (2016), relataram que as PI3Ks da subclasse IA exercem papéis importantes na proliferação, ativação e sobrevivência dos osteoblastos através da ativação de receptores tirosina cinase. Aqui demonstramos que a cultura de osteoblastos a partir da diferenciação de

células da medula óssea dos animais ausentes para PI3K γ apresentaram maior área de deposição mineral. Considerando que essa classe de enzima é expressa em células de origem hematopoiética, e os osteoblastos são originados a partir da diferenciação de células mesenquimais, os mecanismos envolvidos nessa maior deposição de minerais precisam ser elucidados. Greenfield et al., (2011), levantaram a hipótese de que pode haver mecanismos de compensação das outras isoformas de PI3K frente a ausência de PI3K γ . Ao contrário de nossos achados, estudos demonstraram que inibidores de PI3K preveniram a formação de osteoblastos em cultura de células (MUKHERJEE; ROTWEIN, 2009). Nosso resultado difere do estudo supracitado pois utilizaram células imortalizadas C3H10T1/2 tratadas com inibidores não seletivos de PI3K γ enquanto utilizamos células da medula óssea de animais PI3K $\gamma^{-/-}$. Ao contrário dos nossos achados, Kang et al., 2010 não observaram diferença significativa na área de mineralização da cultura de osteoblastos dos animais PI3K $\gamma^{-/-}$, porém os autores não relataram após quantos dias de cultivo celular a matriz mineralizada foi analisada.

Estudos de Shugg et al., (2013) mostraram através de ensaios de reabsorção que os osteoclastos tratados com inibidor seletivo da PI3K γ (AS-252424) não causaram uma redução significativa na área total reabsorvida, bem como no número de fossas e na profundidade das mesmas. Nossos resultados demonstram menor número de osteoclastos diferenciados na cultura dos animais PI3K $\gamma^{-/-}$, porém não foram realizadas análises da atividade dessas células como no estudo supracitado. Resultados semelhantes ao nosso estudo foram relatados por Cui et al., (2020); Kang et al., (2010); Lee et al., (2002).

8 CONCLUSÃO

A ausência da PI3K γ demonstrou importante papel na homeostase das estruturas maxilares proporcionando aumento da microarquitetura dos ossos maxilares, osso do palato e aumento da densidade mineral radicular com ou sem indução de estímulo mecânico. A falta da PI3K γ modulou tanto a osteoblastogênese como a osteoclastogênese nos ossos maxilares, acompanhado pelo aumento da expressão de genes indutores da formação óssea, como *Runx2* e *Alp* na ausência de indução da remodelação óssea, e diminuição do gene pró-inflamatório, *Il-6*, assim como falta de responsividade a genes indutores da reabsorção óssea via *Rankl*.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. A. Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 8, p. 2271–2290, 2001.
- AMARO, E. R. S. et al. Estrogen protects dental roots from orthodontic-induced inflammatory resorption. **Archives of Oral Biology**, v. 117, 2020.
- ANDREWS, S.; STEPHENS, L. R.; HAWKINS, P. T. PI3K class IB pathway. **Science's STKE : signal transduction knowledge environment**, v. 2007, n. 407, p. 2–4, 2007.
- AOKI, S. et al. Function of OPG as a traffic regulator for RANKL is crucial for controlled osteoclastogenesis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 9, p. 1907–1921, 2010.
- ASANO, M. et al. IL-8 and MCP-1 induced by excessive orthodontic force mediates odontoclastogenesis in periodontal tissues. **Oral Diseases**, v. 17, n. 5, p. 489–498, 2011.
- BACKER, J. M. The regulation and function of Class III PI3Ks: Novel roles for Vps34. **Biochemical Journal**, v. 410, n. 1, p. 1–17, 2008.
- BARON, R. et al. Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: Evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. **Journal of Cell Biology**, v. 101, n. 6, p. 2210–2222, 1985.
- BARON, R.; KNEISSEL, M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. **Nature Medicine**, v. 19, n. 2, p. 179–192, 2013.
- BILANGES, B.; POSOR, Y.; VANHAESEBROECK, B. PI3K isoforms in cell signalling and vesicle trafficking. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 9, p. 515–534, 2019.
- BOYCE, B. F.; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 473, n. 2, p. 139–146, 2008.
- BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, p. 337–342, 2003.
- BREZNIAK, N.; WASSERSTEIN, A. Root resorption after orthodontic treatment: Part 1. Literature review. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 103, n. 1, p. 62–66, 1993.
- CHELLAIAH, M. et al. c-Src is required for stimulation of gelsolin-associated phosphatidylinositol 3-kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 19, p. 11908–11916, 1998.
- CHELLAIAH, M.; HRUSKA, K. Osteopontin stimulates gelsolin-associated phosphoinositide levels and phosphatidylinositol triphosphate-hydroxyl kinase. **Molecular Biology of the Cell**, v. 7, n. 5, p. 743–753, 1996.

- CUI, J. et al. Triptolide prevents bone loss via suppressing osteoclastogenesis through inhibiting PI3K-AKT-NFATc1 pathway. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 11, p. 6149–6161, 2020.
- DALLAS, S. L.; PRIDEAUX, M.; BONEWALD, L. F. The osteocyte: An endocrine cell . . . and more. **Endocrine Reviews**, v. 34, n. 5, p. 658–690, 2013.
- DANCIU, T. E. et al. Calcium regulates the PI3K-Akt pathway in stretched osteoblasts. **FEBS Letters**, v. 536, n. 1–3, p. 193–197, 2003.
- DENG, Z. et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in rat condylar chondrocytes regulated by PTHrP treatment. **Archives of Oral Biology**, v. 59, n. 10, p. 1032–1041, 2014.
- DI DOMENICO, M. et al. Cytokines and VEGF induction in orthodontic movement in animal models. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, n. Figure 1, p. 1–5, 2012.
- ENGELMAN, J. A.; LUO, J.; CANTLEY, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 8, p. 606–619, 2006.
- ERIKSEN, E. F. Cellular mechanisms of bone remodeling. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 11, n. 4, p. 219–227, 2010.
- FANTAUZZO, K. A.; SORIANO, P. PI3K-mediated PDGFR α signaling regulates survival and proliferation in skeletal development through p53-dependent intracellular pathways. **Genes and Development**, v. 28, n. 9, p. 1005–1017, 2014.
- FRANKE, T. F.; KAPLAN, D. R.; CANTLEY, L. C. PI3K: Downstream AKTion blocks apoptosis. **Cell**, v. 88, n. 4, p. 435–437, 1997.
- FRUMAN, D. A. et al. The PI3K Pathway in Human Disease. **Cell**, v. 170, n. 4, p. 605–635, 2017.
- FUJITA, T. et al. Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling. **Journal of Cell Biology**, v. 166, n. 1, p. 85–95, 2004.
- GALVÃO, I. et al. The inhibition of phosphoinositide-3 kinases induce resolution of inflammation in a gout model. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. JAN, p. 1–10, 2019.
- GÁMEZ, B. et al. Class I PI-3-Kinase Signaling Is Critical for Bone Formation Through Regulation of SMAD1 Activity in Osteoblasts. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 31, n. 8, p. 1617–1630, 2016.
- GARLET, T. P. et al. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. **European Journal of Oral Sciences**, v. 115, n. 5, p. 355–362, 2007.

- GASSER, J. A.; KNEISSEL, M. **Bone physiology and biology**. [s.l: s.n.].
- GHIGO, A. et al. PI3K inhibition in inflammation: Toward tailored therapies for specific diseases. **BioEssays**, v. 32, n. 3, p. 185–196, 2010.
- GHOSH-CHOUDHURY, N. et al. Requirement of BMP-2-induced phosphatidylinositol 3-kinase and Akt serine/threonine kinase in osteoblast differentiation and Smad-dependent BMP-2 gene transcription. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 36, p. 33361–33368, 2002.
- GIANELLY, A. A. Force-induced changes in the vascularity of the periodontal ligament. **American Journal of Orthodontics**, v. 55, n. 1, p. 5–11, 1969.
- GOLDEN, L. H.; INSOGNA, K. L. The expanding role of PI3-kinase in bone. **Bone**, v. 34, n. 1, p. 3–12, 2004.
- GOLDRING, S. R. Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 42, n. SUPPL. 2, p. 11–16, 2003.
- GREENFIELD, E. M. et al. PI3K γ deletion reduces variability in the in vivo osteolytic response induced by orthopaedic wear particles. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 29, n. 11, p. 1649–1653, 2011.
- GUERRERO, J. A. et al. Maxillary suture expansion: A mouse model to explore the molecular effects of mechanically-induced bone remodeling. **Journal of Biomechanics**, v. 108, p. 109880, 2020.
- GUNTUR, A. R.; ROSEN, C. J. The skeleton: A multi-functional complex organ. New insights into osteoblasts and their role in bone formation: The central role of PI3Kinase. **Journal of Endocrinology**, v. 211, n. 2, p. 123–130, 2011a.
- GUNTUR, A.; ROSEN, C. J. New Insights into Osteoblasts and Their Role in Bone Formation: The Central Role of PI3Kinase Anyonya. v. 211, n. 2, p. 123–130, 2011b.
- HERRING, S. W. Sutures - a tool in functional cranial analysis. **Acta anat**, v. 83, p. 222–247, 1972.
- HERRING, S. W. Mechanical influences on suture development and patency. **Frontiers of oral biology**, v. 12, p. 41–56, 2008.
- HIRSCH, E. et al. Central role for G protein coupled PI3K γ in Inflammation. **Science**, v. 287, p. 1049–1053, 2000.
- HOU, B.; FUKAI, N.; OLSEN, B. R. Mechanical force-induced midpalatal suture remodeling in mice. **Bone**, v. 40, n. 6, p. 1483–1493, 2007.
- HSU, H. et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. **Proceedings of the National**

- Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 7, p. 3540–3545, 1999.
- HUANG, H. et al. Osteoclast differentiation requires TAK1 and MKK6 for NFATc1 induction and NF- κ B transactivation by RANKL. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, n. 11, p. 1879–1891, 2006.
- HUANG, H.; WILLIAMS, R. C.; KYRKANIDES, S. Accelerated orthodontic tooth movement: Molecular mechanisms. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 146, n. 5, p. 620–632, 2014.
- HUH, J. E.; LEE, S. Y. IL-6 is produced by adipose-derived stromal cells and promotes osteogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 12, p. 2608–2616, 2013.
- IGLESIAS-LINARES, A.; HARTSFIELD, J. K. Cellular and Molecular Pathways Leading to External Root Resorption. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 2, p. 145–152, 2017.
- IMAI, Y. et al. Minireview: Osteoprotective action of estrogens is mediated by osteoclastic estrogen receptor- α . **Molecular Endocrinology**, v. 24, n. 5, p. 877–885, 2010.
- JENSEN, E. D.; GOPALAKRISHNAN, R.; WESTENDORF, J. J. Regulation of gene expression in osteoblasts. **BioFactors**, v. 36, n. 1, p. 25–32, 2010.
- KANG, H. et al. Important roles of PI3K γ in osteoclastogenesis and bone homeostasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 29, p. 12901–12906, 2010.
- KARSENTY, G. Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. **Semin Cell Dev Biol**, v. 11, n. 5, p. 343–346, 2000.
- KATAGIRI, T.; TAKAHASHI, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast.pdf. n. November 2001, p. 147–159, 2002.
- KATEBI, N. et al. The mouse palate and its cellular responses to midpalatal suture expansion forces. **Orthodontics and Craniofacial Research**, v. 15, n. 3, p. 148–158, 2012.
- KE, K. et al. Asperosaponin VI promotes bone marrow stromal cell osteogenic differentiation through the PI3K/AKT signaling pathway in an osteoporosis model. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 2–10, 2016.
- KLINGHOFFER, R. A. et al. An allelic series at the PDGF α R locus indicates unequal contributions of distinct signaling pathways during development. **Developmental Cell**, v. 2, n. 1, p. 103–113, 2002.
- KONG, D. X.; YAMORI, T. ZSTK474, a novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor identified using the JFCR39 drug discovery system. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 31, n. 9, p. 1189–1197, 2010.

- KOYASU, S. Pi3K Fncion. v. 4, n. 4, p. 313–319, 2003.
- KRISHNAN, V.; DAVIDOVITCH, Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 129, n. 4, p. 469.e1-469.e32, 2006.
- KRISHNAN, V.; DAVIDOVITCH, Z. On a path to unfolding the biological mechanisms of orthodontic tooth movement. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 7, p. 597–608, 2009.
- KULAR, J. et al. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. **Clinical Biochemistry**, v. 45, n. 12, p. 863–873, 2012.
- LAKKAKORPI, P. T. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase association with the osteoclast cytoskeleton, and its involvement in osteoclast attachment and spreading. **Experimental Cell Research**, v. 237, n. 2, p. 296–306, 1997.
- LEE, S. E. et al. The phosphatidylinositol 3-Kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation. **Bone**, v. 30, n. 1, p. 71–77, 2002.
- LEE, Y.-H. et al. Differential Gene Expression of Periodontal Ligament Cells After Loading of Static Compressive Force. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 3, p. 446–452, 2007.
- LI, H. et al. Arctigenin promotes bone formation involving PI3K/Akt/PPAR γ signaling pathway. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 95, n. 4, p. 451–459, 2020.
- LI, Y. et al. Orthodontic tooth movement: The biology and clinical implications. **Kaohsiung Journal of Medical Sciences**, v. 34, n. 4, p. 207–214, 2018.
- LIMA, B. H. F. et al. Converging TLR9 and PI3K γ signaling induces sterile inflammation and organ damage. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2019.
- LIU, P. et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 8, p. 627–644, 2009.
- LIU, X. et al. Lifelong accumulation of bone in mice lacking Pten in osteoblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 7, p. 2259–2264, 2007.
- MACARI, S. et al. ST2 regulates bone loss in a site-dependent and estrogen-dependent manner. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 10, p. 8511–8521, 2018a.
- MACARI, S. et al. Lactation induces increases in the RANK/RANKL/OPG system in maxillary bone. **Bone**, v. 110, n. 2017, p. 160–169, 2018b.
- MAEDA, K. et al. The regulation of bone metabolism and disorders by wnt signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, 2019.
- MANNING, B. D.; TOKER, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network Brendan. **Cell**, v. 169, n. 3, p. 381–405, 2017.

- MARTINEZ-MARTÍ, A.; FELIP, E. PI3K pathway in NSCLC. **Frontiers in Oncology**, v. 1, n. JAN, p. 1–5, 2012.
- MCGONNELL, I. M. et al. A specific role for phosphoinositide 3-kinase and AKT in osteoblasts? **Frontiers in Endocrinology**, v. 3, n. JUL, p. 1–8, 2012.
- MEIER, B. et al. Human fibroblasts release reactive oxygen species in interleukin-1 or tumour necrosis factor alfa. v. 263, p. 539–545, 1989.
- MEIKLE, M. C. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 Years after Carl Sandstedt. **European Journal of Orthodontics**, v. 28, n. 3, p. 221–240, 2006.
- MUKHERJEE, A.; ROTWEIN, P. Akt promotes BMP2-mediated osteoblast differentiation and bone development. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. 5, p. 716–726, 2009.
- NANCI, A.; BOSSHARDT, D. D. Periodontal tissues in health and disease: Introduction. **Periodontology 2000**, v. 40, n. 1, p. 7–10, 2006.
- NOVACK, D. V.; FACCIO, R. Osteoclast motility: Putting the brakes on bone resorption. **Ageing Research Reviews**, v. 10, n. 1, p. 54–61, 2011.
- NOVACK, D. V.; TEITELBAUM, S. L. The osteoclast: Friend or foe? **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 3, p. 457–484, 2008.
- ODORIZZI, G.; BABST, M.; EMR, S. D. Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 5, p. 229–235, 2000.
- OKKENHAUG, K.; VANHAESEBROECK, B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 4, p. 317–330, 2003.
- OSY CZKA, A. M.; LEBOY, P. S. Bone morphogenetic protein regulation of early osteoblast genes in human marrow stromal cells is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. **Endocrinology**, v. 146, n. 8, p. 3428–3437, 2005.
- PATRUCCO, E. et al. PI3K γ modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. **Cell**, v. 118, n. 3, p. 375–387, 2004.
- PENG, X. DING et al. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. **Genes and Development**, v. 17, n. 11, p. 1352–1365, 2003.
- PEREIRA, L. J. et al. Aerobic and resistance training improve alveolar bone quality and interferes with bone-remodeling during orthodontic tooth movement in mice. **Bone**, v. 138, p. 115496, 2020.
- PILKINGTON, M. F.; SIMS, S. M.; DIXON, S. J. Wortmannin inhibits spreading and

- chemotaxis of rat osteoclasts in vitro. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 4, p. 688–694, 1998.
- RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25103–25108, 2010.
- RAMEH, L. E. et al. The Role of Phosphoinositide 3-Kinase Lipid Products in Cell Function *. p. 8347–8350, 1999.
- ROCHEFORT, G. Y.; PALLU, S.; BENHAMOU, C. L. Osteocyte: The unrecognized side of bone tissue. **Osteoporosis International**, v. 21, n. 9, p. 1457–1469, 2010.
- ROMMEL, C.; CAMPS, M.; JI, H. PI3K δ and PI3K γ : Partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 3, p. 191–201, 2007.
- RÜCKLE, T.; SCHWARZ, M. K.; ROMMEL, C. PI3K γ inhibition: Towards an “aspirin of the 21st century”? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 11, p. 903–918, 2006.
- RUTKOVSKIY, A.; STENSLØKKEN, K.-O.; VAAGE, I. J. Osteoblast Differentiation at a Glance. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 22, p. 95–106, 2016.
- SASAKI, T. Differentiation and functions of osteoclasts and odontoclasts in mineralized tissue resorption. **Microscopy Research and Technique**, v. 61, n. 6, p. 483–495, 2003.
- SHEPHERD, P. R.; WITHERS, D. J.; SIDDLE, K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. **Biochemical Journal**, v. 333, n. 3, p. 471–490, 1998.
- SHUGG, R. P. P. et al. Effects of isoform-selective phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors on osteoclasts: Actions on cytoskeletal organization, survival, and resorption. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 49, p. 35346–35357, 2013.
- SILVESTRINI, G. et al. Detection of osteoprotegerin (OPG) and its ligand (RANKL) mRNA and protein in femur and tibia of the rat. **Journal of Molecular Histology**, v. 36, n. 1–2, p. 59–67, 2005.
- SIMONET, W. S. et al. Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. **Cell**, v. 89, n. 2, p. 309–319, 1997.
- TADDEI, S. R. D. A. et al. Role of CCR2 in orthodontic tooth movement. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 141, n. 2, p. 153- 160.e1, 2012a.
- TADDEI, S. R. DE A. et al. Experimental model of tooth movement in mice: A standardized protocol for studying bone remodeling under compression and tensile strains. **Journal of Biomechanics**, v. 45, n. 16, p. 2729–2735, 2012b.
- TANAKA, S. et al. Macrophage Colony-stimulating Factor Is Indispensable for both Proliferation and Differentiation of Osteoclast Progenitors. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 257–263, 1993.

- TAVARES, L. D. et al. Phosphoinositide-3 kinase gamma regulates caspase-1 activation and leukocyte recruitment in acute murine gout. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 106, n. 3, p. 619–629, 2019.
- TEITELBAUM, S. L. Bone Resorption by Osteoclasts. **Science**, v. 289, p. 1504–1507, 2000.
- THORPE, L. M.; YUZUGULLU, H.; ZHAO, J. J. PI3K in cancer: Divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 1, p. 7–24, 2015.
- TRESGUERRES, F. G. F. et al. The osteocyte: A multifunctional cell within the bone. **Annals of Anatomy**, v. 227, p. 151422, 2020.
- ULICI, V. et al. The PI3K pathway regulates endochondral bone growth through control of hypertrophic chondrocyte differentiation. **BMC Developmental Biology**, v. 8, p. 1–15, 2008.
- VANHAESEBROECK, B. et al. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. v. 70, p. 535–602, 2001.
- VANHAESEBROECK, B.; WATERFIELD, M. D. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. **Experimental Cell Research**, v. 253, n. 1, p. 239–254, 1999.
- VIMALRAJ, S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. **Gene**, v. 754, p. 1–8, 2020.
- WANG, Y. et al. p75NTR^{-/-} mice exhibit an alveolar bone loss phenotype and inhibited PI3K/Akt/ β -catenin pathway. **Cell Proliferation**, v. 53, n. 4, p. 1–14, 2020.
- WANG, Z.; MCCAULEY, L. K. Osteoclasts and odontoclasts: Signaling pathways to development and disease. **Oral Diseases**, v. 17, n. 2, p. 129–142, 2011.
- WATABE, H. et al. Mechanotransduction activates $\alpha 5 \beta 1$ integrin and PI3K/Akt signaling pathways in mandibular osteoblasts. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 18, p. 2642–2649, 2011.
- WHITMAN, M. et al. **Type I PIPK generates PI(3)P** *Letters to Nature*, 1988.
- WU, B. H. et al. Stretch force guides finger-like pattern of bone formation in Suture. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–15, 2017.
- WYMANN, M. P.; PIROLA, L. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1436, n. 1–2, p. 127–150, 1998.
- XI, J. C. et al. The PI3K/AKT cell signaling pathway is involved in regulation of osteoporosis. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 35, n. 6, p. 640–645, 2015.
- XIE, Y. et al. PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 19, n. 2, p. 783–791, 2019.

- XIE, Z. et al. Interleukin-6/interleukin-6 receptor complex promotes osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2018.
- XING, J.; HUMPHREY, M. B. Lipid Kinases and Bone Homeostasis: Lessons Learned From Phosphoinositide 3-Kinase Isoform–Specific Knockouts. **Arthritis Rheumatol.**, v. 66, n. 8, p. 1984–1986, 2014.
- XU, Y. et al. Effect of orthodontic force on the expression of PI3K, Akt, and P70S6 K in the human periodontal ligament during orthodontic loading. **Cell Biochemistry and Function**, v. 35, n. 7, p. 372–377, 2017.
- YANG, A. et al. IL-8 Enhances Therapeutic Effects of BMSCs on Bone Regeneration via CXCR2-Mediated PI3k/Akt Signaling Pathway. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 361–370, 2018.
- YANO, S. et al. Functional expression of β -chemokine receptors in osteoblasts: Role of regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in osteoblasts and regulation of its secretion by osteoblasts and osteoclasts. **Endocrinology**, v. 146, n. 5, p. 2324–2335, 2005.
- YU, H. S. et al. Three-dimensional finite-element analysis of maxillary protraction with and without rapid palatal expansion. **European Journal of Orthodontics**, v. 29, n. 2, p. 118–125, 2007.

ANEXO



UFMG

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 302/2018
Título do projeto: Papel da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-quinase) na remodelação óssea maxilar: modelo experimental animal.
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Soraia Macari
Unidade: Faculdade de Odontologia
Departamento: Departamento de Odontopediatria e Ortodontia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado COM RECOMENDAÇÃO na reunião do dia 08/10/2018. Validade: 08/10/2018 à 07/10/2023 RECOMENDAÇÃO: A pesquisadora responsável respondeu à diligência feita pela CEUA. Porém, a dose de analgésico (buprenorfina 0,10 mg/Kg, sub-cutânea) indicada pela pesquisadora para redução da dor pós-operatória é menor do que a dose recomendada no Manual de Procedimentos da FIOCRUZ (http://www.castelo.fiocruz.br/vppli/comissoes_camaras-tecnicas/Manual_procedimentos.pdf), que é de 2,5 mg/Kg via sub-cutânea. Adicionalmente, a pesquisadora responsável se propõe a tratar os animais após a cirurgia e 24 horas após. Porém, segundo o mesmo manual indicado acima, a duração da analgesia promovida por esta dose é de 6-12 horas. Sendo assim, a CEUA recomenda que seja aumentada a dose do analgésico assim como seja diminuído o intervalo entre as administrações do fármaco.

Belo Horizonte, 08/10/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
 Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha
 Unidade Administrativa II - 2º Andar Sala 2005
 31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
 Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br