UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA
BUCO-MAXILO-FACIAL E PERIODONTIA

HELENA BACHA LOPES

Participação de integrinas na diferenciação osteoblástica induzida por superfícies de titânio com nano e microtopografia

Ribeirão Preto
2018

HELENA BACHA LOPES

Participação de integrinas na diferenciação osteoblástica induzida por superfícies de titânio com nano e microtopografia

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial
Orientador: Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti

Ribeirão Preto
2018

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

Catalogação na Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Lopes, Helena Bacha

Participação de Integrinas do Diferenciação Osteoblástica Induzida por Superfície de Titânio com Nano e Microtopografia. Ribeirão Preto, 2018.

114f. : il. ; 30cm

Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto / USP. Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia) Área de concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Beloti, Márcio Mateus

1. Integrina 2. Osteoblastos 3. Titânio 4. Nanotopografia 5. ShRNA 6. CRISPR/Cas9

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lopes, Helena Bacha. **Participação de Integrinas na Diferenciação Osteoblástica Induzida por Superfícies de Titânio com Nano e Microtopografia**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovada em ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Trabalho realizado nos Laboratórios de Cultura de Células e de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, e no Department of Biochemistry, University of Vermont, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) nas modalidades Auxílio Regular à Pesquisa (Processo nº 2013/05181-3), Bolsa de Doutorado (Processo nº 2014/08443-1) e Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (Processo nº 2016/21116-5).

*À minha **Família**,*

*Ao **Gileade**, com amor.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Professor Dr. Márcio Mateus Beloti**, cuja capacidade científica me proporcionou grandes oportunidades na pós-graduação. Obrigada por ter sido meu orientador, meu amigo e um exemplo. Te admiro muito.

Ao **Professor Dr. Adalberto Luiz Rosa** por toda sua sabedoria e ânimo em trabalhar com o que há de mais novo e desafiador na área de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial. É uma honra poder trabalhar com o senhor.

To all Stein/Lian Lab members, in especial to **Prof. Dr. Jane Lian** and **Prof. Dr. Janet Stein**, for all knowledge shared with me. I will always be thankful to you.

Aos Professores da FORP/USP, em especial aos do Departamento de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial, **Professor Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros**, **Professor Dr. Luiz Antonio Salata**, **Professor Dr. Cássio Edvard Sverzut**, **Professor Dr. Samuel Porfírio Xavier** e **Professor Dr. Alexandre Elias Trivellato**, que desde a minha graduação sempre olhei com admiração e respeito. Só tenho a agradecer por terem me despertado a paixão por essa área.

Ao **Professor Dr. Paulo Tambasco de Oliveira** que sempre esteve à disposição e nunca deixou de me responder às minhas perguntas.

Aos docentes e alunos colaboradores do Hemocentro de Ribeirão Preto, em especial ao **Professor Dr. Dimas Tadeu Covas**, à **Professora Dra. Virgínia Picanço e Castro** e à doutoranda **Daianne Maciely Carvalho** pelo auxílio e dedicação nos experimentos envolvendo shRNA.

À minha amiga **Professora Dra. Emanuela Prado Ferraz**, quem admiro muito e tenho como inspiração em minha vida acadêmica. Obrigada por me ajudar sempre.

Aos queridos funcionários da FORP/USP, em especial à **Isabel**, **Dulce**, **Imaculada**, **Daniela** e **Mary** que sempre me ajudaram no que podiam.

Aos técnicos do laboratório, que durante todos esses anos foram se tornando grandes amigos, em especial à **Fabíola**, **Adriana**, **Milla**, e ao **Roger**. Serei eternamente grata por toda ajuda e ensinamentos.

Aos amigos que a pós-graduação me deu, em especial ao **Alann**, **Rodrigo** e à **Paula**. Muito obrigado pela companhia e amizade dentro e fora do laboratório. Sei que serão meus amigos para a vida toda.

Às minhas amigas **Maria Paula**, **Débora**, **Brenda**, **Sibila**, e meu querido amigo Lourenço que, sem dúvida nenhuma, são pessoas que eu quero sempre ter por perto.

Aos **alunos** de iniciação científica que passaram pelo Laboratório de Cultura de Células. É sempre muito prazeroso tê-los trabalhando conosco.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo** pelo apoio financeiro fundamental para a execução desse projeto no Brasil e no exterior (Processo 2014/08443-1 e 2016/21116-5).

À **FORP/USP** por me proporcionar durante a graduação, mestrado e doutorado uma excelente infraestrutura física e intelectual. Tenho muito orgulho dessa Escola.

A toda minha **família**, em especial ao meu **pai**, por estar sempre muito presente nas minhas escolhas; à minha mãe por seu carinho e compreensão pela minha ausência durante todo esse período; às minhas irmãs por me apoiarem a vida inteira e à minha avó Lourdes por ser um exemplo na minha vida.

À família que a vida me deu, **Carol**, **Márcia** e **Marcos**, **Barbara**, **Guilherme** e **Roberta**. Obrigada por todo carinho e atenção comigo.

Aos meus sobrinhos **Iara** e **Vinícius** por deixarem o mundo mais bonito.

Ao **Gileade**, meu amor, por todo apoio na vida e em toda minha pós-graduação. É um privilégio muito grande compartilhar tudo isso com você.

"Não entendo. Isso é tão vasto que ultrapassa qualquer entender.
Entender é sempre limitado.
Mas não entender pode não ter fronteiras.
Sinto que sou muito mais completa quando não entendo.
Não entender, do modo como falo, é um dom.
Não entender, mas não como um simples de espírito.
O bom é ser inteligente e não entender.
É uma benção estranha,
como ter loucura sem ser doida.
É um desinteresse manso, é uma doçura de burrice.
Só que de vez em quando vem a inquietação:
quero entender um pouco. Não demais:
mas pelo menos entender
que não entendo"

Clarice Lispector

RESUMO

LOPES, HB. **Participação de Integrinas na Diferenciação Osteoblástica Induzida por Superfícies de Titânio com Nano e Microtopografia.** Tese (Doutorado). Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2018. 114f.

As integrinas constituem uma família de receptores de membrana que tem como função primária a adesão de células a proteínas da matriz extracelular e alguns de seus membros estão envolvidos nos processos de diferenciação osteoblástica e formação óssea, eventos diretamente relacionados à osseointegração de implantes de titânio (Ti). Sabe-se que superfícies de Ti com nano e microtopografia podem favorecer a diferenciação osteoblástica e a mineralização da matriz extracelular. No entanto, os mecanismos celulares envolvidos nesses processos não são completamente entendidos. Neste contexto, os objetivos deste estudo foram: (1) caracterizar as superfícies de Ti com nano (Ti-Nano) e microtopografia (Ti-Micro), (2) investigar a participação da integrina αV na diferenciação osteoblástica induzida pelo Ti-Nano e (3) investigar a participação da integrina β3 na diferenciação osteoblástica induzida por Ti-Nano e Ti-Micro. Para isso, discos de Ti-Nano e Ti-Micro foram preparados por ataque ácido com H_2SO_4/H_2O_2 ou com $HNO_3/H_2SO_4/HCl$, respectivamente, e caracterizados quanto à topografia, rugosidade e composição química de superfície. Discos de Ti usinados foram usados com controle (Ti-Controle) em alguns experimentos. Células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de ratos foram cultivadas sobre as três superfícies de Ti e foi avaliada a expressão gênica de componentes envolvidos na via de sinalização das integrinas por PCR array. Com base nos resultados do PCR array, as integrinas αV e β3 foram selecionadas e silenciadas por RNA de interferência (shRNA) ou CRISPR/Cas9, respectivamente, em células pré-osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1 para investigarmos a participação dessas integrinas na diferenciação osteoblástica induzida por superfícies de Ti com diferentes topografias. Os resultados deste estudo mostraram que os tratamentos empregados foram eficientes para a produção de superfícies de Ti com topografias nas escalas nano e micrométrica. Além disso, foi demonstrado que o maior potencial osteogênico do Ti-Nano se deve, ao menos em parte, à integrina αV, uma vez que seu silenciamento reduziu a diferenciação osteoblástica induzida pela nanotopografia. Por fim, também demonstramos que a via de sinalização ativada pela integrina β3 exerce um papel fundamental no potencial osteogênico do Ti-Nano, mas não do Ti-Micro. O silenciamento da integrina β3 reduziu a diferenciação osteoblástica, concomitantemente com a regulação negativa da expressão de vários componentes das vias de sinalização de Wnt e de BMP, apenas nas células crescidas sobre a nanotopografia. Em conjunto, nossos resultados revelam um novo mecanismo para explicar a maior diferenciação osteoblástica induzida pelo Ti-Nano, que envolve uma complexa rede regulatória

ativada pela maior expressão das integrinas αV e β3, esta última gerando ativação da transdução de sinal das vias de Wnt e de BMP.

Palavras-chave: Integrina, Osteoblasto, Titânio, Nanotopografia, ShRNA, CRISPR/Cas9.

ABSTRACT

LOPES, HB. **Role of Integrins on the Osteoblast Differentiation Induced by Titanium Surfaces with Nano and Microtopography.** Thesis (P.h.D,s Degree). Ribeirão Preto: School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2018. 114f.

Integrins are a family of membrane receptors that primarily mediate cell adhesion to extracellular matrix proteins and some members are involved in the process of osteoblast differentiation and bone formation, key events of titanium (Ti) implant osseointegration. It is well known that Ti surfaces with nano and microtopography may favor osteoblast differentiation and matrix mineralization. However, the cellular mechanisms involved in this process are not entirely understood. In this context, the aims of this study were: (1) to characterize the Ti surfaces with nano (Ti-Nano) and microtopography (Ti-Micro), (2) to investigate the participation of integrin αV on osteoblast differentiation induced by Ti-Nano and (3) to investigate the participation of integrin β3 on osteoblast differentiation induced by Ti-Nano and Ti-Micro. Discs of Ti-Nano and Ti-Micro were prepared with acid etching with H_2SO_4/H_2O_2 or with $HNO_3/H_2SO_4/HCl$, respectively, and characterized in terms of surface topography, roughness and chemical composition. Machined Ti discs (untreated) were used as control (Ti-Control) in some experiments. Mesenchymal stem cells from rat bone marrow were cultured on Ti discs with the three different surfaces and the gene expression of members of the integrin signaling pathway was evaluated by PCR array. Based on PCR array results, the integrins αV and β3 were selected and silenced using RNA interference (shRNA) or CRISPR-Cas9, respectively, in pre-osteoblastic cell line MC3T3-E1 to investigate the participation of these integrins in osteoblast differentiation induced by Ti with different surface topographies. The results showed that the treatments used were efficient to generate Ti surfaces with topographies at the nano and micrometric scales. We showed that the higher osteogenic potential of Ti-Nano may be, at least in part, due to the integrin αV, since its silencing reduced the osteoblast differentiation induced by nanotopography. We also demonstrated that the signaling pathway triggered by integrin β3 plays a key role in the osteogenic potential of Ti-Nano, but not of Ti-Micro. The silencing of integrin β3 reduced the osteoblast differentiation concomitantly with the negative regulation of the gene expression of several Wnt and BMP signaling components only in cells grown on Ti-Nano. Taken together, our results uncover a novel mechanism to explain the higher osteoblast differentiation induced by Ti-Nano that

involves a complex regulatory network triggered by integrins αV and β3 upregulation, with the integrin β3 activating the Wnt and BMP signal transductions.

Keywords: Integrin, Osteoblast, Titanium, Nanotopography, ShRNA, CRISPR/Cas9.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Expressão dos genes relacionados à via de sinalização das integrinas regulados positivamente (≥1,9-vezes, p≤0,05) em células-tronco mesenquimais crescidas sobre Ti-Nano e Ti-Controle aos 3 dias..... **62**

Tabela 2. Expressão dos genes relacionados à via de sinalização das integrinas regulados positivamente (≥1,9-vezes, p≤0,05) em células-tronco mesenquimais crescidas sobre Ti-Nano e Ti-Micro aos 3 dias..... **78**

Tabela Suplementar. Expressão dos genes relacionados à via de sinalização das integrinas regulados positivamente (≥1,9-vezes, p≤0,05) em células-tronco mesenquimais crescidas sobre Ti-Controle, Ti-Nano e Ti-Micro aos 3, 5 e 7 dias..... **109**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Caracterização das superfícies de titânio. Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução da superfície de titânio com nanotopografia (A, B e C), com microtopografia (D, E e F) e usinada (G, H e I). Escala: barra em A, D e G=20 µm, em B, E e H=500 nm e em C, F e I=200 nm..... **47**

Figura 2. Caracterização das superfícies de titânio. Reconstrução tridimensional da interferometria óptica da superfície de titânio com nanotopografia (Ti-Nano, A), com microtopografia (Ti-Micro, C) e usinada (Ti-Controle, E). Parâmetros de rugosidade avaliados foram rugosidade média (B), altura média dos picos (D) e profundidade média dos vales (F). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=15) e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes (p≤0,05)... **48**

Figura 3. Caracterização das superfícies de titânio. Composição química da superfície de titânio com nanotopografia (A), com microtopografia (B) e usinada (C)..... **49**

Figura 4. Efeito da superfície sobre a expressão gênica e proteica de marcadores osteoblásticos em células crescidas sobre superfície de titânio com nanotopografia (Ti-Nano) e usinada (Ti-Controle). Expressão gênica de fator de transcrição relacionado ao runt (*Runx2*, A), osterix (*Sp7*, B), fosfatase alcalina (*Alp*, C), osteocalcina (*Oc*, D), sialoproteína óssea (*Bsp*, E) e osteopontina (*Opn*, F), e expressão proteica de RUNX2 (G e H) aos 3 e 5 dias em células-tronco mesenquimais. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes entre Ti-Nano e Ti-Controle dentro do mesmo tempo experimental (p≤0,05)..... **61**

Figura 5. Efeito da superfície sobre a expressão proteica de integrina αV (ITGAV) em células crescidas sobre o titânio com nanotopografia (Ti-Nano) e usinado (Ti-Controle) aos 5 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) e o asterisco indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05)..... **63**

Figura 6. Eficiência do silenciamento da integrina αV com shRNA. Expressão gênica (A) e proteica (B) de integrina αV aos 7 dias após seleção de células scramble MC3T3-E1 (shpLKO.1) e shITGAV-MC3T3-E1 (shITGAV). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes (p≤0,05)..... **63**

Figura 7. Efeito do silenciamento da integrina αV sobre a expressão gênica e proteica de marcadores osteoblásticos em células crescidas sobre superfície de titânio com nanotopografia (Ti-Nano). Expressão gênica de fator de transcrição relacionado ao runt (*Runx2*, A), osterix (*Sp7*, B), fosfatase alcalina (*Alp*, C), osteocalcina (*Oc*, D), sialoproteína óssea (*Bsp*, E), e osteopontina (*Opn*, F) e expressão proteica de RUNX2 (G e H) aos 5 dias em células scramble MC3T3-E1 (shpLKO.1) e shITGAV-MC3T3-E1 (shITGAV). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes (p≤0,05)..... **65**

Figura 8. Representação esquemática da participação da integrina αV (ITGAV) na diferenciação osteoblástica induzida pelo titânio com nanotopografia (Ti-Nano)..... **68**

Figura 9. Células da linhagem MC3T3-E1, subclone 14, expressando constitutivamente a dCas9-KRAB (KRAB). DNA genômico (A) e expressão proteica (B) da dCas9 em células KRAB-MC3T3-E1 e MC3T3-E1..... **79**

Figura 10. Eficiência do silenciamento da integrina β3 com CRISPR/Cas9. Expressão gênica (A) e proteica (B) de integrina β3 aos 3 dias após seleção de células gITGB3-MC3T3-E1 (gITGB3) e KRAB-MC3T3-E1 (KRAB). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes (p≤0,05)..... **79**

Figura 11. Efeito do silenciamento da integrina β3 sobre a expressão gênica de marcadores osteoblásticos em células crescidas sobre superfícies de titânio com nanotopografia (Ti-Nano). Expressão gênica de fator de transcrição relacionado ao runt (*Runx2*, A), osterix (*Sp7*, B), fosfatase alcalina (*Alp*, C), osteocalcina (*Oc*, D), sialoproteina óssea (*Bsp*, E) e osteopontina (*Opn*, F) aos 7 dias em células gITGB3-MC3T3-E1 (gITGB3) e KRAB-MC3T3-E1 (KRAB). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes (p≤0,05)..... **80**

Figura 12. Efeito do silenciamento da integrina β3 sobre marcadores do fenótipo osteoblástico em células crescidas sobre superfícies de titânio com nanotopografia (Ti-Nano). Expressão proteica do fator de transcrição relacionado ao runt 2 (RUNX2) aos 7 dias (A) e atividade de fosfatase alcalina (ALP) *in situ* aos 10 dias (B) em células gITGB3-MC3T3-E1 (gITGB3) e KRAB-MC3T3-E1 (KRAB). Os dados da expressão proteica de RUNX2 (n=3) e da atividade de ALP (n=18) são apresentados como média ± desvio padrão e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes (p≤0,05)..... **81**

Figura 13. Efeito do silenciamento da integrina β3 sobre a expressão gênica de marcadores osteoblásticos em células crescidas sobre superfícies de titânio com microtopografia (Ti-Micro). Expressão gênica de fator de transcrição relacionado ao runt (*Runx2*, A), osterix (*Sp7*, B), fosfatase alcalina (*Alp*, C), osteocalcina (*Oc*, D), sialoproteina óssea (*Bsp*, E) e osteopontina (*Opn*, F) aos 7 dias em células gITGB3-MC3T3-E1 (gITGB3) e KRAB-MC3T3-E1 (KRAB). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes (p≤0,05)..... **82**

Figura 14. Efeito do silenciamento da integrina β3 sobre marcadores do fenótipo osteoblástico em células crescidas sobre superfícies de titânio com microtopografia (Ti-Micro). Expressão proteica do fator de transcrição relacionado ao runt 2 (RUNX2) aos 7 dias (A) e atividade de fosfatase alcalina (ALP) *in situ* aos 10 dias (B) em células gITGB3-MC3T3-E1 (gITGB3) e KRAB-MC3T3-E1 (KRAB). Os dados da expressão proteica de RUNX2 (n=3) e da atividade de ALP (n=18) são apresentados como média ± desvio padrão e o asterisco indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05)..... **83**

Figura 15. Efeito do silenciamento da integrina β3 sobre a expressão gênica da integrina αV em células crescidas sobre superfícies de titânio com nanotopografia (Ti-Nano) ou microtopografia (Ti-Micro). Expressão gênica de integrina β3 (*Itgb3,* A e C) e integrina αV (*Itgav*, B e D) em células gITGB3-MC3T3-E1 (gITGB3) e KRAB-MC3T3-E1 (KRAB) aos 7 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes (p≤0,05)..... **84**

Figura 16. Efeito do silenciamento da integrina β3 sobre a expressão gênica de componentes das vias de sinalizações de Wnt e de BMP em células crescidas sobre superfícies de titânio com nanotopografia (Ti-Nano) ou microtopografia (Ti-Micro). Expressão gênica de polipose adenomatousa coli (*Apc*), *Axin1*, *β-Catenina*, *Cke1*, Frizzled 5 (*Fzd5*), glicogênio sintase quinase 3β (*Gsk3b*) e proteína fosfatase 2A (*Pp2a*) (A,C) e da quinase tipo receptor da ativina 2 (*Alk2*), receptor da proteína óssea morfogenética tipo 1A (*Bmpr1a*), receptor da proteína óssea morfogenética tipo 2A (*Bmpr2a*), *Smad1* e *Smad4* (B,D) aos 7 dias em células gITGB3-MC3T3-E1 (gITGB3) e KRAB-MC3T3-E1 (KRAB). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes (p≤0,05)..... **85**

Figura 17. Representação esquemática da participação da integrina β3 (ITGB3) na diferenciação osteoblástica induzida pelo titânio com nanotopografia (Ti-Nano, A) e pelo titânio com microtopografia (Ti-Micro, B)..... **89**

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO..... **31**

OBJETIVOS..... **39**

CAPÍTULO 1. CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES DE TITÂNIO (Ti)

1.1 OBJETIVO……..... **45**

1.2 MATERIAIS E MÉTODOS..... **45**

1.2.1 Amostras de Ti..... **45**

1.2.2 Caracterização das superfícies de Ti..... **45**

1.2.3 Análise estatística..... **46**

1.3 RESULTADOS..... **46**

1.3.1 Caracterização das superfícies de Ti..... **46**

1.3.1.1 Microscopia eletrônica de varredura..... **46**

1.3.1.2 Interferometria óptica..... **47**

1.3.1.3 Composição química das superfícies..... **48**

1.4 DISCUSSÃO..... **49**

CAPÍTULO 2. EFEITO DO SILENCIAMENTO DA INTEGRINA αV SOBRE A DIFERENCIAÇÃO OSTEOBLÁSTICA INDUZIDA PELA SUPERFÍCIE DE Ti COM NANOTOPOGRAFIA

2.1 OBJETIVO..... **53**

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS..... **53**

2.2.1 Amostras de Ti..... **53**

2.2.2 Obtenção e cultura de células..... **53**

2.2.3 Análise da expressão gênica de marcadores ósseos por PCR em tempo real…..…….....…….... **53**

2.2.4 Análise da expressão da proteína RUNX2 por Western blot…..... **55**

2.2.5 Expressão de genes relacionados à via de sinalização das integrinas……..... **56**

2.2.6 Análise da expressão da proteína integrina αV por Western blot..... **56**

2.2.7 Silenciamento da integrina αV por shRNA..... **57**

2.2.7.1 Transformação (replicação) e purificação dos shRNA…….....… **57**

2.2.7.2 Produção lentiviral..... **58**

2.2.7.3 Silenciamento da integrina αV em células pré-osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1……..... **58**

2.2.7.4 Efeito do silenciamento da integrina αV sobre a diferenciação osteoblástica induzida pela superfície de Ti com nanotopografia..... **59**
2.2.8 Análise estatística…….....……....……. **60**
2.3 RESULTADOS..... **60**
2.3.1 Análise da expressão gênica e proteica de marcadores ósseos por PCR em tempo real e Western blot……..... **60**
2.3.2 Análise da expressão de genes e proteína relacionados à via de sinalização das integrinas por PCR array e Western blot..... **62**
2.3.3 Silenciamento da integrina αV em células pré-osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1..... **63**
2.3.4 Efeito do silenciamento da integrina αV sobre a diferenciação osteoblástica induzida pela superfície de Ti com nanotopografia..... **64**
2.4 DISCUSSÃO..... **66**

CAPÍTULO 3. EFEITO DO SILENCIAMENTO DA INTEGRINA β3 SOBRE A DIFERENCIAÇÃO OSTEOBLÁSTICA INDUZIDA PELAS SUPERFÍCIES DE Ti COM NANO E MICROTOPOGRAFIA

3.1 OBJETIVO..... **71**
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS..... **71**
3.2.1 Amostras de Ti..... **71**
3.2.2 Obtenção e cultura de células..... **71**
3.2.3 Expressão dos genes relacionados à via de sinalização das integrinas..... **71**
3.2.4 Construção do CRISPR/Cas9..... **72**
3.2.4.1 Células MC3T3-E1 expressando constitutivamente a dCas9 KRAB (KRAB) **72**
3.2.4.2 Análise do DNA genômico por PCR qualitativo..... **72**
3.2.4.3 Análise da expressão da proteína Cas9 por Western blot..... **73**
3.2.4.4 Desenho do RNA guia..... **74**
3.2.4.5 Transdução das células KRAB-MC3T3-E1 com partículas lentivirais contendo o RNA guia para a integrina β3 (gITGB3)..... **74**
3.2.4.6 Análise da expressão genica de integrina β3 por PCR em tempo real..... **75**
3.2.5 Efeito do silenciamento da integrina β3 sobre a diferenciação osteoblástica induzida pela superfície de Ti com nanotopografia e microtopografia..... **75**

3.2.5.1 Análise da atividade de fosfatase alcalina in situ por Fast red..... **76**

3.2.6 Efeito do silenciamento da integrina β3 na expressão gênica de integrina αV de osteoblastos crescidos sobre o Ti com nano e microtopografia..... **76**

3.2.7 Efeito do silenciamento da integrina β3 na expressão gênica de componentes das vias de sinalização de Wnt e de BMP de osteoblastos crescidos sobre o Ti com nano e microtopografia..... **77**

3.2.8 Análise estatística..... **77**

3.3 RESULTADOS..... **77**

3.3.1 Expressão de genes relacionados à via de sinalização das integrinas..... **77**

3.3.2 Eficiência do CRISPR/Cas9..... **78**

3.3.3 Efeito do silenciamento da integrina β3 sobre a diferenciação osteoblástica induzida pela superfície de Ti com nanotopografia e microtopografia..... **80**

3.3.4 Efeito do silenciamento da integrina β3 na expressão gênica de integrina αV de osteoblastos crescidos sobre o Ti com nano e microtopografia..... **83**

3.3.5 Efeito do silenciamento da integrina β3 na expressão gênica dos componentes da via de sinalização Wnt e BMP de osteoblastos crescidos sobre o Ti com nano e microtopografia..... **84**

3.4 DISCUSSÃO..... **86**

CONCLUSÕES..... **91**

REFERÊNCIAS……..... **95**

ANEXOS..... **107**

Introdução

INTRODUÇÃO

O titânio (Ti) é o biomaterial mais frequentemente usado para a fabricação de implantes dentários e ortopédicos por apresentar excelentes propriedades mecânicas e biológicas. Sabe-se que a proporção de contato direto entre osso e Ti é influenciada por parâmetros clínicos, como condições do leito hospedeiro, pela técnica cirúrgica e pela utilização de carga, além de características do implante, como a topografia e a composição química de superfície (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 1991). A biocompatibilidade do Ti está fortemente associada às respostas de osteoblastos à superfície do biomaterial; no entanto, os mecanismos celulares envolvidos nessas respostas ainda não são completamente entendidos (BRAMA et al., 2007; SARANYA et al., 2011; SVERZUT et al., 2012; BELOTI et al., 2012; FERRAZ et al., 2014).

Diversos estudos moleculares e genéticos vêm sendo realizados com o objetivo de descobrir as vias regulatórias envolvidas na diferenciação osteoblástica (ROSEN, 2009; KOMORI, 2010; CHEN et al., 2013; HE et al., 2013; MEYER et al., 2016). Fatores de transcrição, moléculas sinalizadoras e modificadores de estrutura de cromatina exercem papel fundamental nos mecanismos celulares durante a osteogênese (LIAN et al., 2006; JENSEN et al., 2007; STEIN et al., 2009). As integrinas são proteínas transmembrana heterodiméricas constituídas por duas subunidades, α e β, identificadas e descritas primeiramente por Hynes (1987). Estas proteínas constituem uma família de receptores de membrana que têm como função primária a adesão de células a proteínas da matriz extracelular, como o colágeno e a fibronectina, e alguns de seus membros estão envolvidos no processo de diferenciação osteoblástica (MIZUNO et al., 2000; SCHNEIDER et al., 2011; ROSA et al., 2014; LAU, 2016; THEOCHARIS et al., 2016; BRUNNER et al., 2018).

Atualmente, são conhecidas dezoito subunidades α e oito subunidades β, as quais se associam por ligação não covalente para formar vinte e quatro combinações distintas entre as subunidades α e β, cada uma com características específicas com relação aos ligantes aos quais se associam (SHEKARAN; GARCÍA, 2011). O comprimento da subunidade α é de 1008-1152 aminoácidos, com uma região citoplasmática de 22-32 aminoácidos e uma porção transmembrana de 20-29 aminoácidos. A subunidade β possui aproximadamente 700 aminoácidos, com uma

região citoplasmática de 20-50 aminoácidos e uma porção transmembrana de 26-29 aminoácidos (SIEBERS et al., 2005). Desta forma, as integrinas são capazes de sinalizar em ambas as direções da membrana celular, ou seja, tanto para o interior quanto para o exterior da célula, e a ligação de componentes da matriz extracelular às integrinas desencadeia uma cascata de sinalização intracelular, modulando assim o comportamento da célula (GIANCOTTI; RUOSLAHTI, 1999; THEOCHARIS et al., 2016).

Os efeitos das integrinas nas células osteoblásticas são amplamente abordados na literatura. Foi mostrado que o bloqueio da subunidade β1 da integrina inibe a mineralização da matriz extracelular em culturas de células-tronco mesenquimais (MSCs, do inglês mesenchymal stem cells) derivadas de medula óssea de humanos (GRONTHOS et al., 2001). Camundongos transgênicos que exibem uma forma truncada da subunidade β1 da integrina em osteoblastos e osteócitos apresentam massa óssea reduzida e aumento da porosidade óssea (ZIMMERMAN et al., 2000). A adesão de células de camundongo da linhagem MC3T3-E1 ao colágeno do tipo I, mediada pela integrina α2β1, ativa o fator de transcrição relacionado ao runt 2 (*Runx2*), essencial para a diferenciação osteoblástica (XIAO et al., 1998). A expressão de *Runx2* é também modulada pela quinase de adesão focal (*Fak*), que participa da via de sinalização das integrinas, em osteoblastos de ratos da linhagem UMR-106 (SCHNEIDER et al., 2011). Além disso, camundongos deficientes para a integrina α1β1 apresentam calo ósseo reduzido durante o processo de reparo de fraturas (EKHOLM et al., 2002). Com base nesses resultados, o desenvolvimento de biomateriais que possam modular a interação entre integrinas e a matriz extracelular representa uma estratégia importante para terapias relacionadas ao tecido ósseo nas áreas odontológica e médica.

Atualmente, sabe-se que Ti com topografia nas escalas nano e micrométrica, favorecem proliferação celular e mineralização da matriz extracelular, e estimulam a formação óssea em contato com o implante (ROSEI, 2004; ZINGER et al., 2004; TAN; SALTZMAN, 2004; WIELAND et al., 2005; BERGLUNDH et al., 2007; MEIRELLES et al., 2008; WANG et al., 2016). A microtopografia tem sido relacionada a um aumento da expressão gênica de marcadores da diferenciação osteoblástica e formação de matriz mineralizada em osteoblastos e pré-osteoblastos cultivados sobre tal superfície (Schneider et al., 2003; Schneider et al., 2004). Além disso, foi demonstrado que superfícies de Ti com microtopografia favorecem a

diferenciação de células de linhagem de osteoblastos humanos (MG63), através de sinalizações celulares envolvendo o complexo de integrinas $\alpha 2\beta 1$, além de aumentar a expressão de integrinas $\beta 1$ e $\beta 3$ em MG63 cultivadas sobre superfície com micro- e submicrotopografia (OLIVARES-NAVARRETE et al., 2008; WANG et al., 2013).

Nosso grupo de pesquisa vem estudando uma superfície de Ti com nanotopografia obtida por um método de desoxidação e reoxidação, por meio de condicionamento químico com solução de H_2SO_4/H_2O_2 (NANCI et al., 1998; WAZEN et al., 2013). Inicialmente, foi demonstrado em experimentos *in vitro* que essa superfície estimula a produção de osteopontina (*Opn*) e sialproteína óssea (*Bsp*), duas proteínas envolvidas no fenômeno da osteogênese (DE OLIVEIRA e NANCI, 2004) e que o evento final da osteogênese, a formação de matriz mineralizada, também é estimulado em culturas de células osteoblásticas crescidas sobre essa superfície (DE OLIVEIRA et al., 2007). Tais achados chamaram atenção para o uso dessa superfície como um substrato para a pesquisa de vias de sinalização envolvidas na diferenciação osteoblástica de células crescidas sobre Ti (STEVENS; GEORGE, 2005; LORD et al., 2010; VARIOLA et al., 2011; WANG et al., 2013). Assim, nos últimos anos, estudos realizados por nosso grupo mostraram que a nanotopografia estimula a diferenciação osteoblástica de MSCs humanas através da regulação negativa de micro-RNAs (miR-4448, -4708 e -4773), atenuando a degradação de *Smad1*/*Smad4* e assim intensificando a transdução do sinal da proteína óssea morfogenética 2 (*Bmp2*) (KATO et al., 2014). Mostramos também que a superfície de Ti com nanotopografia regula positivamente a produção endógena de *Bmp2* e modula a via de sinalização da BMP (CASTRO-RAUCCI et al., 2016). Adicionalmente, foi demonstrado que células crescidas sobre a Ti com superfície nanotopográfica mostraram ser mais responsivas à proteína óssea morfogenética 9 (*Bmp9*) quando comparadas às células crescidas sobre Ti com superfície usinada (SOUZA et al., 2018).

Considerando que as integrinas regulam a adesão celular e podem contribuir para o processo de diferenciação e formação da matriz mineralizada e, consequentemente, para o processo de formação óssea, é plausível a elaboração da hipótese de que micro e/ou nanotopografia induz(em) a diferenciação osteoblástica por meio da via de sinalização das integrinas (OLIVARES-NAVARRETE et al., 2008; LU et al., 2010; WANG et al., 2013; ROSA et al., 2014; FELGUEIRAS et al., 2015; LEE et al., 2017; BRUNNER et al., 2018). De fato, já

demonstramos o papel relevante do complexo de integrinas $\alpha 1\beta 1$ no potencial osteogênico da nanotopografia e acreditamos que outras integrinas possam estar envolvidas nesse processo (ROSA et al., 2014).

Para testar nossa hipótese, utilizamos técnicas e ferramentas que permitem a manipulação genética de células e organismos. Dentre essas ferramentas, o RNA de interferência (RNAi), como por exemplo, shRNA (do inglês short hairpin RNA) e siRNA (do inglês small interfering RNA), são capazes de inibir a expressão gênica de forma rápida, fácil e com baixo custo (PEREIRA et al., 2016). O RNAi é uma ferramenta que permite o silenciamento gênico pós-transcricional temporário, regulando assim a abundância de transcrito alvo sem afetar a sequência nucleotídica do gene correspondente. No entanto, o uso da técnica de RNAi também possui algumas desvantagens que foram sendo evidenciadas ao longo do tempo, como por exemplo o fato de que o silenciamento gênico frequentemente não ser total (KRUEGER et al., 2007).

Nesse cenário, a técnica CRISPR (do inglês Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) associado a enzima Cas9, representa uma ferramenta revolucionária para a edição gênica por ser uma técnica fácil e com ampla aplicabilidade. O CRISPR/Cas9 foi descoberto em bactérias, nas quais age como uma maquinaria imune contra vírus e DNA plasmidial e pode ser empregado para edições gênicas precisas com menor ou ausência de efeitos *off-targets (*LEDFORD, 2016; KLEINSTIVER et al., 2016). Sua composição é baseada em dois elementos centrais, um RNA guia (gRNA), que serve para guiar uma nuclease ao gene alvo, e uma endonuclease que pode ser ativa (Cas9) para cortar a dupla fita do DNA (REDMAN et al., 2016; XIAO-JIE et al., 2015) ou deficiente (dCas9), que é fusionada a outras proteínas para reprimir ou ativar a transcrição de genes próximos da orientação do gRNA. A dCas9 pode ser fusionada a domínios proteicos modificadores do epigenoma que modula de forma precisa a expressão gênica (THAKORE et al., 2015). A fusão do domínio KRAB (do inglês Krüppel-associated box) à dCas9 e ao gRNA promove uma repressão gênica altamente específica pelo recrutamento de H3K9me3, que resultará em modificação da cromatina (LARSON et al., 2013). Assim, o sistema CRISPR/Cas9 é a técnica disponível mais eficiente e rápida para a modificação do genoma em vários organismos (LEDFORD, 2016).

Neste estudo, utilizamos a duas ferramentas descritas acima, shRNA e CRISP-Cas9, para investigar a participação de integrinas no potencial osteogênico

de superfícies de Ti com diferentes topografias. Acreditamos que o entendimento dos mecanismos celulares que regem a interação entre osteoblastos e Ti é fundamental para o desenvolvimento de novos biomateriais nas áreas médica e odontológica.

Objetivos

OBJETIVOS

Objetivo geral

Investigar o a participação de integrinas na diferenciação osteoblástica induzida por superfícies de Ti com nano e microtopografia.

Objetivos específicos

- Caracterizar as superfícies de Ti com nano e microtopografia.
- Investigar a participação da integrina αV na diferenciação osteoblástica induzida pela superfície de Ti com nanotopografia.
- Investigar o a participação da integrina β3 na diferenciação osteoblástica induzida por superfícies de Ti com nano e microtopografia.

Os três capítulos seguintes abordarão cada um dos objetivos específicos aqui apresentados.

Capítulo 1

CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO DAS SUPERFÍCIES DE TITÂNIO (TI)

1.1 OBJETIVO

Caracterizar as superfícies de Ti com nano e microtopografia.

1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

1.2.1 Amostras de Ti

Um total de 1050 discos usinados de Ti comercialmente puro, grau 2, de 13 mm de diâmetro e 2 mm de altura (Realum, São Paulo, SP, Brasil) foram lixados, lavados com tolueno em ultrassom e divididos em três grupos (350 discos por grupo). A superfície de Ti com nanotopografia (Ti-Nano) foi obtida por tratamento com solução de H_2SO_4 a 10 N e H_2O_2 a 30% por 4 horas (DE OLIVEIRA et al., 2007; RICHERT et al., 2008; VARIOLA et al., 2008) à temperatura ambiente, sob agitação constante. A superfície de Ti com microtopografia (Ti-Micro) foi obtida por duplo ataque ácido com HNO_3, H_2SO_4, e HCl, como o realizado em implantes dentários osseointegráveis comercialmente disponíveis (ELIAS et al., 2012). O protocolo de tratamento não é aqui descrito por se tratar de segredo industrial. Discos lixados não submetidos a tratamento posterior foram utilizados como controle (Ti-Controle) em parte dos experimentos. Todos os discos foram lavados em água destilada, autoclavados e secos ao ar.

1.2.2 Caracterização das superfícies de Ti

Discos de Ti dos três grupos foram examinados em microscópio eletrônico de varredura Inspect S50 (FEI Company, Hillsboro, OR, EUA) para avaliação da topografia e composição de superfície, e em interferômetro óptico (Zygo 7100, Devon-Berwyn, PA, EUA) para avaliação da rugosidade.

1.2.3 Análise estatística

Os dados numéricos foram obtidos em três campos escolhidos de forma randomizada em cinco discos de cada grupo (n=15) e submetidos ao teste de ANOVA One-Way, seguido do pós-teste de Tukey quando necessário. Foi utilizado o programa SigmaPlot (Systat Software, San Jose, CA, EUA). O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Caracterização das superfícies de Ti

1.3.1.1 Microscopia eletrônica de varredura

O Ti-Nano, quando analisado em aumentos menores, apresentou superfície regular similar ao Ti-Controle (Figura 1A) e, em aumentos maiores, mostrou numerosas concavidades e ondulações formando poros em sua superfície na escala nanométrica (Figura 1B e C). O Ti-Micro, quando analisado em aumentos menores, apresentou uma superfície homogênea (Figura 1D) e, em aumentos maiores, mostrou uma superfície caracterizada por uma rede de poros na escala micrométrica (Figura 1E e F). O Ti-Controle, quando analisado em aumentos menores, apresentou superfície regular com ranhuras em várias direções (Figura 1G) e, em aumentos maiores foram observados pequenos sulcos resultantes do processo de torneamento (Figura 1H e I).

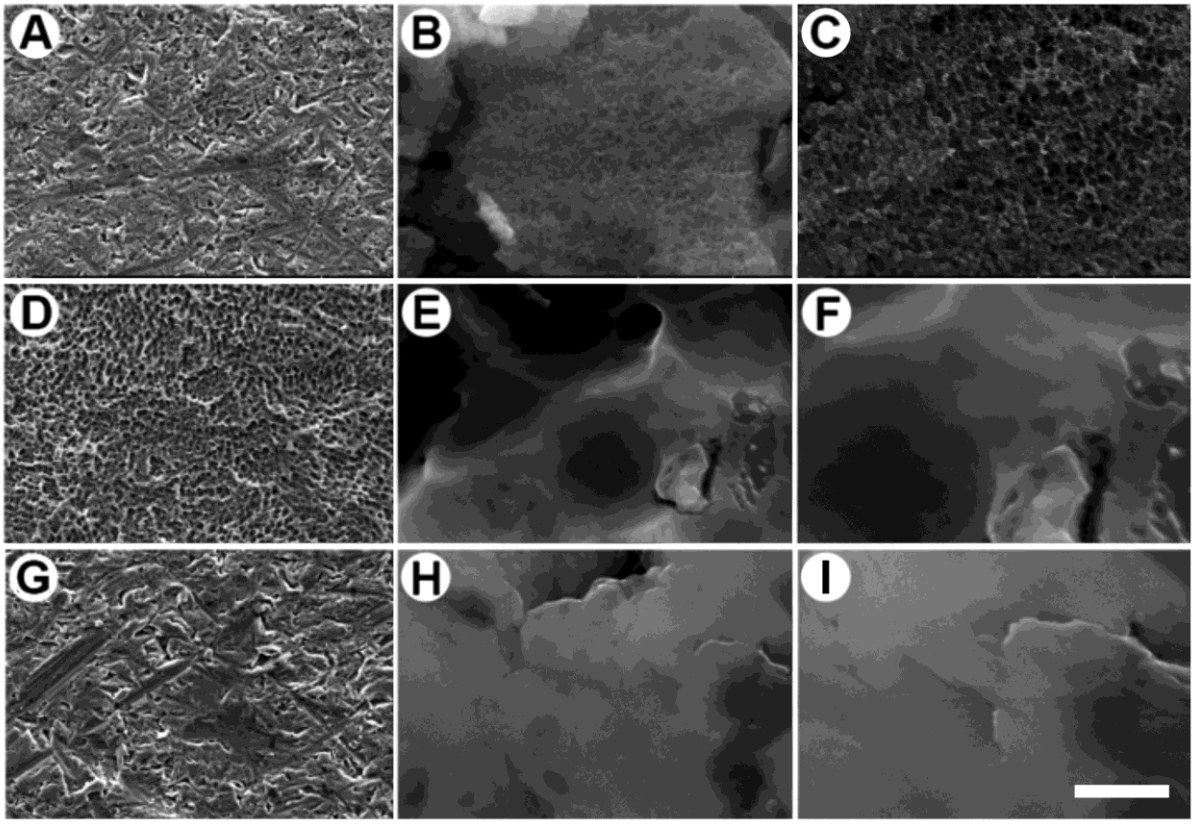

Figura 1. Caracterização das superfícies de titânio. Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução da superfície de titânio com nanotopografia (A, B e C), com microtopografia (D, E e F) e usinada (G, H e I). Escala: barra em A, D e G=20 µm, em B, E e H=500 nm e em C, F e I=200 nm.

1.3.1.2 Interferometria óptica

Foram geradas reconstruções tridimensionais das superfícies de Ti-Nano (Figura 2A), Ti-Micro (Figura 2C) e Ti-Controle (Figura 2E). A rugosidade média foi maior em Ti-Micro comparada com Ti-Nano e Ti-Controle, com diferença estatística para Ti-Controle mas não para Ti-Nano ($p<0,001$ e $p=0,329$, respectivamente). Comparando Ti-Controle e Ti-Nano, a rugosidade média foi maior em Ti-Nano ($p=0,001$) (Figura 2B). A altura dos picos foi maior em Ti-Nano comparada com Ti-Micro e Ti-Controle, com diferença estatística para Ti-Controle e sem diferença estatística para Ti-Micro ($p=0,013$ e $p=0,524$, respectivamente). Comparando Ti-Micro e Ti-Controle, não houve diferença estatística ($p=0,117$) (Figura 2D). A profundidade dos vales não apresentou diferença estatística entre as superfícies avaliadas ($p>0,05$ para todos) (Figura 2F).

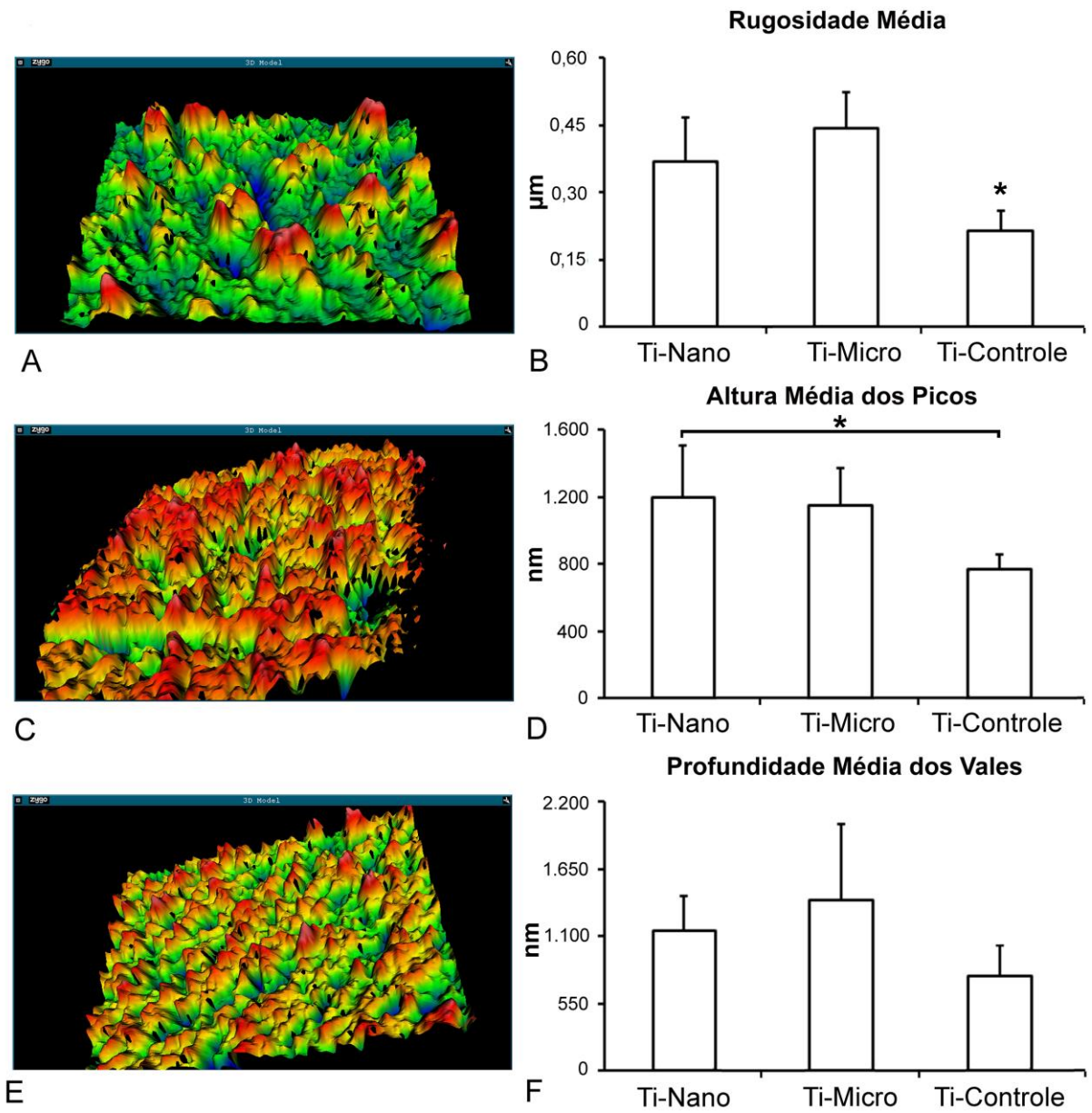

Figura 2. Caracterização das superfícies de titânio. Reconstrução tridimensional da interferometria óptica da superfície de titânio com nanotopografia (Ti-Nano, A), com microtopografia (Ti-Micro, C) e usinada (Ti-Controle, E). Parâmetros de rugosidade avaliados foram rugosidade média (B), altura média dos picos (D) e profundidade média dos vales (F). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=15) e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

1.3.1.3 Composição química das superfícies

A análise de composição química mostrou que, independentemente do tratamento, o Ti-Nano (Figura 3A), o Ti-Micro (Figura 3B) e o Ti-Controle (Figura 3C) apresentaram exclusivamente Ti na composição com ausência de contaminantes.

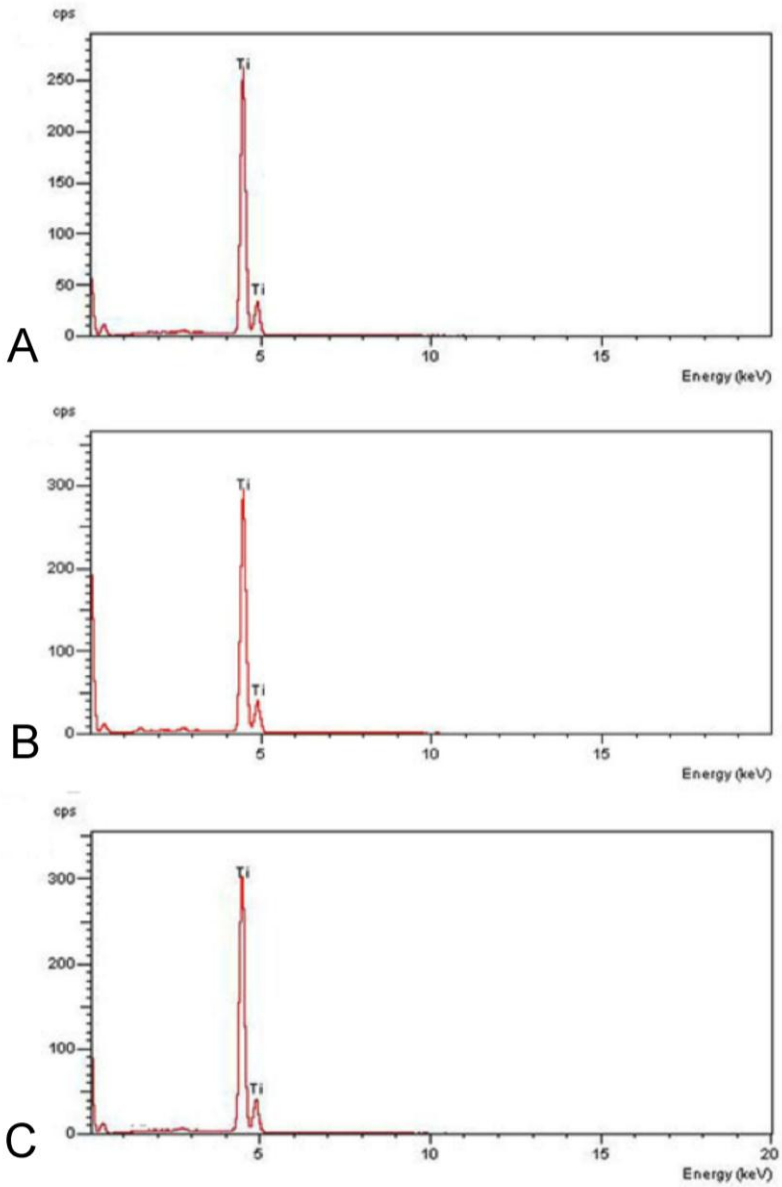

Figura 3. Caracterização das superfícies de titânio. Composição química da superfície de titânio com nanotopografia (A), com microtopografia (B) e usinada (C).

1.4 DISCUSSÃO

Os tratamentos com soluções de H_2SO_4/H_2O_2 e de $HNO_3/H_2SO_4/HCl$ produziram de forma simples, rápida e com baixo custo superfícies com porosidades nas escalas nano e microtopográfica, respectivamente, sem a presença de contaminantes.

As análises por microscopia eletrônica de varredura mostraram que os tratamentos empregados resultaram em superfícies com topografias diferentes, corroborando dados já presente na literatura. A superfície de Ti-Nano apresenta nanoconcavidades com diâmetro médio de 22 nm (DE OLIVEIRA et al., 2004; YI et

al., 2006). Essa característica do Ti-Nano permite o estabelecimento de uma relação biomimética entre a superfície do biomaterial e o tecido ósseo, favorecendo o microambiente celular (ANNUNZIATA et al., 2012) e a formação de filipódios celulares (GUADARRAMA BELLO et al., 2017). A superfície do grupo Ti-Micro também apresentou topografia homogênea, com numerosas microcavidades com bordas bem definidas, como já descrito por Elias (2010). Este tipo de superfície facilita a retenção de células osteogênicas e também permite que elas migrem para essa superfície por favorecer a adsorção da fibronectina (BRACERAS et al., 2009). A superfície do grupo Ti-Controle apresentou pequenos sulcos rasos, provavelmente, como resultado do processo de polimento.

A análise por interferometria óptica permite avaliar vários parâmetros de rugosidade, entre eles a rugosidade média, a altura média dos picos e a profundidade média dos vales. A rugosidade média é o parâmetro mais comumente utilizado (ELIAS et al., 2012), sendo que uma maior rugosidade promove um aumento da área de interface entre o biomaterial e as células, além de estar relacionada a uma maior molhabilidade e adsorção de proteínas (COUTINHO & ELIAS, 2009; DAVIES et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015; GINER et al., 2018), o que afeta diretamente a osseointegração do Ti, interferindo na adesão, proliferação e diferenciação celular (ALBREKTSSON; WENNERBERG, 2004b; SUZUKI et al., 1997; GEIS-GERSTORFER et al., 2004). De maneira geral, as superfícies Ti-Nano e Ti-Micro apresentaram valores de rugosidade média e altura média dos picos maiores que o grupo Ti-Controle; no entanto, as rugosidades médias das superfícies de Ti-Nano e Ti-Micro não apresentaram diferenças estatísticas. Em acordo com nossos achados, foi observado que uma superfície com microtopografia apresenta rugosidade semelhante à superfície com concavidades nas escalas submicro e nanotopográfica.

A análise dos elementos químicos presentes na superfície de Ti dos diferentes grupos evidenciou que tanto no Ti-Nano quanto no Ti-Micro, os diferentes tratamentos não alteraram a composição química da superfície, mostrando somente a presença de Ti. Nossos resultados confirmam que os tratamentos realizados por ataque ácido foram capazes de gerar consistentemente superfícies com nano e microtopografia livre de contaminantes, o que as tornariam mais hidrofílicas, podendo assim favorecer a adesão e a proliferação celular (RUPP et al., 2004).

Capítulo 2

CAPÍTULO 2 - EFEITO DO SILENCIAMENTO DA INTEGRINA αV SOBRE A DIFERENCIAÇÃO OSTEOBLÁSTICA INDUZIDA PELA SUPERFÍCIE DE Ti COM NANOTOPOGRAFIA

2.1 OBJETIVO

- Investigar o a participação da integrina αV na diferenciação osteoblástica induzida pela superfície de Ti com nanotopografia.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Superfícies de Ti

Foram utilizados discos de Ti-Nano e Ti-Controle preparados como descrito no capítulo anterior na seção 1.2.1.

2.2.2 Obtenção e cultura de células

Ratos Wistar pesando aproximadamente 150 gramas foram sacrificados seguindo o protocolo previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FORP-USP (# 2014.1.796.58.7, Anexo A). Os fêmures foram cirurgicamente removidos, acondicionados em meio de transporte constituído por meio essencial mínimo modificação α (α-MEM, Gibco-Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), suplementado com 500 µg/ml de gentamicina (Gibco-Life Technologies) e 3 µg/ml de fungisona (Gibco-Life Technologies), transferidos para a capela de fluxo laminar e mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos previamente ao isolamento das células. As epífises dos fêmures foram removidas e as MSCs obtidas por lavagem do canal medular das diáfises com meio de crescimento, constituído por α-MEM (Gibco-Life Technologies), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-Life Technologies), 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco-Life Technologies) e 0,3 µg/ml de fungisona (Gibco-Life Technologies), as células foram mantidas em meio de crescimento até a subconfluência. As células da primeira passagem foram plaqueadas em placas de 24 poços (Corning Life

Sciences, Corning, NY, EUA) sobre as superfícies Ti-Nano e Ti-Controle na densidade de $2x10^4$ células por disco e mantidas em cultura em meio de crescimento por períodos de até 5 dias. As culturas permaneceram a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico e o meio foi trocado a cada 48 horas.

2.2.3 Análise da expressão gênica de marcadores ósseos por PCR em tempo real

Aos 3 e 5 dias, o RNA total foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen-Life Technologies) seguindo as recomendações do fabricante e foi confeccionada a fita de DNA complementar (cDNA) a partir de 1 µg de RNA total. A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese microfluídica com nanochip Agilent 6000 RNA, no aparelho Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). Apenas as amostras com integridade (RIN) ≥ 9,0 foram usadas. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf, Hamburg, HH, Alemanha) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando o kit SuperScript™ III First Strand Synthesis Systems (High Capacity Kit, Invitrogen-Life Technologies). As reações de PCR (polymerase chain reaction) em tempo real para a quantificação da expressão gênica dos marcadores ósseos fator de transcrição *Runx2*, osterix (*Sp7*), fosfatase alcalina (*Alp*), osteocalcina (*Oc*), *Bsp* e *Opn* foram feitas utilizando o sistema de sondas TaqMan (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster city, CA, EUA). As reações foram realizadas em triplicata com volume final de 10 µl contendo 5 µl de TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific) e 0,5 µl das sondas TaqMan para os genes de interesse (20X TaqMan Gene Expression Assay Mix) e 11,25 ng/µl de cDNA. A reação de amplificação foi composta por 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (desnaturação e extensão). Os dados foram analisados com base no método comparativo do valor do ciclo limiar, método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), normalizados pela β-Actina e calibrados pelo grupo Ti-Controle aos 3 dias.

2.2.4 Análise da expressão da proteína RUNX2 por Western blot

Aos 3 e 5 dias, as células crescidas sobre Ti-Nano e Ti-Controle foram lisadas com tampão RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay – RIPA) utilizando ultrassom (Misonix, Farmingdale, NY, EUA) com 5 pulsos com intensidade 10 por 10 segundos, com intervalo de 1 minuto entre cada pulso. A quantidade de proteína foi quantificada no aparelho NanoVue (Ge Heathcare, Chicago, IL, EUA) utilizando o comprimento de onda de 280 nm. Foram preparados géis de acrilamida 8,5% montados em aparato próprio e foi adicionado tampão de corrida. Foram utilizadas amostras contendo 50 µg de proteína e para identificar o peso molecular das proteínas, foi usado um marcador (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) que identifica bandas entre 10 e 250 kDa. As proteínas foram transferidas dos géis para membrana de PTFE Hybond C-Extra membrane (GE Healthcare Life Science, Chicago, IL, EUA) usando equipamentos para a transferência molhada (Bio-Rad Laboratories). A membrana foi mantida por 1 hora em tampão salino com Tris e 0.1% Tween-20 (TBS-T, Sigma–Aldrich) contendo 5% de leite (Bio-Rad Laboratories). Após o bloqueio de sítios inespecíficos, a membrana foi incubada overnight a 4°C com o anticorpo primário anti-RUNX2 (coelho monoclonal, 1:1000 - Cell Signaling, Danvers, MA, EUA) e em seguida com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rábano cabra-anti-coelho IgG (1:2000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) por 1 hora a temperatura ambiente. Entre as incubações com anticorpos primário e secundário, e ao final da incubação com anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes, 5 minutos cada, com TBS-T. Para a imunodetecção, foi utilizado o reagente Western lightning plus-ECL (Perkin Elmer Life Sciences, Waltham, MA, EUA) e o sistema de aquisição de imagem G-Box gel (Syngene, Cambridge, Reino Unido). Para a marcação da proteína constitutiva, a membrana foi limpa com Re-blot Plus Strong (EMD – Milipore) e incubada overnight a 4°C com o anticorpo primário anti-β-Actina (Camundongo monoclonal, 1:1000, Cell Signaling), e em seguida com o anticorpo secundário cabra-anti-camundongo IgG (1:3000, Sigma-Aldrich) por 1 hora a temperatura

ambiente. Entre as incubações com anticorpos primário e secundário, e ao final da incubação com anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes, 5 minutos cada, com TBS-T. As imagens foram então obtidas como descrito a cima. A expressão da proteína RUNX2 foi obtida em triplicata (n=3), normalizada pela β-Actina e calibrada pelo grupo Ti-Controle aos 3 dias.

2.2.5 Expressão de genes relacionados à via de sinalização das integrinas

Aos 3 dias, as células crescidas sobre Ti-Nano e Ti-Controle foram submetidas à extração do RNA total e o cDNA foi confeccionado como descrito acima. Placas customizadas de PCR array foram utilizadas para avaliação da expressão gênica de 87 genes relacionados à via de sinalização das integrinas e adesão focal (RT^2 ProfilerTM PCR Array Rat Integrin Signaling Pathway, Qiagen, Hilden, NRW, Alemanha). Os experimentos foram realizados com o RT^2 SYBR Green ROX qPCR Mastermix (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. A expressão relativa foi calculada através do programa RT^2 Profiler PCR Array Data Analysis Software (Qiagen) usando 6 genes de referência, β-Actina, 18S ribosomal (*18s*), beta-2-microglobulina (*B2m*), hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase 1 (*Hprt1*), lactato desidrogenase A (*Ldha*) e glicerol-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh*) calibrada pelo grupo Ti-Controle aos 3 dias. Os dados completos desse array são apresentados na tabela suplementar em anexo.

2.2.6 Análise da expressão da proteína integrina αV por Western blot

Aos 5 dias, a expressão da proteína integrina αV em células crescidas sobre Ti-Nano e Ti-Controle foi avaliada por Western blot como descrito na seção 2.2.4, utilizando o anticorpo primário anti-ITGAV (coelho monoclonal, 1:5000, Abcam, Cambridge, Reino Unido) e o anticorpo secundário cabra-anti-coelho IgG (1:3000, Santa Cruz Biotechnology). A expressão da proteína integrina αV foi obtida em triplicata (n=3), normalizada pela β-Actina e calibrada pelo grupo Ti-Controle aos 5 dias.

2.2.7 Silenciamento da integrina αV por shRNA

2.2.7.1 Transformação (replicação) e purificação dos shRNA

Como as células crescidas sobre Ti-Nano apresentaram altos níveis de expressão gênica e proteica de integrina αV, nós estabelecemos a hipótese de que ela poderia estar envolvida no potencial osteogênico dessa superfície. Para testarmos nossa hipótese, optamos por silenciar a expressão de integrina αV. Para isso, células da linhagem MC3T3-E1 foram infectadas com partículas lentivirais contendo o sh para integrina αV (shITGAV) ou um vetor vazio (scrambled, shpLKO.1, Sigma-Aldrich). Esses vetores foram transformados em células competentes da linhagem Stable 3 (Invitrogen-Life Technologies). Para isso, 20 ng de shRNA em 1 µl foram acrescentados a 20 µl de células Stable 3 (Invitrogen-Life Technologies) e a solução foi mantida em gelo por 30 minutos. Em seguida, a solução foi incubada em banho-maria (Thermo Fisher Scientific) a 42°C por 1 minuto e, após, mantida por 2 minutos em gelo. Na sequência, a solução foi espalhada sobre uma placa de Petri de 100 mm contendo meio de Luria-Bertani (LB) suplementado com 2% de agarose (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) e 50 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich). As placas foram mantidas overnight a 37°C em incubadora microbiológica (Thermo Fisher Scientific). Uma única colônia crescida sobre a placa foi coletada e transportada para um frasco erlenmeyer contendo 50 ml de meio LB autoclavado suplementado com 50 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich). O conteúdo foi mantido overnight a 37°C sob agitação a 200 rpm (rotação por minuto – rpm) em Shaker de bancada (Thermo Fisher Scientific) para favorecer a proliferação da colônia. Ao final desse período, a solução foi transferida para frascos de centrífuga de 50 ml e centrifugados (Thermo Fisher Scientific) a 6000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os plasmídeos contendo os shRNA foram purificados a partir da fração sedimentada. A purificação dos plasmídeos foi realizada utilizando o kit de extração plasmidial ZR Plasmid Maxiprep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. A concentração de DNA foi avaliada por densidade óptica em 260 nm.

2.2.7.2 Produção lentiviral

Para a produção das partículas lentivirais foi utilizado um vetor contendo o transgene e dois vetores auxiliares que possuíam a origem de replicação do SV40, para que, após a transfecção, os plasmídeos pudessem se replicar no interior das células, aumentando a transcrição do transgene e a produção de proteínas virais a serem secretadas no meio de cultura. Para isso, células da linhagem 293-FT (Thermo Fischer Scientific) foram cultivadas em garrafa T175 (175 mm^2 - Corning) contendo meio Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle's medium - DMEM), suplementado com 10% de soro bovino fetal. As culturas de células foram mantidas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico, até atingirem 70% de confluência (aproximadamente $6x10^6$ células). Em um tubo de polipropileno de 50 ml foram acrescentados 4,5 ml de meio DMEM livre de soro fetal bovino e adicionados os plasmídeos nas seguintes quantidades: 10 µg do gene de interesse; 6,5 µg do pCMVΔR8.91 e 3,5 µg pMD2 VSVG. Em outro tubo, foram acrescentados 4,5 ml de meio DMEM livre de soro fetal bovino e 90 µl de lipofectamina 2000™ (Invitrogen-Life Technologies). Os dois tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 5 minutos. Após a primeira incubação, as duas soluções foram misturadas e incubadas por mais 20 minutos em temperatura ambiente. Neste intervalo de tempo, o meio das placas foi trocado por meio fresco. A mistura (DNA-lipofectamina) foi distribuída na placa e, após 8 horas, o meio das células foi trocado por meio D-MEM suplementado com 10% soro fetal bovino. O sobrenadante contendo as partículas virais foi recolhido após 48 e 72 horas e centrifugado a 300 rcf (força centrífuga relativa) por 5 minutos para retirada de debris ou restos celulares. Após coleta, as partículas virais foram concentradas utilizando o reagente Lenti-X Concentrator (Clontech, Mountain View, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Por fim, os vírus foram ressuspensos em 2 ml de meio de cultura e congelados em alíquotas individuais de 400 µl a -80°C até o uso.

2.2.7.3 Silenciamento da integrina αV em células pré-osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1

Células da linhagem MC3T3-E1 (subclone 14, American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA) da passagem 10 foram expandidas em frascos de

75 cm^2 em meio de crescimento até a subconfluência da cultura. Em seguida, foi adicionada solução de tripsina a 0,25% (Gibco-Life Technologies) e ácido etilenodiamino tetra-acético (Ethylenediamine tetraacetic acid – EDTA) a 1 mM (Gibco-Life Technologies) para obtenção da suspensão de células. As células foram, então, plaqueadas na densidade de $1x10^5$ células/poço em placas de poliestireno de 6 poços (Corning Incorporated), em meio de crescimento para a infecção com as partículas virais previamente preparadas. Os meios de cultura foram trocados a cada 48 horas e, durante todo o tempo de cultura, as células foram mantidas a 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico.

Para silenciar a integrina αV, células da linhagem MC3T3-E1 foram infectadas com 400 µl das alíquotas de partículas lentivirais contendo o shITGAV ou o shpLKO.1 (scrambled) em meio de crescimento com 8 µg/ml de Polibreno (Sigma-Aldrich). Após 24 horas, o meio foi trocado por meio fresco e a seleção antibiótica foi iniciada 48 horas após a infecção utilizando-se 1,25 µg/ml de Puromicina (Sigma-Aldrich) e mantida por 7 dias. As células infectadas foram colhidas e as expressões gênica e proteica de integrina αV foram avaliadas por PCR em tempo real e Western blot, como descrito nas seções 2.2.3 e 2.2.4, respectivamente. Os dados foram obtidos em triplicata (n=3), normalizados pela β-Actina e calibrados pelo grupo shpLKO.1.

2.2.7.4 Efeito do silenciamento da integrina αV sobre a diferenciação osteoblástica induzida pela superfície de Ti com nanotopografia

Células MC3T3-E1 shITGAV e shpLKO.1, foram plaqueadas na densidade de $2x10^4$ células sobre o Ti-Nano para a avaliação da sua participação no potencial osteogênico dessa superfície. Aos 5 dias de cultura, essas células foram processadas para avaliação da expressão gênica dos marcadores ósseos *Runx2, Oc, Bsp, Sp7, Opn* e *ALP*, por PCR em tempo real, e avaliação da expressão das proteínas integrina αV e RUNX2, por Western blot, como descrito nas seções 2.2.3 e 2.2.4, respectivamente. Os dados foram obtidos em triplicata (n=3), normalizados pela β-Actina e calibrados pelo grupo shpLKO.1.

2.2.8 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata (n=3). Os dados do efeito osteogênico do Ti-Nano e do Ti-Controle foram submetidos ao teste de ANOVA Two-Way, seguido do pós-teste de Tukey quando necessário. Os dados do PCR array foram calculados no programa RT^2 Profiler PCR Array Data Analysis Software (Qiagen). Os dados do silenciamento de integrina αV foram submetidos ao teste t de Student. Os testes de ANOVA Two-Way e teste t de Student foram feitos utilizado o programa SigmaPlot (Systat Software) e o nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

2.3. RESULTADOS

2.3.1 Análise da expressão gênica e proteica de marcadores ósseos por PCR em tempo real e Western blot

O Ti-Nano regulou positivamente a maioria dos marcadores da diferenciação osteoblástica avaliados. A expressão gênica de *Runx2* (Figura 4A) foi maior aos 3 dias (p=0,001), e menor aos 5 dias (p=0,003) em células crescidas sobre Ti-Nano comparado ao Ti-Controle. A expressão gênica de *Sp7* (Figura 4B) de *Alp* (Figura 4C) foram maiores aos 3 e 5 dias (p=0,005 e p=0,001, respectivamente para *Sp7 e* p=0,002 e p=0,001, respectivamente para *Alp*) em células crescidas sobre Ti-Nano comparado ao Ti-Controle. A expressão gênica de *Oc* (Figura 4D) não apresentou diferença aos 3 dias (p=0,479) e foi maior aos 5 dias (p=0,001) em células crescidas sobre Ti-Nano comparado ao Ti-Controle. A expressão gênica de *Bsp* (Figura 4E) e de *Opn* (Figura 4F) foram maiores aos 3 e 5 dias (p=0,001 para todos) em células crescidas sobre Ti-Nano comparado ao Ti-Controle. A expressão proteica de RUNX2 (Figura 4G e H) foi maior aos 3 dias (1,5-vezes, p=0,005) e aos 5 dias (1,6-fold, p=0,002) em células crescidas sobre Ti-Nano comparado ao Ti-Controle.

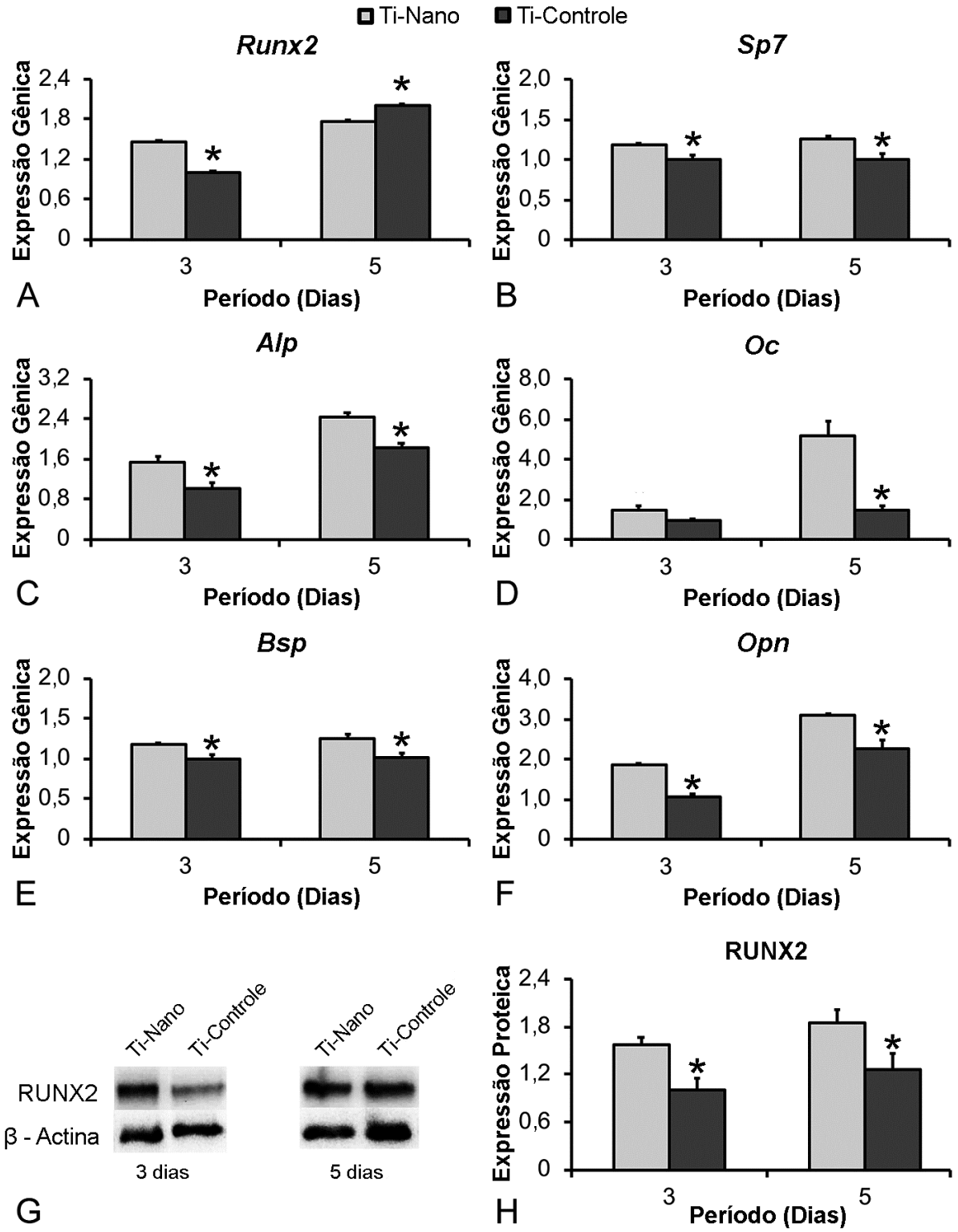

Figura 4. Efeito da superfície sobre a expressão gênica e proteica de marcadores osteoblásticos em células crescidas sobre superfície de titânio com nanotopografia (Ti-Nano) e usinada (Ti-Controle). Expressão gênica de fator de transcrição relacionado ao runt (*Runx2*, A), osterix (*Sp7*, B), fosfatase alcalina (*Alp*, C), osteocalcina (*Oc*, D), sialoproteína óssea (*Bsp*, E) e osteopontina (*Opn*, F), e expressão proteica de RUNX2 (G e H) aos 3 e 5 dias em células-tronco mesenquimais. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes entre Ti-Nano e Ti-Controle dentro do mesmo tempo experimental ($p \leq 0,05$).

2.3.2 Análise da expressão de genes e proteína relacionados à via de sinalização das integrinas por PCR array e Western blot

Dos 87 genes avaliados, 13 foram positivamente regulados (modulação ≥1,9-vezes, p≤0,05) pelo Ti-Nano quando comparado com Ti-Controle, entre eles, 6 integrinas, 1 relacionado a proteínas do citoesqueleto, 3 relacionados à sinalização da proteína G, e 3 na sinalização das quinases de adesão focal (Tabela 1).

Tabela 1. Expressão dos genes relacionados à via de sinalização das integrinas regulados positivamente (≥1,9-vezes, p≤0,05) em células-tronco mesenquimais crescidas sobre Ti-Nano e Ti-Controle aos 3 dias

Gene	Ti-Controle	Ti-Nano	Valor de p
Actb (β-Actina)	1	1	1
Integrinas			
Itga10 (Integrina alfa-10)	1	1,98	0,001
Itga11 (Integrina alfa-11)	1	2,02	0,001
Itga7 (Integrina alfa-7)	1	2,01	0,001
Itgav (Integrina alfa-V)	1	1,96	0,001
Itgb3 (Integrina beta-3)	1	2,02	0,001
Itgb5 (Integrina beta-5)	1	2,02	0,001
Sinalização por Proteína G			
Pak3 (Serina/threonin-Proteina kinase 3)	1	2,03	0,001
Shc2 (Proteína transformadora 2)	1	2,02	0,001
*Sos1 (*Son of sevenless homolog 1)	1	2,02	0,001
Proteínas do Citoesqueleto & Reguladoras			
Vav1 (Proto-oncogene vav)	1	1,99	0,001
Sinalização por Quinases de Adesão Focal			
Capn2 (Subunidade catalítica Calpain-2)	1	2,03	0,001
Prkca (Proteína quinase C tipo beta)	1	2,02	0,001
Prkcb (Caveolina-3)	1	2,02	0,001

Considerando o papel relevante da integrina αV na diferenciação osteoblástica (SU et al., 2010), nós avaliamos sua expressão por Western blot e

observamos uma maior expressão da proteína integrina αV nas células crescidas sobre o Ti-Nano (1,5-vezes, p=0,008) aos 5 dias (Figura 5).

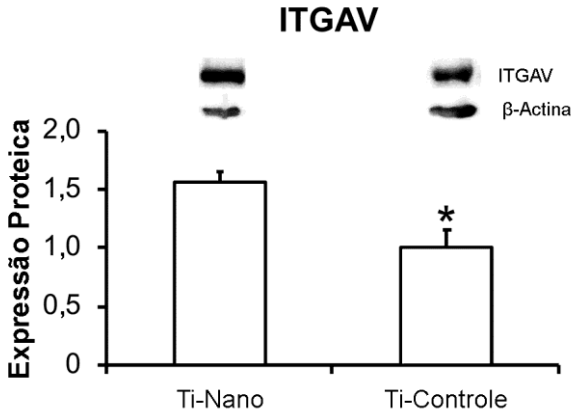

Figura 5. Efeito da superfície sobre a expressão proteica de integrina αV (ITGAV) em células crescidas sobre superfícies de titânio com nanotopografia (Ti-Nano) ou usinada (Ti-Controle) aos 5 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) e o asterisco indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05).

2.3.3 Silenciamento da integrina αV em células pré-osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1

Após 7 dias de seleção antibiótica, o silenciamento da integrina αV foi confirmado pela expressão gênica reduzida em 75% (Figura 6A) e a expressão proteica reduzida em 85% (Figura 6B) (p<0,001 para ambos) nas células shITGAV comparadas com as células shpLKO.1.

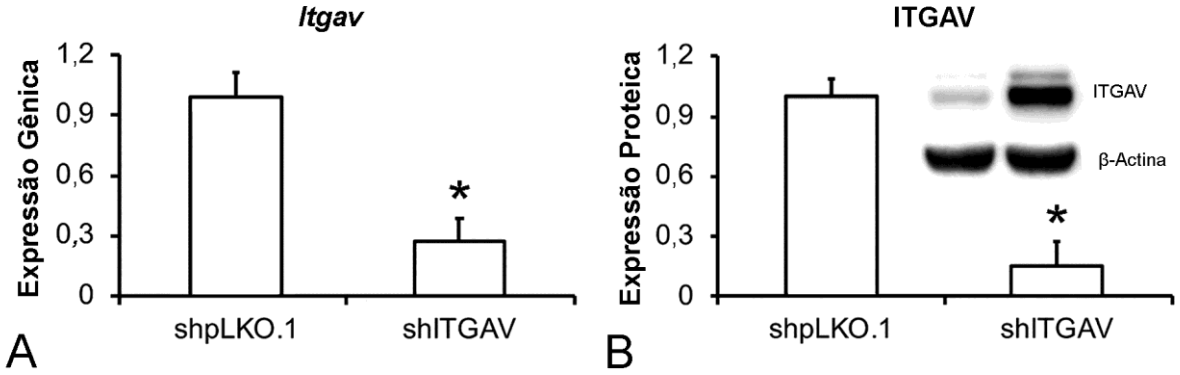

Figura 6. Eficiência do silenciamento da integrina αV com shRNA. Expressão gênica (A) e proteica (B) de integrina αV aos 7 dias após seleção de células scramble MC3T3-E1 (shpLKO.1) e shITGAV-MC3T3-E1 (shITGAV). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes (p≤0,05).

2.3.4 Efeito do silenciamento da integrina αV sobre a diferenciação osteoblástica induzida pela superfície de Ti com nanotopografia

Aos 5 dias, a expressão gênica dos marcadores osteoblásticos *Runx2* (Figura 7A, p=0,001), *Sp7* (Figura 7B, p=0,001), *Alp* (Figura 7C, p=0,005), *Oc* (Figura 7D, p=0,001), *Bsp* (Figura 7E, p=0,008) e *Opn* (Figura 7F, p=0,007) foi menor nas células shITGAV comparada com as células pLKO.1. A expressão proteica de RUNX2 (Figura 7G e H) foi menor (p=0,003) nas células shITGAV comparadas com as células pLKO.1. Esses resultados sugerem uma importante participação da integrina αV no potencial osteoblástico da nanotopografia.

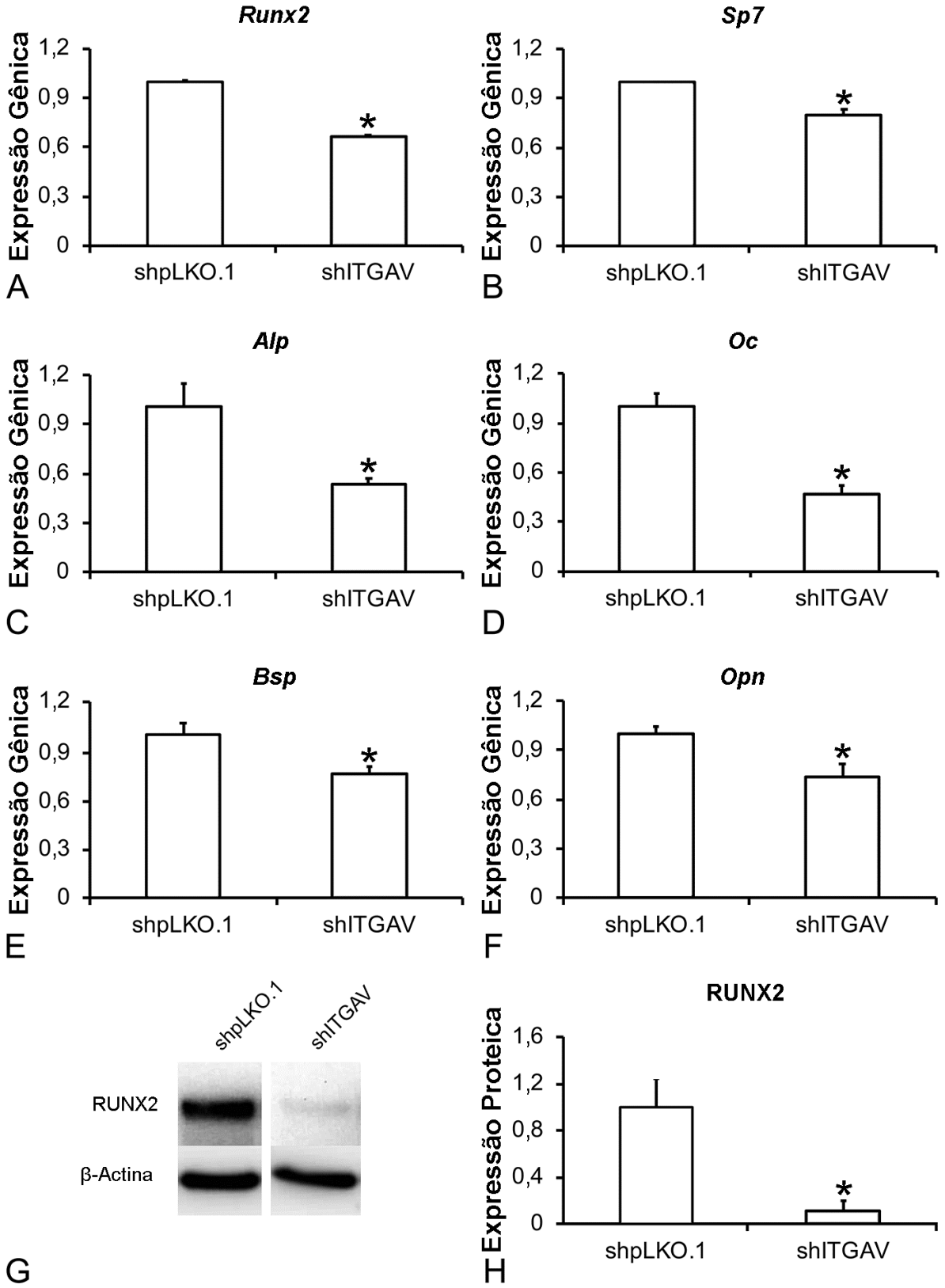

Figura 7. Efeito do silenciamento da integrina αV sobre a expressão gênica e proteica de marcadores osteoblásticos em células crescidas sobre superfície de titânio com nanotopografia (Ti-Nano). Expressão gênica de fator de transcrição relacionado ao runt (*Runx2*, A), osterix (*Sp7*, B), fosfatase alcalina (*Alp*, C), osteocalcina (*Oc*, D), sialoproteína óssea (*Bsp*, E), e osteopontina (*Opn*, F) e expressão proteica de RUNX2 (G e H) aos 5 dias em células scramble MC3T3-E1 (shpLKO.1) e shITGAV-MC3T3-E1 (shITGAV). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

2.4 DISCUSSÃO

Modificações de superfície de Ti afetam o comportamento celular (VARIOLA et al., 2011; SVERZUT et al., 2012; KATO et al., 2014; ROSA et al., 2014; LOTZ et al., 2018; SOUZA et al., 2018) e, portanto, o desenvolvimento de topografias que ativem vias de sinalização celular sabidamente relacionadas à diferenciação osteoblástica é uma estratégia importante para modular o processo de osseointegração. Neste estudo, confirmamos o alto potencial osteogênico do Ti com nanotopografia e demonstramos que este potencial se deve, ao menos em parte, à atuação da integrina αV (Figura 8).

Para a avaliação da diferenciação osteoblástica induzida pela superfície de Ti com nanotopografia, avaliamos a expressão de genes característicos de células osteoblásticas como o *Runx2,* o principal fator de transcrição que regula a formação óssea (LIAN et al., 2006 KOMORI et al., 2010), o *Sp7*, outro fator de transcrição que contribui para a maturação dos osteoblastos (NAKASHIMA et al., 2002); a *Alp*, importante no início da diferenciação osteoblástica e fundamental no processo de mineralização, disponibilizando fosfato para a produção da matriz (MILLÁN, 2014), a *Oc,* que corresponde à 20% das proteínas não colágenas da matriz óssea, produzida por osteoblastos previamente à mineralização e portanto considerada como um marcador tardio de diferenciação osteoblástica (ANSELME, 2000), a *Bsp,* envolvida na nucleação de cristais hidroxiapatita (HUNTER, GOLDBERG 1993; GAMS et al., 1999) e a *Opn,* que tem afinidade por cristais de hidroxiapatita e inibe a formação e o crescimento dos cristais (BOSKEY et al., 1993, BOSKEY 1995). Nosso resultados confirmaram o potencial osteogênico da nanotopografia mesmo em condições não osteogênicas, como descrito previamente por Rosa et al. (2014). Para todos os genes avaliados, a expressão foi maior nos períodos experimentas de 3 e 5 dias, com exceção da expressão gênica de *Runx2* aos 5 dias, que foi menor sobre o Ti com nanotopografia comparado ao Ti usinado. No entanto, a expressão proteica de RUNX2 foi maior sobre o Ti com nanotopografia aos 3 e 5 dias, fato que pode ser explicado pelos numerosos mecanismos biológicos que dissociam os níveis de proteína dos níveis de mRNA, como por exemplo a ação de microRNAs (BARRETT et al., 2012; LIU et al., 2016).

Diversos estudos têm mostrado a participação da via de sinalização das integrinas na resposta de células ao Ti com diferentes topografias. Nesse estudo,

optamos pela técnica de PCR array para a avaliação da expressão gênica de componentes dessa via. Tal abordagem representa uma vantagem em relação aos estudos anteriormente relatados na literatura, pois permite a análise simultânea de 87 genes relacionados à via e não integrinas específicas (OLIVARES-NAVARRETE et al., 2008; WANG et al., 2013; ROSA et al., 2014; GITTENS et al., 2014; OLIVARES-NAVARRETE et al., 2015; WANG et al., 2016, GUADARRAMA BELLO et al., 2017; KWON et al., 2018).

Entre as integrinas presentes nesse PCR array, as integrinas α10, αV, β3 e β5 têm sido relacionadas à modulação da diferenciação osteoblástica (WILDER 2002; CHENG et al., 2005; LUAN et al., 2007; OLIVARES-NAVARRETE et al., 2015; ELSAFADI et al., 2016). A integrina αV tem sido descrita com um importante mecanotransdutor para a diferenciação osteogênica, assim como os complexos formados pelas subunidades αVβ3 e subunidades αVβ1 (SU et al, 2010; DI BENEDETTO et al., 2015; LEE et al., 2015; ZHAO et al. 2018). Além disso, o papel da integrina αV no potencial osteogênico pode ser por ativação de outras vias relacionadas a diferenciação osteoblástica, como TGFβ, BMP e Wnt (ANNES et al. 2002; LAI & CHENG, 2005; LIAN et al., 2006; SU et al, 2010; LU et al., 2015). O complexo αVβ3 tem sido relacionado ao comprometimento das MSCs com a linhagem osteoblástica por interagir com ligantes da matriz extracelular como a vitronectina e a osteopontina (DI BENEDETTO et al., 2015). Já a subunidade αVβ1 tem sido relacionada a diferenciação osteoblástica por sobreposição ao receptor BMPR1 para facilitar a ligação da BMP2 e assim levar à diferenciação (LAI & CHENG, 2005).

Em trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa, mostramos que a nanotopografia induz a diferenciação osteogênica, pelo menos em parte, aumentando a produção endógena de BMP2 e modulando a via de sinalização das BMPs. Su et al, 2010, mostrou que o complexo αVβ3 é crucial para a proteína CYR61 mediar a expressão de *Bmp2* e, subsequentemente, a diferenciação osteoblástica. Corroborando com esses achados, observamos que o silenciamento da integrina αV reduziu a expressão da maioria dos marcadores osteoblásticos sobre Ti com nanotopografia. Portanto, nossos dados indicam que o potencial osteogênico do Ti com nanotopografia se deve, ao menos em parte, a mecanismos celulares modulados pela integrina αV e estudos adicionais são necessários para

investigar se sua interação com outras vias de sinalização, como por exemplo a da BMP2, afeta a diferenciação osteoblástica induzida pela nanotopografia.

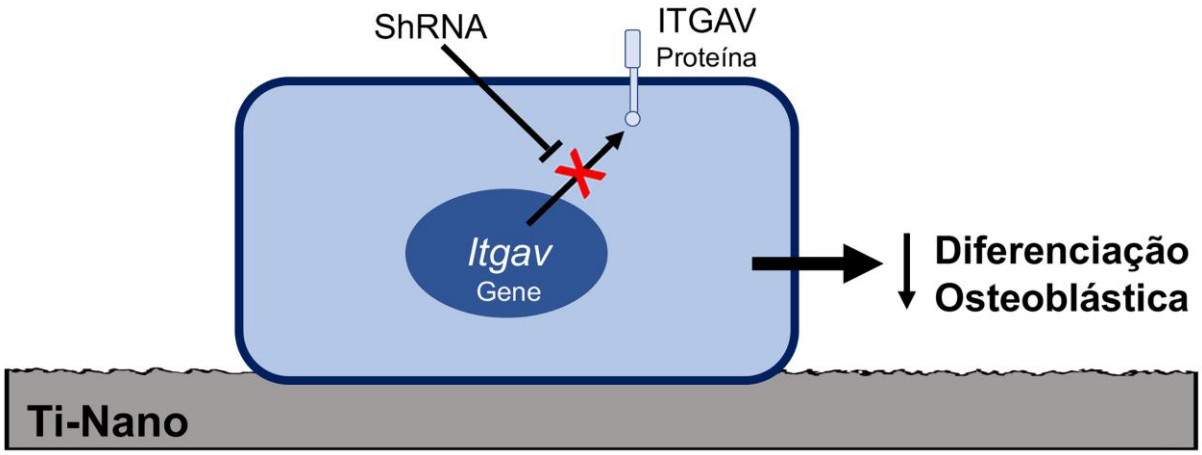

Figura 8. Representação esquemática da participação da integrina αV (ITGAV) na diferenciação osteoblástica induzida pelo titânio com nanotopografia (Ti-Nano).

Capítulo 3

CAPÍTULO 3 – EFEITO DO SILENCIAMENTO DA INTEGRINA β3 NA DIFERENCIAÇÃO OSTEOBLÁSTICA INDUZIDA POR SUPERFÍCIES DE TI COM NANO E MICROTOPOGRAFIA

3.1 OBJETIVO

- Investigar o a participação da integrina β3 na diferenciação osteoblástica induzida por superfícies de Ti com nano e microtopografia.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Superfícies de Ti

Foram utilizados discos de Ti com superfície na escala nanométrica (Ti-Nano) e micrométrica (Ti-Micro), preparados como descrito no capítulo 1, seção 1.2.1.

3.2.2 Obtenção e cultura de células

As MSCs foram obtidas de medula óssea de ratos Wistar e cultivadas como descrito na seção 2.2.2 do capítulo 2. As células da primeira passagem foram cultivadas em placas de 24 poços (Corning Life Sciences, Corning, NY, EUA) sobre as superfícies Ti-Nano e Ti-Micro na densidade de $2x10^4$ células por disco em meio de crescimento, durante 3 dias. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidifica contendo 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico, e o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas.

3.2.3 Expressão de genes relacionados à via de sinalização das integrinas

Aos 3 dias, as células crescidas sobre as superfícies de Ti-Nano e Ti-Micro foram submetidas à extração do RNA total com o regente Trizol (Invitrogen-Life Technologies). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado usando 1 µg do RNA total através da reação da transcriptase reversa (Kit High Capacity, Invitrogen-Life Technologies). Placas de array customizadas foram usadas como descrito no

capítulo anterior, seção 2.2.5, para detectar a expressão de 87 genes relacionados à via de sinalização das integrinas a adesão focal (RT2 ProfilerTM PCR Array Rat Integrin Signaling Pathway, Qiagen). A expressão gênica relativa foi calculada por meio do software RT2 Profiler PCR Array Data Analysis (Qiagen) usando 6 genes constitutivos, β-Actina, *18s*, *B2m*, *Hprt1*, *Ldha* e *Gapdh*, e calibrada em relação às células crescidas sobre Ti-Micro. Os dados completos desse array estão apresentados na tabela suplementar em anexo.

3.2.4 Construção do CRISPR/Cas9

3.2.4.1 Células MC3T3-E1 expressando constitutivamente a dCas9-KRAB (KRAB)

Para uma expressão celular estável da dCas9-KRAB, células MC3T3-E1 foram infectadas com partículas lentivirais preparadas como descrito no capítulo anterior, seção 2.2.7.2, contendo o vetor lentiviral pHAGE EF1α dCas9-KRAB (Addgene #50919). Para isso, as células MC3T3-E1 foram plaqueadas em placas de 6 poços sob a densidade de $1x10^5$ células/poço e mantidas em meio de crescimento a 37°C em atmosfera umidifica contendo 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico. Depois de 24 horas, o meio de cultura foi substituído por uma solução contendo meio de crescimento com 8 µg/ml de Polibreno (Sigma-Aldrich) e o vírus previamente preparado e mantido por 18 horas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico. Em seguida, a solução letiviral foi trocada por meio de crescimento novo e, 48 horas após a infecção, foi iniciada a seleção com Puromicina (1,5 µg/ml) (Thermo Fischer Scientific), mantida por 7 dias. A presença da dCas9-KRAB foi confirmada por um PCR qualitativo e Western blot para detectar a proteína dCas9, como descrito abaixo. Essas células KRAB-MC3T3-E1 (KRAB) foram usadas como grupo controle.

3.2.4.2 Análise do DNA genômico por PCR qualitativo

Para isolar o DNA genômico (gDNA), $1x10^5$ células de ambos os grupos MC3T3-E1 e KRAB-MC3T3-E1 foram ressuspensas em 50 µl da solução QuickExtract (Lucigen - Epicenter, Middleton, WI, EUA). A reação da PCR foi

preparada com 10 µl do KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2×) (Kapa Biosystems - Roche Applied Science Penzberg, DE-BY, DE), 0.5 µl do primer forward e reverse (10 µM) (F-ACTGATAAGGCTGACTTGCGGT R-CGAAGTTCCAGGGAGTGATGGT), 100 ng do gDNA e H_2O até completar 20 µl. A condição do termociclador incluiu uma desnaturação inicial a 94 °C por 15 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 60 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto e uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Os produtos da PCR foram adicionados com 4 µl do Orange DNA Loading Dye (6X) (Thermo Fischer Scientific) e separados por gel de eletroforese a 1%. As bandas foram registradas utilizando o GelDoc UV (Bio-Rad Laboratories).

3.2.4.3 Análise da expressão da proteína Cas9 por Western blot

Aos 3 dias após seleção com puromicina, as células MC3T3-E1 e KRAB-MC3T3-E1 foram lisadas com tampão RIPA. Depois da quantificação, 50 µg da proteína total de cada grupo foi denaturada e separada em gel de eletroforese de poliacrilamida a 8,5% e transferida para uma membrada de PTFE Hybond C-Extra (GE Healthcare) como descrito no capítulo anterior, seção 2.2.4. A membrana foi bloqueada por 1 hora em TBS-T contendo 5% de leite (Bio-Rad Laboratories), incubada overnight a 4°C com anticorpo anti-CRISPR (Cas9) (camundongo monoclonal - 1:500, Biolegend, San Diego, CA, EUA) e depois por 1 hora a temperatura ambiente com anticorpo secundário cabra-anti-camundongo IgG1 (1:2000, Santa Cruz Biotechnology). Entre as incubações com anticorpos primário e secundário e ao final da incubação com anticorpo secundário, as membranas foram lavadas três vezes, por 5 minutos cada. As bandas das proteínas foram detectadas utilizando o reagente Western lightning chemiluminescence (Perkin Elmer Life Sciences) e as imagens obtidas do equipamento G-Box gel imaging (Syngene). Para a marcação da proteína constitutiva, a membrana foi limpa com Re-blot Plus Strong (EMD – Milipore) e incubada overnight a 4°C com o anticorpo primário anti-Tubulina (camundongo monoclonal - 1:1000, Santa Cruz Biotechnology), e em seguida com o anticorpo secundário cabra-anti-camundongo IgG (1:3000, Sigma-Aldrich) por 1 hora a temperatura ambiente. Entre as incubações com anticorpos primário e secundário, e ao final da incubação com anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes, 5 minutos cada, com TBS-T. As imagens foram então obtidas como descrito

a cima. A expressão da proteína Cas9 foi obtida em triplicata (n=3), normalizada pela Tubulina e calibrada pelas células MC3T3-E1.

3.2.4.4 Desenho do RNA guia

Devido à Ti-Nano regular positivamente a expressão da integrina β3, sendo esta uma subunidade que favorece a diferenciação osteoblástica (SENS et al., 2017), nós hipotetizamos que a integrina β3 poderia estar envolvida no potencial osteogênico da nanotopografia. Para testar essa hipótese, três gRNAs foram desenhados e avaliados através da plataforma Benchling (https://benchling.com) para o gene integrina β3. A região alvo foi de –300 até +100 pares de base do sitio de início da transcrição gênica. Os gRNAs, com 20 pares de bases, foram selecionados considerando o melhor índice de "on target" e "off target". As sequências de oligonucleotídeos foram compradas da Invitrogen (Invitrogen-Life Technologies).

3.2.4.5 Transdução das células KRAB-MC3T3-E1 com partículas lentivirais contendo o RNA guia para integrina β3 (gITGB3)

Para a produção de vírus contendo o gRNA, os oligonucleotídeos foram anelados e submetidos a uma reação de digestão e ligação com o plasmídeo pLK5.sgRNA.EFS.tRFP (Addgene #57823). Então, os plasmídeos foram transformados em células competentes Stable3 (Invitrogen-Life Technologies) e amplificados em meio LB contendo ampicilina (50 µg/ml). A purificação foi feita utilizando o ZR Plasmid Maxiprep (Zymo Research), conforme as recomendações do fabricante, e a concentração foi avaliada pela densidade óptica em 260 nm. As partículas lentivirais foram geradas como descrito acima, e as células KRAB-MC3T3-E1 (Scramble) foram infectadas com o vírus para cada gRNA para gerar as células gITGB3-MC3T3-E1. Após, essas células foram submetidas a uma seleção celular por proteína de fluorescência vermelha. Para testar a eficiência do gITGB3, foram avaliadas a expressão gênica e proteica da integrina β3 nas células crescidas sobre o poliestireno em 3 dias depois da seleção celular. A expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real, e a expressão proteica, por Western blot, seguindo os

protocolos descritos no capítulo anterior, nas seções 2.2.3 e 2.2.4, respectivamente. Foram utilizados o anticorpo primário anti-integrina β3 (coelho monoclonal - 1:1000, Abcam) e o secundário cabra-anti-coelho IgG (1:2000, Santa Cruz Biotechnology). A expressão proteica de integrina β3 nas células gITGB3-MC3T3-E1 foi normalizada pela proteína β-Actina e calibrada pelas células KRAB-MC3T3-E1 (n=3). A proteína β-Actina foi detectada usando o anticorpo primário anti-β-Actina (camundongo monoclonal - 1:1000, Cell Signaling), seguido pelo secundário cabra-anti-camundongo IgG (1:3000, Sigma-Aldrich).

3.2.4.6 Análise da expressão genica de integrina β3 por PCR em tempo real

Para detectar a expressão gênica de integrina β3, o RNA total das células gITGB3-MC3T3-E1 e KRAB-MC3T3-E1 foi extraído com o reagente Trizol (Invitrogen) e a concentração de RNA foi determinada pela densidade óptica com o comprimento de onda de 260 e 260:280 nm. O cDNA foi sintetizado usando 1 µg do RNA total pela reação da transcriptase reversa (Kit High Capacity, Invitrogen-Life Technologies), como descrito no capítulo anterior, seção 2.2.3. A reação de PCR em tempo real foi realizada no Step One Plus Real-Time PCR (Thermo Fischer Scientific) com TaqMan® PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). As reações foram feitas em triplicata (n=3), usando 5 µl do TaqMan Fast Advanced Master Mix, 0,5 µl de sondas TaqMan® e 4,5 µl do cDNA (11,25 ng). A expressão gênica relativa foi normalizada pela β-Actina e calibrada pelas KRAB-MC3T3-E1.

3.2.5 Efeito do silenciamento da integrina β3 sobre a diferenciação osteoblástica induzida pela superfície de Ti com nano e microtopografia

Baseado nas análises para cada gRNA, nós selecionamos as células com a maior eficiência de silenciamento para serem plaqueadas sobre as superfícies de Ti-Nano e Ti-Micro. As células KRAB-MC3T3-E1 e gITGB3-MC3T3-E1 foram contadas e plaqueadas na densidade de $2x10^4$ células/disco em placas de cultura de 24-poços (Corning Incorporated), contendo os discos Ti-Nano e Ti-Micro, e mantidas em meio de crescimento por até 10 dias. Durante o período de cultura celular, as células foram mantidas a 37°C e em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 e

95% de ar atmosférico. Aos 7 dias, foi avaliada a expressão gênica de *Runx2*, *Sp7*, *Alp*, *Oc*, *Bsp* e *Opn*, por PCR em tempo real (n=3), e a expressão proteica de RUNX2, por Western blot (n=3), como descritos no capítulo anterior, nas seções 2.2.3 e 2.2.4, respectivamente. A proteína RUNX2 foi detectada com o anticorpo primário anti-RUNX2 (coelho monoclonal, 1:1000 - Cell Signaling) e anticorpo secundário cabra-anti-coelho IgG (1:3000, Sigma-Aldrich). A expressão proteica de RUNX2 nas células gITGB3-MC3T3-E1 foi normalizada pela proteína β-Actina e calibrada pelas células KRAB-MC3T3-E1 (n=3). A proteína β-Actina foi detectada com o anticorpo primário anti-β-Actina (camundongo monoclonal - 1:1000, Cell Signaling), seguido pelo anticorpo secundário cabra-anti-camundongo IgG (1:3000, Sigma-Aldrich). Além disso, aos 10 dias a atividade de ALP *in situ* foi avaliada por Fast red, conforme descrito a seguir.

3.2.5.1 Análise da atividade de fosfatase alcalina in situ por Fast red

Para detectar a atividade de ALP *in situ*, 1 ml da mistura de 1,8 mM Fast Red-TR Salt (Sigma–Aldrich) e 0,9 mM Fosfato de Naphtol AS-MX (Sigma–Aldrich) foram inseridos em cada poço da placa de cultura com as células crescidas com sobre Ti-Nano e Ti-Micro. As placas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO_2 e 95% de ar por 30 minutos. Então a solução foi removida e os discos de Ti secos em temperatura ambiente para avaliação da fluorescência usando o microscópio Axio Imager M2 (Carl Zeiss, Göttingen, GO, Alemanha). As imagens foram obtidas com a câmera digital Axiocam MRm (Carl Zeiss) e processadas usando o programa Adobe Photoshop CS5 Extended, versão 12.1 (Adobe Systems, San Jose, CA, EUA). Os valores foram obtidos pela quantificação de pixels em três áreas selecionadas modo randômico em seis discos de cada grupo Ti-Nano e Ti-Micro (n=18).

3.2.6 Efeito do silenciamento da integrina β3 na expressão gênica da integrina αV de osteoblastos crescidos sobre o Ti com nano e microtopografia

Aos 7 dias, a expressão gênica de integrina β3 e integrina αV foi avaliada nas células KRAB-MC3T3-E1 e gITGB3-MC3T3-E1 crescidas sobre o Ti com nano e

microtopografia, por PCR em tempo real (n=3), conforme metodologia descrita no capítulo anterior, na seção 2.2.3.

3.2.7 Efeito do silenciamento da integrina β3 na expressão gênica de componentes das vias de sinalização Wnt e BMP de osteoblastos crescidos sobre o Ti com nano e microtopografia

Aos 7 dias, a expressão gênica de alguns componentes da via de sinalização WNT, polipose adenomatousa coli (*Apc*), *Axin1*, *β-Catenina*, *Cke1*, Frizzled 5 (*Fzd5*), glicogênio sintase quinase 3β (*Gsk3b*) e proteína fosfatase 2A (*Pp2a*); e via de sinalização da BMP, quinase tipo receptor da ativina 2 (*Alk2*), receptor tipo 1A proteína óssea morfogenética (*Bmpr1a*), receptor tipo 2A da proteína óssea morfogenética (*Bmpr2a*), *Smad1* e *Smad4*, foi avaliada nas células KRAB-MC3T3-E1 e gITGB3-MC3T3-E1, crescidas sobre Ti-Nano e Ti-Micro, por PCR em tempo real (n=3), como descrito no capítulo anterior, seção 2.2.3.

3.2.8 Análise estatística

Os dados de expressão genica e proteica foram obtidos em triplicata (n=3). Os dados da atividade de ALP *in situ* foram obtidos em três campos escolhidos de forma randomizada em seis discos de cada grupo (n=18). Os dados do PCR array foram calculados no programa RT^2 Profiler PCR Array Data Analysis Software (Qiagen) e o restante dos dados foram submetidos ao teste t Student utilizando o programa SigmaPlot (Systat Software). O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Expressão de genes relacionados à via de sinalização das integrinas

Dos 87 genes avaliados, 10 foram positivamente regulados (modulação ≥1,9-vezes, $p \leq 0,05$) pelo Ti-Nano quando comparado com Ti-Micro, entre eles, 5 integrinas, 1 envolvido na sinalização da proteína G, 1 envolvido na sinalização da

AKT/PI-3 quinase, 2 na sinalização das quinases de adesão focal e 1 receptor de superfície (Tabela 2).

Tabela 2. Expressão dos genes relacionados à via de sinalização das integrinas regulados positivamente (≥1,9-vezes, p≤0,05) em células-tronco mesenquimais crescidas sobre Ti-Nano e Ti-Micro aos 3 dias

Gene	Ti-Micro	Ti-Nano	Valor de p
Actb (β-Actina)	1	1	1
Integrinas			
Itga10 (Integrina alfa-10)	1	1,98	0,001
Itga11 (Integrina alfa-11)	1	2,02	0,001
Itgal (Integrina alfa-L)	1	1,98	0,001
Itgam (Integrina alfa-M)	1	2,01	0,001
Itgb3 (Integrina beta-3)	1	2,02	0,001
Sinalização por Proteína G			
Pak3 (Serina/threonin-proteina kinase 3)	1	2,03	0,001
AKT / Sinalização por PI-3-Quinase			
Vav1 (Proto-oncogene vav)	1	1,99	0,001
Sinalização por Quinases de Adesão Focal			
Shc2 (SHC-transforming protein 2)	1	2,02	0,001
Prkcb (Proteína kinase C tipo beta)	1	4,01	0,001
Outros Receptores de Superfície Celular			
Cav3 (Caveolina-3)	1	2,00	0,001

3.3.2 Eficiência do CRISPR/Cas9

Nós confirmamos a presença da dCas9 nas células KRAB-MC3T3-E1 por meio de avaliação do DNA genômico e da expressão proteica (Figuras 9A e B, respectivamente).

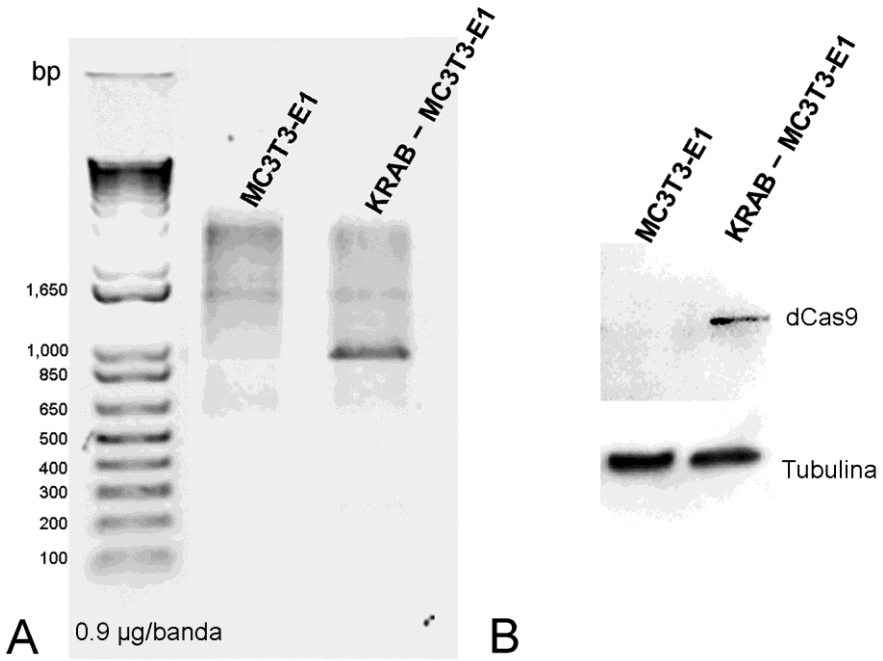

Figura 9. Células da linhagem MC3T3-E1, subclone 14, expressando constitutivamente a dCas9-KRAB (KRAB). DNA genômico (A) e expressão proteica (B) da dCas9 em células KRAB-MC3T3-E1 e MC3T3-E1.

Aos 3 dias após a seleção celular, a expressão gênica e proteica de integrina β3 foi avaliada em culturas de células KRAB-MC3T3-E1 e gITGB3-MC3T3-E1. O gRNA mais eficiente reduziu aproximadamente 82% da expressão gênica de integrina β3 (p=0,001, Figura 10A) e 83% a expressão proteica (p=0,013, Figura 10B).

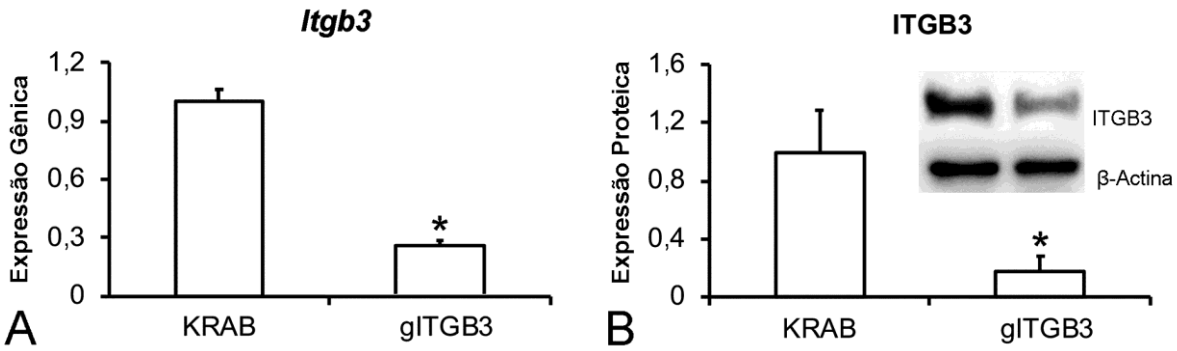

Figura 10. Eficiência do silenciamento da integrina β3 com CRISPR/Cas9. Expressão gênica (A) e proteica (B) de integrina β3 aos 3 dias após seleção de células gITGB3-MC3T3-E1 (gITGB3) e KRAB-MC3T3-E1 (KRAB). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes (p≤0,05).

3.3.3 Efeito do silenciamento da integrina β3 sobre a diferenciação osteoblástica induzida pela superfície de Ti com nano e microtopografia

Sobre Ti-Nano, a expressão gênica de *Runx2* (Figura 11A, p=0,001), *Sp7* (Figura 11B, p=0,001), *Alp* (Figura 11C, p=0,001), *Oc* (Figura 11D, p=0,002), *Bsp* (Figura 11E, p=0,001) e *Opn* (Figura 11F, p=0,005) bem como a expressão proteica de RUNX2, foram reduzidas após o silenciamento de integrina β3 (Figura 12A, p=0,001). Além disso, a atividade de ALP *in situ* foi reduzida em 81% após o silenciamento de integrina β3 (Figura 12B, p=0,018).

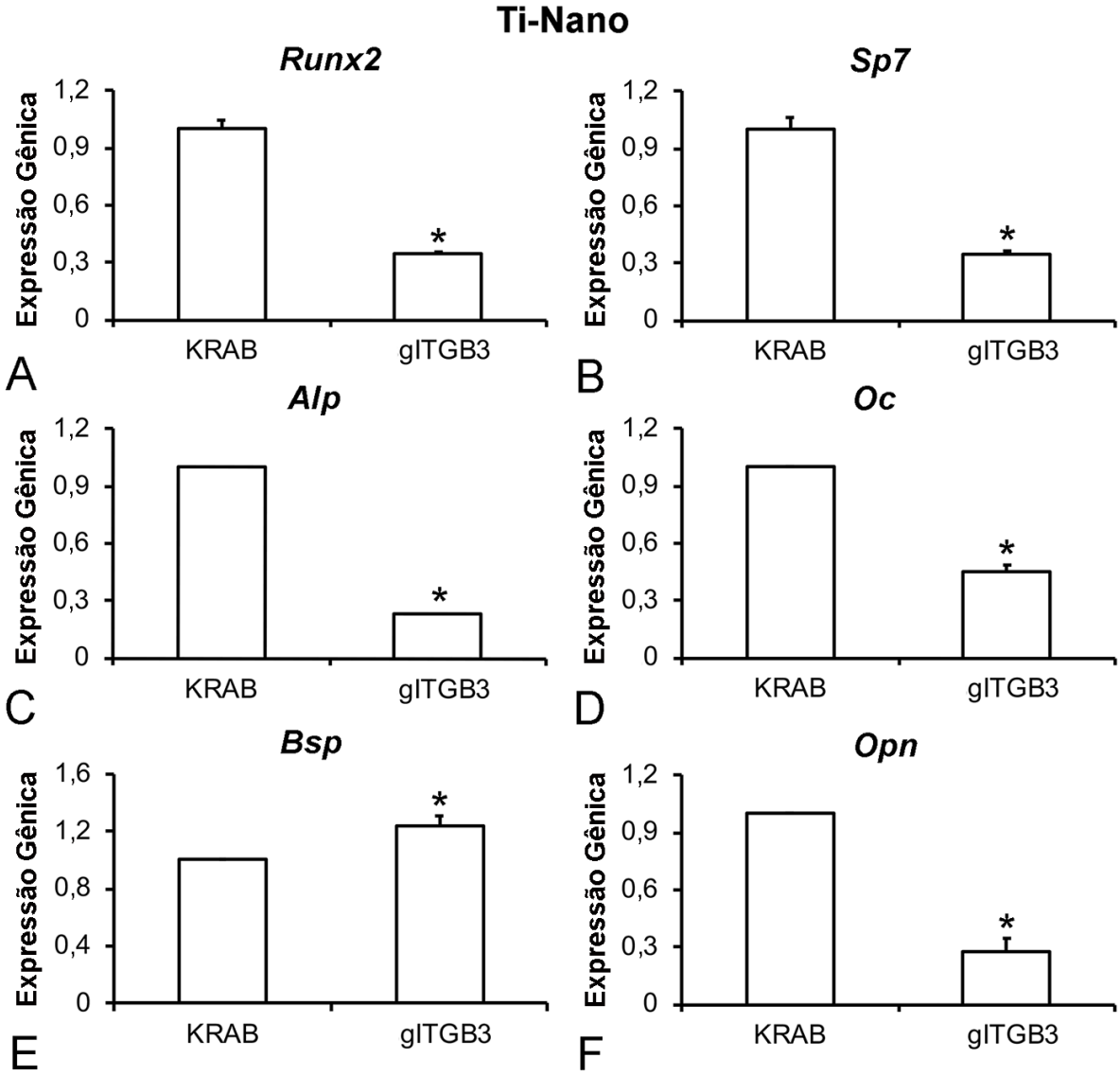

Figura 11. Efeito do silenciamento da integrina β3 sobre a expressão gênica de marcadores osteoblásticos em células crescidas sobre superfícies de titânio com nanotopografia (Ti-Nano). Expressão gênica de fator de transcrição relacionado ao runt (*Runx2*, A), osterix (*Sp7*, B), fosfatase alcalina (*Alp*, C), osteocalcina (*Oc*, D), sialoproteina óssea (*Bsp*, E) e osteopontina (*Opn*, F) aos 7 dias em células gITGB3-MC3T3-E1 (gITGB3) e KRAB-MC3T3-E1 (KRAB). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes (p≤0,05).

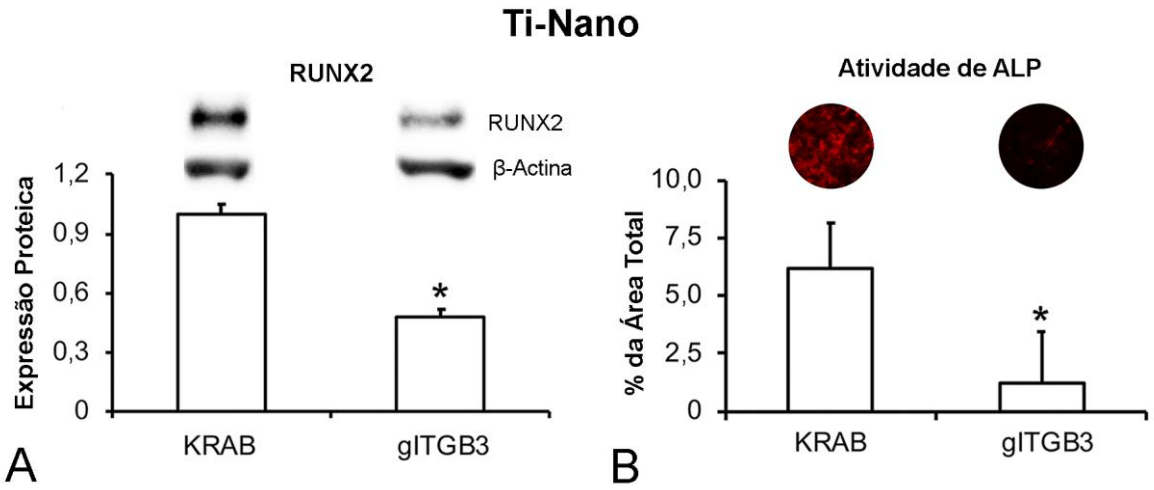

Figura 12. Efeito do silenciamento da integrina β3 sobre marcadores do fenótipo osteoblástico em células crescidas sobre superfícies de titânio com nanotopografia (Ti-Nano). Expressão proteica do fator de transcrição relacionado ao runt 2 (RUNX2) aos 7 dias (A) e atividade de fosfatase alcalina (ALP) *in situ* aos 10 dias (B) em células gITGB3-MC3T3-E1 (gITGB3) e KRAB-MC3T3-E1 (KRAB). Os dados da expressão proteica de RUNX2 (n=3) e da atividade de ALP (n=18) são apresentados como média ± desvio padrão e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

Sobre o Ti-Micro, a expressão gênica de *Runx2* (Figura 13A, p=0,013) e *Bsp* (Figura 13E, p=0,001) foi aumentada, enquanto a expressão gênica de *Sp7* (Figura 13B, p=0,001) e *Alp* (Figura 13C, p=0,044) foi reduzida após o silenciamento da integrina β3. Além disso, a expressão gênica de *Oc* (Figura 13D, p=0,200) e *Opn* (Figura 13F, p=0,116) não foi afetada pelo silenciamento da integrina β3.

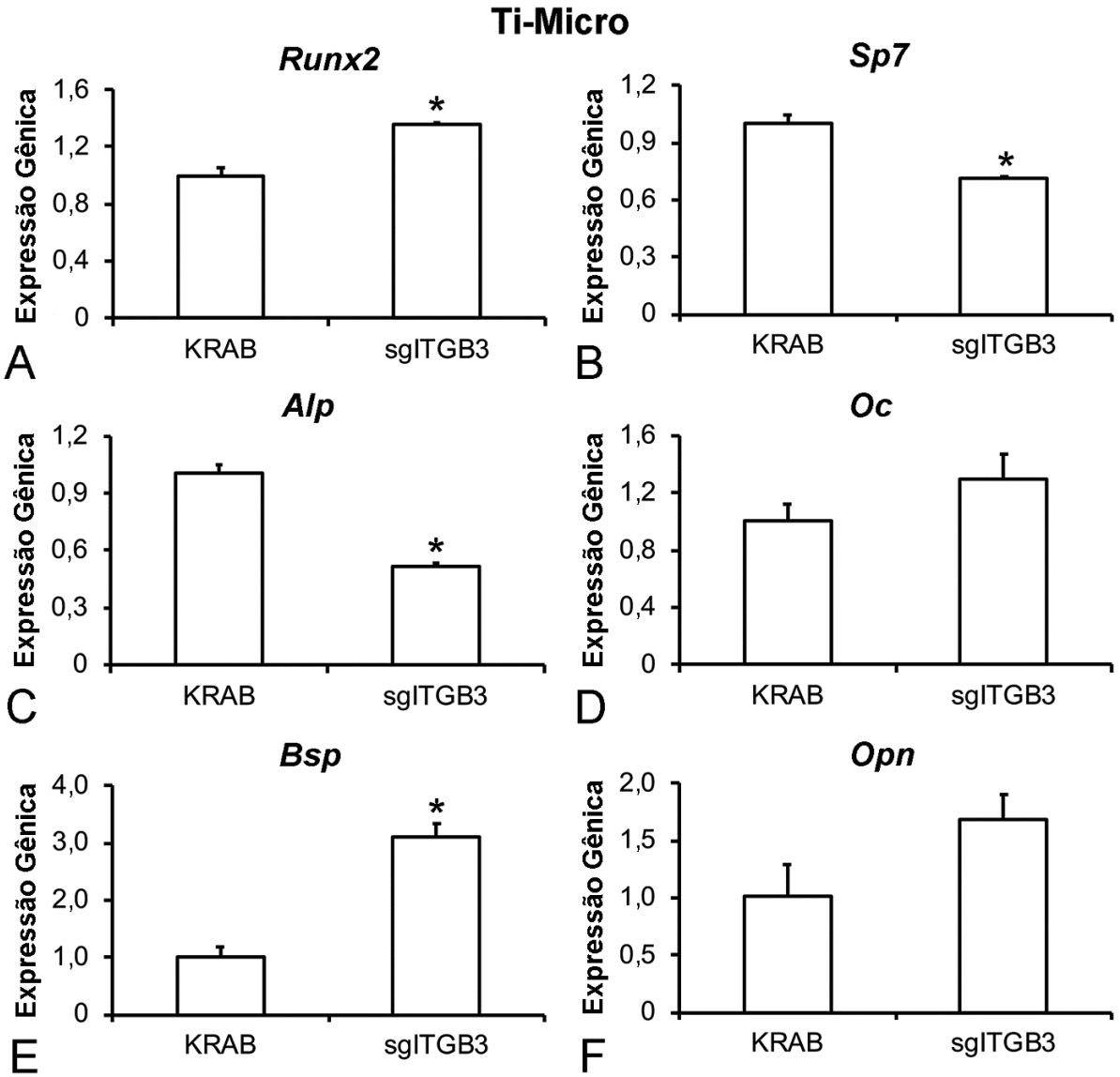

Figura 13. Efeito do silenciamento da integrina β3 sobre a expressão gênica de marcadores osteoblásticos em células crescidas sobre superfícies de titânio com microtopografia (Ti-Micro). Expressão gênica de fator de transcrição relacionado ao runt (*Runx2*, A), osterix (*Sp7*, B), fosfatase alcalina (*Alp*, C), osteocalcina (*Oc*, D), sialoproteina óssea (*Bsp*, E) e osteopontina (*Opn*, F) aos 7 dias em células gITGB3-MC3T3-E1 (gITGB3) e KRAB-MC3T3-E1 (KRAB). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

O silenciamento da integrina β3 não afetou a expressão proteica de RUNX2 (Figura 14A, p=0,730), entretanto, reduziu em 60% a atividade de ALP *in situ* (Figura 14B, p=0,001).

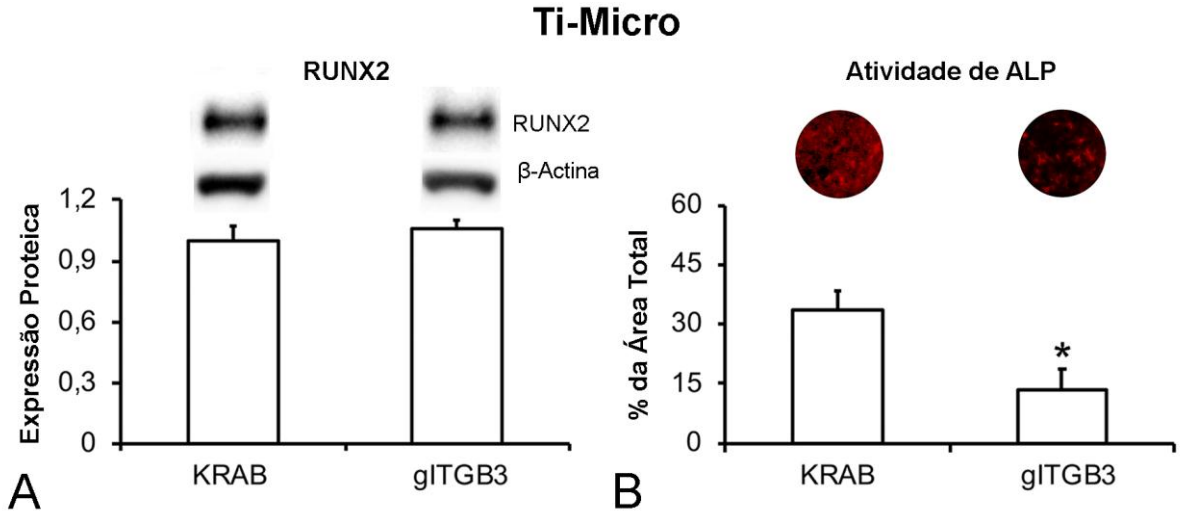

Figura 14. Efeito do silenciamento da integrina β3 sobre marcadores do fenótipo osteoblástico em células crescidas sobre superfícies de titânio com microtopografia (Ti-Micro). Expressão proteica do fator de transcrição relacionado ao runt 2 (RUNX2) aos 7 dias (A) e atividade de fosfatase alcalina (ALP) *in situ* aos 10 dias (B) em células gITGB3-MC3T3-E1 (gITGB3) e KRAB-MC3T3-E1 (KRAB). Os dados da expressão proteica de RUNX2 (n=3) e da atividade de ALP (n=18) são apresentados como média ± desvio padrão e o asterisco indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05).

3.3.4 Efeito do silenciamento da integrina β3 na expressão gênica da integrina αV de osteoblastos crescidos sobre o Ti com nano e microtopografia

Como o heterodímero integrina αVβ3 é relevante no processo de diferenciação osteoblástica (SCHNEIDER et al., 2001; SU et al., 2010), nós avaliamos o impacto do silenciamento da integrina β3 na expressão gênica de integrina αV de osteoblastos crescidos sobre Ti-Nano e Ti-Micro. Como esperado, o silenciamento da integrina β3 reduziu a expressão gênica da integrina β3 sobre a Ti-Nano (Figura 15A, p=0,001) e sobre a Ti-Micro (Figura 15C, p=0,026). Além disso, o silenciamento da integrina β3 inibiu a expressão gênica de integrina αV (Figura 15B, p=0,008) sobre Ti-Nano, mas não sobre Ti-Micro (Figura 15D, p=0,293).

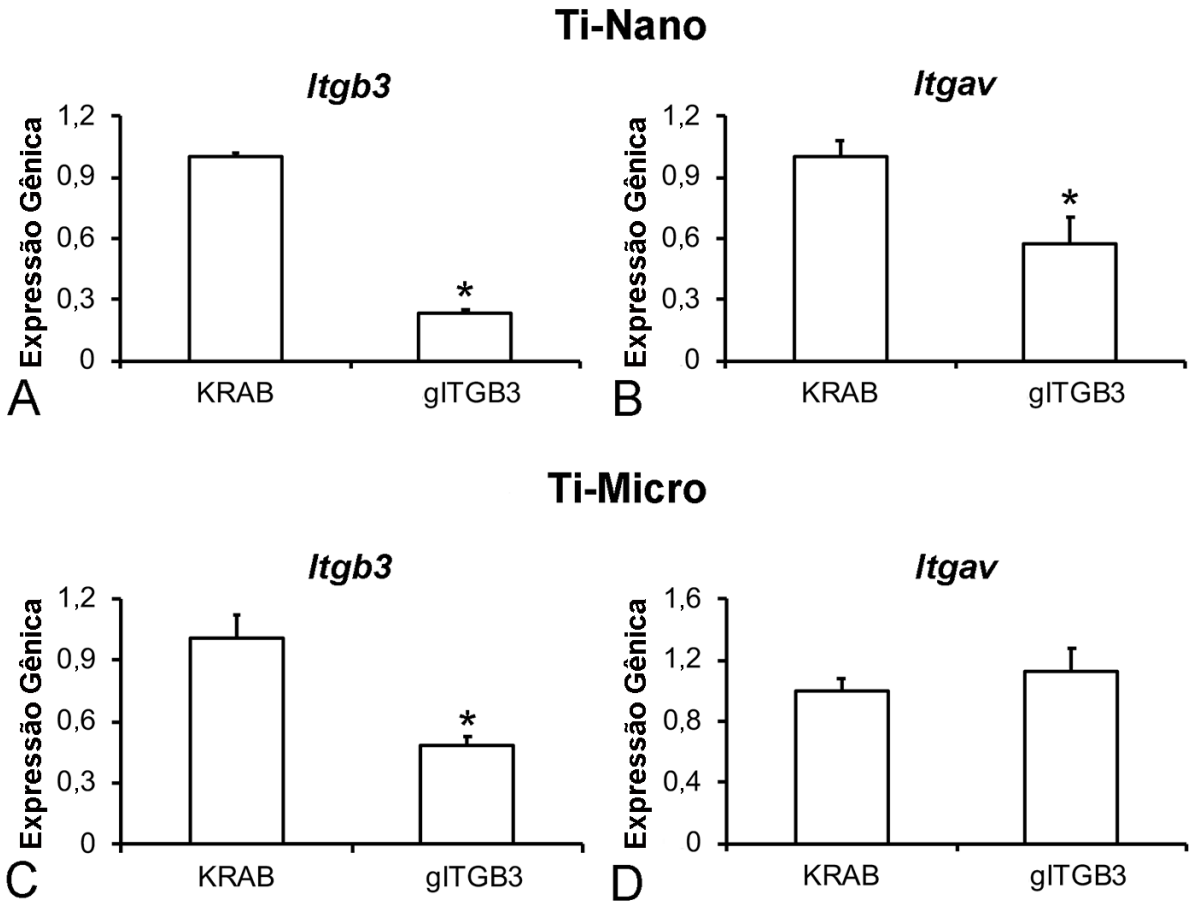

Figura 15. Efeito do silenciamento da integrina β3 sobre a expressão gênica da integrina αV (*Itgav*) em células crescidas sobre superfícies de titânio com nanotopografia (Ti-Nano) ou microtopografia (Ti-Micro). Expressão gênica de integrina β3 (*Itgb3,* A e C) e integrina αV (*Itgav*, B e D) em células gITGB3-MC3T3-E1 (gITGB3) e KRAB-MC3T3-E1 (KRAB) aos 7 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes (p≤0,05).

3.3.5 Efeito do silenciamento da integrina β3 na expressão gênica dos componentes da via de sinalização Wnt e BMP de osteoblastos crescidos sobre o Ti com nano e microtopografia

Considerando a intercomunicação entre integrinas e as vias de sinalização de Wnt e BMP (LU et al., 2015; DEJAEGER et al., 2017), nós investigamos se o silenciamento da integrina β3 poderia afetar a expressão gênica de componentes da via de sinalização de Wnt e BMP em osteoblastos crescidos sobre Ti-Nano e Ti-Micro.

Para os componentes da via Wnt sobre a Ti-Nano, a expressão gênica de *Apc* (p=0,002), *Axin1* (p=0,007), *β-Catenina* (p=0,006), *Cke1* (p=0,002), *Fzd5* (p=0,020), *Gsk3b* (p=0,001) e *Pp2a* (p=0,022) foi diminuída após o silenciamento da *Itgb3* (Figura 16A), enquanto que, sobre a Ti-Micro, a expressão gênica de *Apc* (p=0,504), *Axin1* (p=0,505), *β-Catenina* (p=0,091), *Cke1* (p=0,828), *Fzd5* (p=0,572),

Gsk3b (p=0,465) e *Pp2a* (p=0,052) não foi afetada após o silenciamento da *Itgb3* (Figura 16B).

Resultados similares foram observados para os componentes da via BMP. Sobre a Ti-Nano, a expressão gênica de *Alk2* (p=0,004), *Bmpr1a* (p=0,006), *Bmpr2a* (p=0,001), Smad1 (p=0,004) e *Smad4* (p=0,027) foi diminuída após o silenciamento da *Itgb3* (Figura 16C). Entretanto, sobre a Ti-Micro, a expressão gênica de *Bmpr2a* (p=0,045) foi diminuída, enquanto a expressão gênica de *Alk2* (p=0,794), *Bmpr1a* (p=0,664), *Smad1* (p=0,623) e *Smad4* (p=0,261) não foi afetada pelo silenciamento da *Itgb3* (Figura 16D).

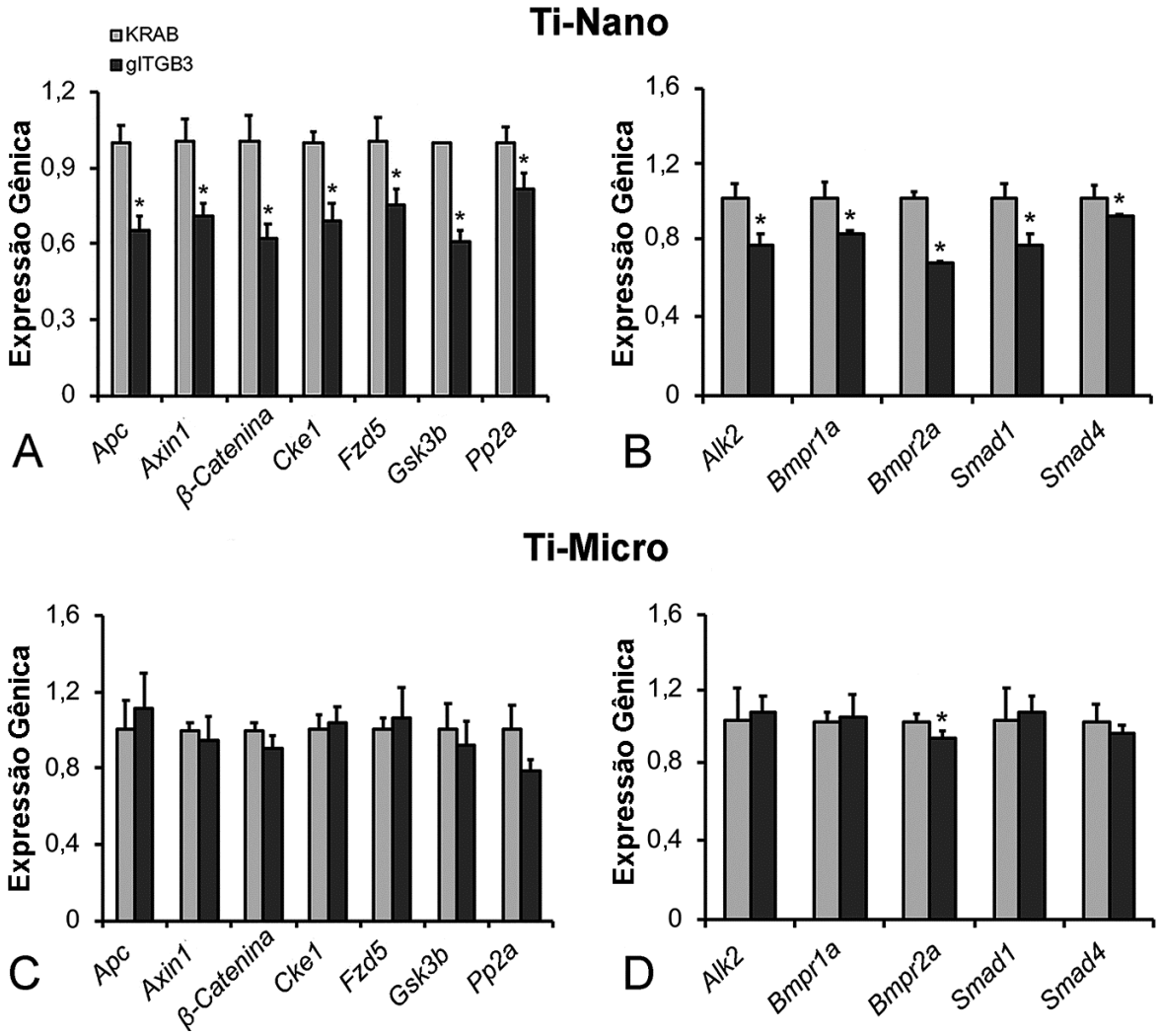

Figura 16. Efeito do silenciamento da integrina β3 sobre a expressão gênica de componentes das vias de sinalizações de Wnt e de BMP em células crescidas sobre superfícies de titânio com nanotopografia (Ti-Nano) ou microtopografia (Ti-Micro). Expressão gênica de polipose adenomatousa coli (*Apc*), *Axin1*, *β-Catenina*, *Cke1*, Frizzled 5 (*Fzd5*), glicogênio sintase quinase 3β (*Gsk3b*) e proteína fosfatase 2A (*Pp2a*) (A,C) e da quinase tipo receptor da ativina 2 (*Alk2*), receptor da proteína óssea morfogenética tipo 1A (*Bmpr1a*), receptor da proteína óssea morfogenética tipo 2A (*Bmpr2a*), *Smad1* e *Smad4* (B,D) aos 7 dias em células gITGB3-MC3T3-E1 (gITGB3) e KRAB-MC3T3-E1 (KRAB). Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n=3) e os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significantes (p≤0,05).

3.4 DISCUSSÃO

O Ti pode modular o comportamento de células e tecidos e modificações na topografia de superfície representam uma excelente estratégia para melhorar a osseointegração (KARAZISIS et al., 2017; CHAPPUIS et al., 2018; ZHOU et al., 2018). Neste estudo, demonstramos que a integrina β3 regula de diferentes maneiras a interação entre osteoblastos e superfície de Ti dependendo da topografia de superfície, com nano ou microtopografia (Figura 17A e B, respectivamente), com efeito mais pronunciado sobre a nanotopografia. Além disso, nossos resultados sugerem que o impacto do silenciamento da integrina β3 no potencial osteogênico da nanotopografia pode ser decorrente de uma intercomunicação entre as vias de sinalizações integrina/Wnt/BMP promovida por essa superfície de Ti.

A capacidade osteogênica torna a nanotopografia um modelo atraente para investigação das vias de sinalização desencadeadas por um microambiente osteogênico para impulsionar o processo de osseointegração (DE OLIVEIRA et al., 2007; SILVA et al., 2017; SOUZA et al., 2018). Neste contexto, nosso grupo de pesquisa já mostrou que esta superfície é capaz de regular vários componentes da maquinária celular, incluindo as integrinas, no processo de indução da diferenciação osteoblástica (KATO et al., 2014; ROSA et al., 2014; CASTRO-RAUCCI et al., 2016; SOUZA et al., 2018).

O papel da sinalização das integrinas na resposta de células ao Ti com diferentes topografias tem sido investigado, mostrando a participação de algumas integrinas na diferenciação osteoblástica induzida por essas superfícies (ROSA et al., 2014; OLIVARES-NAVARRETE et al., 2015; GUADARRAMA BELLO et al., 2017; KWON et al., 2018). Em um estudo prévio, nós demonstramos que a diferenciação osteoblástica de MSCs induzida pela nanotopografia foi drasticamente reduzida pelo bloqueio das integrinas α1β1 (ROSA et al., 2014). No presente estudo, observamos que a nanotopografia regulou positivamente a expressão das integrinas α10, α11, αL, αM e β3 comparada à microtopografia. Em geral, as integrinas α10, α11, αL e αM medeiam vários mecanismos envolvendo o contato célula-célula e célula-substrato em diferentes tipos celulares, incluindo leucócitos, fibroblastos e osteoblastos, mas até então sem evidências de participação na diferenciação osteoblástica (CORBI et al., 1988; PETER; O'TOOLE, 1995; ZHANG et al., 2002;

BARCZYK et al., 2009; ENGEL et al., 2013). Por outro lado, o envolvimento da integrina β3 na formação óssea e na homeostase tem sido demonstrado em vários estudos *in vitro* e modelos *in vivo* (VOISIN; MCNAMARA, 2015; SENS et al., 2017; MOON et al., 2018).

O silenciamento da integrina β3 diminuiu a atividade da ALP e a mineralização da matriz extracelular em culturas de células MC3T3-E1 (SENS et al., 2017). Em concordância com esses achados, aqui demonstramos que o silenciamento da integrina β3, através de uma nova ferramenta de edição gênica, o CRISPR/Cas9, inibiu a diferenciação osteoblástica de células crescidas sobre Ti com nanotopografia, como evidenciado pela redução da expressão gênica de vários marcadores ósseos, bem como da proteína RUNX2 e da atividade de ALP. Já em células crescidas sobre superfície com microtopografia, o efeito negativo do silenciamento da integrina β3 na diferenciação osteoblástica não foi tão evidente, uma vez que a expressão genotípica e fenotípica de marcadores osteoblásticos aumentou, reduziu ou não foi afetada pelo silenciamento da integrina β3. Juntos, esses achados sugerem que a via de sinalização desencadeada pela integrina β3 é relevante para o potencial osteogênico da nanotopografia, mas não na microtopografia. Nossa hipótese é suportada pela maior expressão de integrina β3 na superfície de Ti com nanotopografia e não influência de sua expressão sobre Ti com microtopografia, como também já descrito por outros autores (RAZ et al., 2004; ZHOU et al., 2014).

O complexo αVβ3 tem sido amplamente discutido e relacionado à diferenciação osteoblástica (SCHNEIDER et a., 2001; SU et al., 2010; DI BENEDETTO et al., 2015). Neste estudo, observamos que o silenciamento da integrina β3 resultou em uma concomitante diminuição da expressão gênica da integrina αV em células crescidas sobre Ti com nanotopografia, mas não sobre a microtopografia. Corroborando esses achados e a nossa observação do papel fundamental da integrina β3 no potencial osteogênico da nanotopografia, tem sido mostrado que o complexo das integrinas αVβ3 está mais expresso em células crescidas sobre superfícies nanoestruturadas (GITTENS et al., 2014).

As integrinas podem estabelecer uma rede de sinalização com as vias de Wnt e BMP para mediar a diferenciação osteoblástica (LU et al., 2015). A inibição da quinase ligada à integrina (integrin-linked kinase – *Ilk*), um componente da via das

integrinas, reduziu as vias Wnt/β-Catenina e BMP/Smad, o que resultou na redução da massa óssea trabecular *in vivo* e inibiu a produção de matriz colágena e a mineralização *in vitro* (DEJAEGER et al., 2017). Em trabalhos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa, vimos que o potencial osteogênico da nanotopografia está relacionado a uma modulação da via de sinalização de BMP e de algumas integrinas, como as α1 e β1; porém, a interação entre integrinas e outras vias de sinalização sobre essa superfície ainda não havia sido avaliada até o momento (ROSA et al., 2014; CASTRO-RAUCCI et al., 2015). A associação de nanomateriais com BMP-2 exógena aumenta a diferenciação osteoblástica por um mecanismo de ativação da integrina β1 e indução da via de sinalização Wnt-3a (LU et al., 2015). Aqui, nós observamos que o silenciamento da integrina β3 reduziu a expressão de vários genes que codificam proteínas envolvidos em ambas as vias de sinalização Wnt/β-Catenina e BMP/Smad em células crescidas apenas sobre o Ti com nanotopografia. Desta forma, é possível sugerir que o alto potencial osteogênico do Ti-Nano se dá, ao menos em parte, por sua capacidade de regular positivamente a expressão de integrina β3 e promover uma intercomunicação com as vias de sinalização de Wnt e de BMP a fim de criar um microambiente favorável que leve à diferenciação osteoblástica.

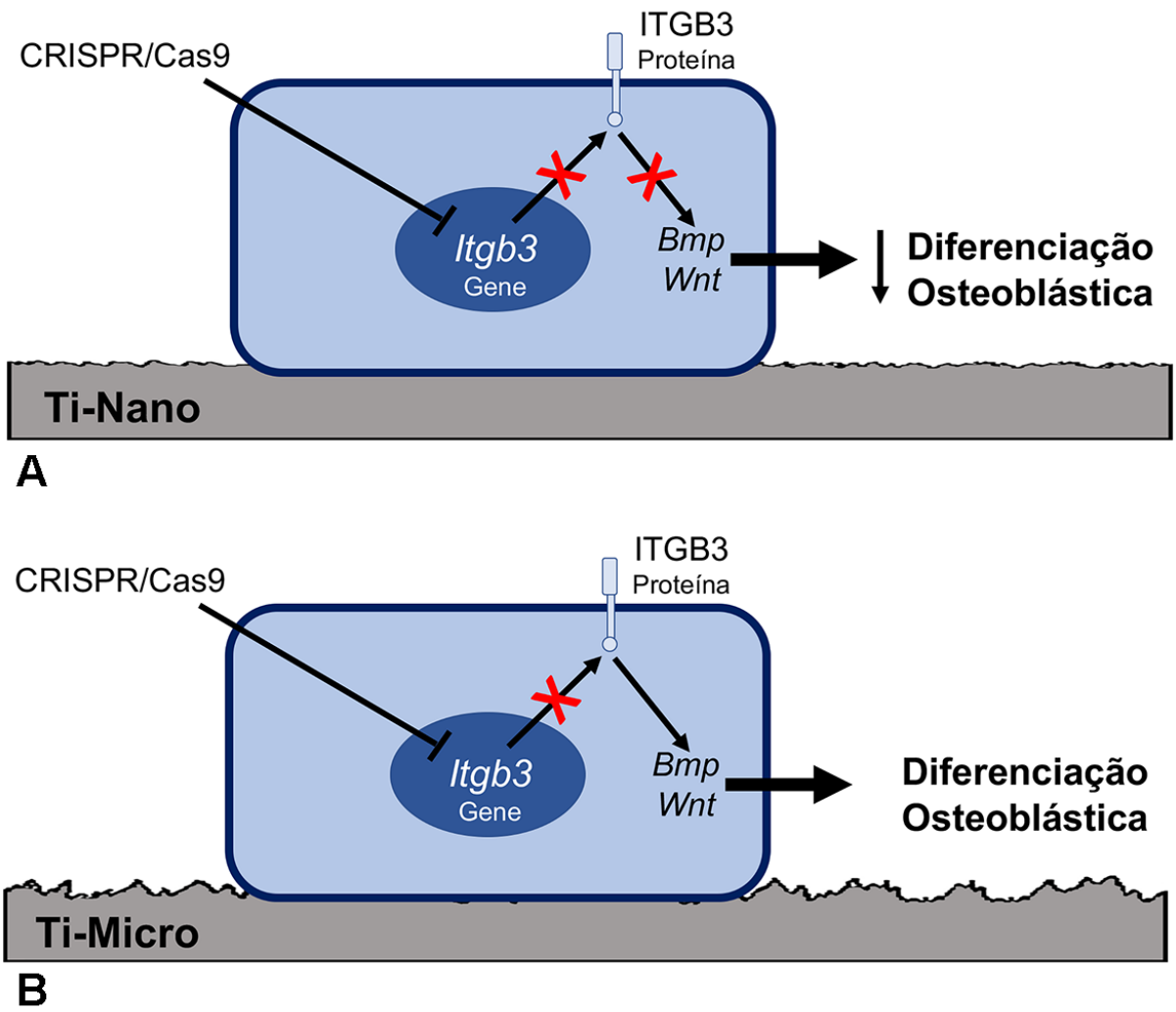

Figura 17. Representação esquemática da participação da integrina β3 (ITGB3) na diferenciação osteoblástica induzida pelo titânio com nanotopografia (Ti-Nano, A) e pelo titânio com microtopografia (Ti-Micro, B).

Conclusões

CONCLUSÕES

- Os tratamentos empregados foram eficientes para a produção de superfícies de Ti com topografias nas escalas nano e micrométrica.

- O maior potencial osteogênico do Ti com nanotopografia se deve, ao menos em parte, à integrina αV, uma vez que seu silenciamento reduziu a diferenciação osteoblástica induzida pela nanotopografia.

- A via de sinalização ativada pela integrina β3 exerce um papel fundamental no potencial osteogênico do Ti com nanotopografia, mas não do Ti com microtopografia. O silenciamento da integrina β3 reduziu a diferenciação osteoblástica, concomitantemente com a regulação negativa da expressão de vários componentes das vias de sinalização de Wnt e de BMP, apenas nas células crescidas sobre a nanotopografia.

- Nossos resultados revelam um novo mecanismo para explicar a maior diferenciação osteoblástica induzida pelo Ti com nanotopografia, que envolve uma complexa rede regulatória ativada pela maior expressão das integrinas αV e β3, esta última gerando ativação da transdução de sinal das vias de Wnt e de BMP. A exploração desse mecanismo abre novas possibilidades para o desenvolvimento de nanomateriais inteligentes capazes de modular vias de sinalizações específicas para controlar o processo de osseointegração.

Referências

REFERÊNCIAS

ALBREKTSSON T, JOHANSSON J (1991) Quantified bone tissue reactions to various metallic materials with reference to the so-called osseointegration concept. In: Davies JE, Albrektsson T, eds. The Bone Biomaterial Interface, II:357-363. Toronto: University of Toronto Press.

ALBREKTSSON T, WENNERBERG A (2004) Oral implant surfaces: Part 1 — Review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. Int J Prosthodont. 17:536-543

ANNUNZIATA M, OLIVA A, BUOSCIOLO A, GIORDANO M, GUIDA A, GUIDA L (2012) Bone marrow mesenchymal stem cell response to nano-structured oxidized and turned titanium surfaces. Clin Oral Implants Res. 23:733-740.

ANSELME K (2000) Osteoblast adhesion on biomaterials. Biomaterials. 21:667-681.

BARCZYK MM, OLSEN LH, DA FRANCA P, LOOS BG, MUSTAFA K, GULLBERG D, BOLSTAD AI (2009) A role for alpha11beta1 integrin in the human periodontal ligament. J Dent Res. 88:621-626.

BARRETT LW, FLETCHER S, WILTON SD (2012) Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. Cell Mol Life Sci. 69:3613-3634.

BELOTI MM, SICCHIERI LG, DE OLIVEIRA PT, ROSA AL (2012) The influence of osteoblast differentiation stage on bone formation in autogenously implanted cell-based PLGA/CaP constructs. Tissue Eng Part A 18:999-1005.

BERGLUNDH T, ABRAHAMSSON I, ALBOUY JP, LINDHE J (2007) Bone healing at implants with a fluoride-modified surface: an experimental study in dogs. Clin Oral Implants Res. 18:147-152.

BOSKEY AL (1995) Osteopontin and related phosphorylated sialoproteins: effects on mineralization. Ann N Y Acad Sci. 760:249-56.

BOSKEY AL, MARESCA M, ULLRICH W, DOTY SB, BUTLER WT, PRINCE CW (1993) Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin-gel. Bone Miner. 22:147-159.

BRACERAS I, DE MAETZU MA, ALAVA JI, GAY-ESCODA C (2009) In vivo low-density bone apposition on different implant surface materials. Intern J Oral Maxil Surg. 38:274-278.

BRAMA M, RHODES N, HUNT J, RICCI A, TEGHIL R, MIGLIACCIO S, ROCCA CD, LECCISOTTI S, LIOI A, SCANDURRA M, DE MARIA G, FERRO D, PU F, PANZINI G, POLITI L, SANDURRA R (2007) Effect of titanium carbide coating on the osseointegration response in vitro and in vivo. Biomaterials. 28:595-608.

BRUNNER M, MANDIER N, GAUTIER T, CHEVALIER G, RIBBA AS, GUARDIOLA P, BLOCK MR, BOUVARD D (2018) β1 integrins mediate the BMP2 dependent transcriptional control of osteoblast differentiation and osteogenesis. PLoS One. 13:e0196021.

CASTRO-RAUCCI LMS, FRANCISCHINI MS, TEIXEIRA LN, FERRAZ EP, LOPES HB, DE OLIVEIRA PT, HASSAN MQ, ROSA AL, BELOTI MM (2016) Titanium with nanotopography induces osteoblast differentiation by regulating endogenous bone morphogenetic protein expression and signaling pathway. J Cell Biochem. 117:1718-1726.

CHAPPUIS V, MAESTRE L, BÜRKI A, BARRÉ S, BUSER D, ZYSSET P, BOSSHARDT D (2018) Osseointegration of ultrafine-grained titanium with a hydrophilic nano-patterned surface: an in vivo examination in miniature pigs. Biomater Sci doi: 10.1039/c8bm00671g.

CHEN Q, LIU W, SINHA KM, YASUDA H, DE CROMBRUGGHE B (2013) Identification and characterization of microRNAs controlled by the osteoblast-specific transcription factor osterix. PLoS One. 8:e58104.

CORBI AL, KISHIMOTO TK, MILLER LJ, SPRINGER TA (1988) The human leukocyte adhesion glycoprotein Mac-1 (complement receptor type 3, CD11b) alpha subunit. Cloning, primary structure, and relation to the integrins, von Willebrand factor and factor B. J Biol Chem. 263:12403-12411.

COUTINHO MP & ELIAS CN (2009) Roughness and wettability of titanium for treated dental implant surface. Rev. Bras. Odontol. 66:234-238,

DAVIES JE, AJAMI E, MOINEDDIN R, MENDES VC (2013) The roles of different scale ranges of surface implant topography on the stability of the bone/implant interface, Biomaterials. 34:3535–3546.

DE OLIVEIRA PT, NANCI A (2004) Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. Biomaterials. 25:403-413.

DE OLIVEIRA PT, ZALZAL SF, BELOTI MM, ROSA AL, NANCI A (2007) Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. J Biomed Mater Res A. 80:554-564.

DEJAEGER M, BÖHM AM, DIRCKX N, DEVRIESE J, NEFYODOVA E, CARDOEN R, ST-ARNAUD R, TOURNOY J, LUYTEN FP, MAES C (2017) Integrin-linked kinase regulates bone formation by controlling cytoskeletal organization and modulating BMP and Wnt signaling in osteoprogenitors. J Bone Miner Res. 32:2087-2102.

DI BENEDETTO A, BRUNETTI G, POSA F, BALLINI A, GRASSI FR, COLAIANNI G, COLUCCI S, ROSSI E, CAVALCANTI-ADAM EA, LO MUZIO L, GRANO M, MORI G (2015) Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from dental bud: Role of integrins and cadherins. Stem Cell Res. 15:618-628.

EKHOLM E, HANKENSON KD, UUSITALO H, HILTUNEN A, GARDNER H, HEINO J, PENTTINEN R (2002) Diminished callus size and cartilage synthesis in alpha 1 beta 1 integrin-deficient mice during bone fracture healing. Am J Pathol. 160:1779-85.

ELIAS CN (2010) Titanium dental implant surfaces. Revista Matéria. 15:140-144.

ELIAS CN, GRAVINA PA, SILVA FILHO C, NASCENTE PA (2012) Preparation of bioactive titanium surfaces via fluoride and fibronectin retention. Inter J Biomat. 2012:290179.

ENGEL BE, WELSH E, EMMONS MF, SANTIAGO-CARDONA PG, CRESS WD (2013) Expression of integrin alpha 10 is transcriptionally activated by pRb in mouse osteoblasts and is downregulated in multiple solid tumors. Cell Death Dis. 4:e938.

FELGUEIRAS HP, EVANS MDM, MIGONNEY V (2015) Contribution of fibronectin and vitronectin to the adhesion and morphology of MC3T3-E1 osteoblastic cells to poly(NaSS) grafted Ti6Al4V. Acta Biomater. 28:225-233.

FERRAZ EP, SA JC, DE OLIVEIRA PT, ALVES C JR, BELOTI MM, ROSA AL (2014) The effect of plasma-nitrided titanium surfaces on osteoblastic cell adhesion, proliferation, and differentiation. J Biomed Mater Res A. 102:991-998.

FREITAS GP, LOPES HB, MARTINS-NETO EC, OLIVEIRA PT, BELOTI MM, ROSA AL (2016) Effect of surface nanotopography on bone response to titanium implant. J Oral Implant. 42:240-247.

GAMS B, KIM RH, SODEK J (1999) Bone sialoprotein. Crit Rev Oral Biol Med. 10:79-98.

GIANCOTTI FG, RUOSLAHTI E (1999) Integrin signaling. Science. 285:1028-1032.

GINER L, MERCADÉ M, S. TORRENT, M. PUNSET, R.A. PÉREZ, L.M. DELGADO, F.J. GIL (2018) Double acid etching treatment of dental implants for enhanced biological properties, J Appl Biomater Funct Mater. 16:83–89.

GITTENS RA, OLIVARES-NAVARRETE R, HYZY SL, SANDHAGE KH, SCHWARTZ Z, BOYAN BD (2014) Superposition of nanostructures on microrough titanium–aluminum–vanadium alloy surfaces results in an altered integrin expression profile in osteoblasts. Connec Tissue Res. 55:164-168.

GRONTHOS S, SIMMONS PJ, GRAVES SE, ROBEY PG (2001) Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. Bone. 28:174-181.

GUADARRAMA BELLO D, FOUILLEN A, BADIA A, NANCI A (2017) A nanoporous titanium surface promotes the maturation of focal adhesions and formation of filopodia with distinctive nanoscale protrusions by osteogenic cells. Acta Biomater. 60:339-349.

HE JY, ZHENG XF, JIANG SD, CHEN XD, JIANG LS (2013) Sympathetic neuron can promote osteoblast differentiation through BMP signaling pathway. Cell Signal. 25:1372-8.

HUNTER GK & GOLDBERG HA (1993) Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. Proc Natl Acad Sci USA. 90:8562-8567.

HYNES RO (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. Cell 48:549-554.

JENSEN ED, NAIR AK, WESTENDORF JJ (2007) Histone deacetylase co-repressor complex control of Runx2 and bone formation. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 17:187-196.

KARAZISIS D, PETRONIS S, AGHELI H, EMANUELSSON L, NORLINDH B, JOHANSSON A, RASMUSSON L, THOMSEN P, OMAR O (2017) The influence of controlled surface nanotopography on the early biological events of osseointegration. Acta Biomater doi: 10.1016/j.actbio.2017.02.026.

KATO RB, ROY B, DE OLIVEIRA FS, FERRAZ EP, DE OLIVEIRA PT, KEMPER AG, HASSAN MQ, ROSA AL, BELOTI MM (2014) Nanotopography directs mesenchymal stem cells to osteoblast lineage through regulation of microRNA-SMAD-BMP-2 circuit. J Cell Physiol. 229:1690-1696.

KLEINSTIVER BP, PATTANAYAK V, PREW MS, TSAI SQ, NGUYEN NT, ZHENG Z, JOUNG JK (2016) High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. Nature. 529:490-495.

KOMORI T (2010) Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. Cell Tissue Res. 339:189-195.

KRUEGER U, BERGAUERT, KAUFMANN B, WOLTER I, PILK S, HEIDER-FABIAN M, KIRCH S, ARTZ-OPPITZ C, ISSELHORST M, KONRAD J (2007) Insights into effective RNAi gained from large-scale siRNA validation screening. Oligonucleotides. 17:237-250.

KWON YS, PARK JW (2018) Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells modulated by a chemically modified super-hydrophilic titanium implant surface. J Biomater Appl 33:205-215

LAI CF & CHENG SL (2005) Alpha v beta integrins play an essential role in BMP-2 induction of osteoblast differentiation, J. Bone Miner. Res. 20:330-340.

LAU LF (2016) Cell surface receptors for CCN proteins. J Cell Commun Signal. 10:121–127.

LEDFORD H (2016) Riding the Crispr Wave. Nature News. 531:156-159.

LEE YM, YUN HM, LEE HY, LIM HC, LEE HH, KIM HW, KIM EC (2017) Xerogel Interfaced nanofibers stimulate bone regeneration through the activation of integrin and bone morphogenetic protein pathways. J Biomed Nanotechnol. 13:180-191.

LIAN JB, STEIN GS, JAVED A, VAN WAJ, STEIN JL, MONTECINO M, HASSAN MQ, GAUR T, LENGNER CJ, YOUNG DW (2006) Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. Rev Endocr Metab Disord. 7:1-16.

LIAN JB, STEIN GS, JAVED A, VAN WIJNEN AJ, STEIN JL, MONTECINO M, HASSAN MQ, GAUR T, LENGNER CJ, YOUNG DW (2006) Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. Rev Endocr Metab Disord. 7:1-16.

LIU Y, BEYER A, AEBERSOLD R (2016) On the dependency of cellular protein levels on mRNA abundance. Cell. 165:535–550.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 25:402-408.

LORD MS, FOSS M, BESENBACHER F (2010) Influence of nanoscale surface topography on protein adsorption and cellular response. Nano Today. 5:66-78.

LU Z, ROOHANI-ESFAHANI SI, LI J, ZREIQAT H (2015) Synergistic effect of nanomaterials and BMP-2 signalling in inducing osteogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Nanomedicine. 11:219-228.

LU Z, ZREIQAT H (2010) The osteoconductivity of biomaterials is regulated by bone morphogenetic protein 2 autocrine loop involving α2β1 integrin and mitogen-activated protein kinase/extracellular related kinase signaling pathways. Tissue Eng Part A. 16:3075-3084.

LUAN X, ITO Y, HOLLIDAY S, WALKER C, DANIEL J, GALANG TM, FUKUI T, YAMANE A, BEGOLE E, EVANS C, DIEKWISCH TG (2007) Extracellular matrix-mediated tissue remodeling following axial movement of teeth. J Histochem Cytochem. 55:127-140.

MEIRELLES L, MELIN L, PELTOLA T, KJELLIN P, KANGASNIEMI I, CURRIE F, ANDERSSON M, ALBREKTSSON T, WENNERBERG A (2008) Effect of hydroxyapatite and titania nanostructures on early in vivo bone response. Clin Implant Dent Relat Res. 10:245-254.

MEYER MB, BENKUSKY NA, SEN B, RUBIN J, PIKE JW (2016) Epigenetic plasticity drives adipogenic and osteogenic differentiation of marrow-derived mesenchymal stem Cells. J Biol Chem. 34:17829-17847

MILLAN JL (2013) The Role of Phosphatases in the Initiation of Skeletal Mineralization. Calcif Tissue Int. 93:299-306.

MIZUNO M, FUJISAWA R, KUBOKI Y (2000) Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen-alpha2beta1 integrin interaction. J Cell Physiol. 184:207-213.

MOON YJ, YUN CY, CHOI H, KIM JR, PARK BH, CHO ES (2018) Osterix regulates corticalization for longitudinal bone growth via integrin β3 expression. Exp Mol Med 50:80.

NAKASHIMA K, ZHOU X, KUNKEL G, ZHANG Z, DENG JM, BEHRINGER RR, DE CROMBRUGGHE B (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. Cell. 108:17-29.

NANCI A, WUEST JD, PERU L, BRUNET P, SHARMA V, ZALZAL S, MCKEE MD (1998) Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. J Biomed Mater Res. 40:324-335.

OLIVARES-NAVARRETE R, RAZ P, ZHAO G, CHEN J, WIELAND M, COCHRAN DL, CHAUDHRI RA, ORNOY A, BOYAN BD, SCHWARTZ Z (2008) Integrin alpha2beta1 plays a critical role in osteoblast response to micron-scale surface structure and surface energy of titanium substrates. Proc Natl Acad Sci USA. 105:15767-15772.

OLIVARES-NAVARRETE R, RODIL SE, HYZY SL, DUNN GR, ALMAGUER-FLORES A, SCHWARTZ Z, BOYAN BD (2015) Role of integrin subunits in mesenchymal stem cell differentiation and osteoblast maturation on graphitic carbon-coated microstructured surfaces. Biomaterials. 51:69-79.

OLIVEIRA DP, PALMIERI A, CARINCI F, BOLFARINI C (2015) Gene expression of human osteoblasts cells on chemically treated surfaces of Ti–6Al–4V–ELI. Mater Sci Eng C. 51:248–255.

PEREIRA, Tiago Campos (2016) Introdução à técnica de CRISPR. [S.l: s.n.].

PETER K, O'TOOLE TE (1995) Modulation of cell adhesion by changes in alpha L beta 2 (LFA-1, CD11a/CD18) cytoplasmic domain/cytoskeleton interaction. J Exp Med. 181:315-326.

RAZ P, LOHMANN CH, TURNER J, WANG L, POYTHRESS N, BLANCHARD C, BOYAN BD, SCHWARTZ Z (2004) 1alpha,25(OH)2D3 regulation of integrin expression is substrate dependent. J Biomed Mater Res A. 7:217-225.

REDMAN M, KING A, WATSON C, KING D (2016) What is CRISPR/Cas9? Archives of Disease in Childhood –Education and Practice 101:213-215.

RICHERT L, VETRONE F, YI J-H, ZALZAL SF, WUEST JD, ROSEI, NANCI A (2008) Surface nanopatterning to control cell growth. Adv Mater. 15:1-5.

ROSA AL, KATO RB, CASTRO RAUCCI LM, TEIXEIRA LN, DE OLIVEIRA FS, BELLESINI LS, DE OLIVEIRA PT, HASSAN MQ, BELOTI MM (2014) Nanotopography drives stem cell fate toward osteoblast differentiation through α1β1 integrin signaling pathway. J Cell Biochem. 115:540-548.

ROSEI F (2004) Nanostructured surfaces: challenges and frontiers in nanotechnology. J Physics: Condensed Matter. 16:1373-1436.

ROSEN V (2009) BMP2 signaling in bone development and repair. Cytokine Growth Factor Rev. 20:475-480.

RUPP FL, SCHEIDELER L, REHBEIN D, AXMANN D, GEIS-GERSTORFER J (2004) Roughness induced dynamic changes of wettability of acid etched titanium implant modifications. Biomaterials. 25:1429-1438.

SARANYA N, SARAVANAN S, MOORTHI A, RAMYAKRISHNA B, SELVAMURUGAN N (2011) Enhanced osteoblast adhesion on polymeric nano-scaffolds for bone tissue engineering. J Biomed Nanotechnol. 7:238-244.

SCHNEIDER GB, PERINPANAYAGAM H, CLEGG M, ZAHARIAS R, SEABOLD D, KELLER J, STANFORD C (2003) Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. J Dent Res. 82:372-378.

SCHNEIDER GB, WHITSON SW, COOPER LF (1999) Restricted and coordinated expression of beta3-integrin and bone sialoprotein during cultured osteoblast differentiation. Bone 24:321-7

SCHNEIDER GB, ZAHARIAS R, SEABOLD D, KELLER J, STANFORD C (2004) Differentiation of preosteoblasts is affected by implant surface microtopographies. J Biomed Mater Res A. 69:462-470.

SCHNEIDER GB, ZAHARIAS R, SEABOLD D, STANFORD C (2011) Integrin-associated tyrosine kinase FAK affects Cbfa1 expression. J Orthop Res. 29:1443-1447.

SCHNEIDER GB, ZAHARIAS R, STANFORD C (2001) Osteoblast integrin adhesion and signaling regulate mineralization. J Dent Res. 80:1540-4.

SENS C, HUCK K, PETTERA S, UEBEL S, WABNITZ G, MOSER M, NAKCHBANDI IA (2017) Fibronectins containing extradomain A or B enhance osteoblast differentiation via distinct integrins. J Biol Chem. 292:7745-7760.

SHEKARAN A, GARCÍA AJ (2011) Extracellular matrix-mimetic adhesive biomaterials for bone repair. J Biomed Mater Res A. 96:261-272.

SIEBERS MC, TER BRUGGE PJ, WALBOOMERS XF, JANSEN JA (2005) Integrins as linker proteins between osteoblasts and bone replacing materials. A critical review. Biomaterials. 26:137-146.

SILVA HF, ABUNA RPF, LOPES HB, FRANCISCHINI MS, DE OLIVEIRA PT, ROSA AL, BELOTI MM (2017) Participation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in osteoblast and adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells grown on titanium surfaces. Eur J Oral Sci. 125:355-360.

SOUZA ATP, BEZERRA BLS, OLIVEIRA FS, FREITAS GP, BIGHETTI TREVISAN RL, OLIVEIRA PT, ROSA AL, BELOTI MM (2018) Effect of bone morphogenetic protein 9 on osteoblast differentiation of cells grown on titanium with nanotopography. J Cell Biochem 2018 doi: 10.1002/jcb.27060.

STEIN GS, ZAIDI SK, STEIN JL, LIAN JB, VAN WIJNEN AJ, MONTECINO M, YOUNG DW, JAVED A, PRATAP J, CHOI JY, ALI SA, PANDE S, HASSAN MQ (2009) Transcription-factor-mediated epigenetic control of cell fate and lineage commitment. Biochem Cell Biol. 87:1-6.

STEVENS MM, GEORGE JH (2005) Exploring and engineering the cell surface interface. Science. 310:1135-1138.

SU JL, CHIOU J, TANG CH, ZHAO M, TSAI CH, CHEN PS, CHANG YW, CHIEN MH, PENG CY, HSIAO M, KUO ML, YEN ML (2010) CYR61 regulates BMP-2-dependent osteoblast differentiation through the {alpha}v{beta}3 integrin/integrin-linked kinase/ERK pathway. J Biol Chem. 285:31325-31336.

SUZUKI K, AOKI K, OHYA K (1997) Effects of surface roughness of titanium implants on bone remodeling. Bone. 21:507-514.

SVERZUT AT, DE ALBUQUERQUE GC, CRIPPA GE, CHIESA R, DELLA VALLE C, DE OLIVEIRA PT, BELOTI MM, ROSA AL (2012) Bone tissue, cellular, and molecular responses to titanium implants treated by anodic spark deposition. J Biomed Mater Res A. 100:3092-3098.

TAN J, SALTZMAN WM (2004) Biomaterials with hierarchically defined micro- and nanoscale structure. Biomaterials. 25:3593-3601.

THAKORE PI, D'IPPOLITO AM, SONG L, SAFI A, SHIVAKUMAR NK, KABADI AM, REDDY TE, CRAWFORD GE, GERSBACH CA (2015) Highly specific epigenome editing by CRISPR/Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. Nat Methods. 12:1143-9.

THEOCHARIS AD, SKANDALIS SS, GIALELI C, KARAMANOS NK (2016) Extracellular matrix structure. Advanced Drug Delivery Reviews. 97:4-27.

VARIOLA F, BRUNSKI JB, ORSINI G, TAMBASCO DE OLIVEIRA P, WAZEN R, NANCI A (2011) Nanoscale surface modifications of medically relevant metals: state-of-the art and perspectives. Nanoscale. 3:335-353.

VARIOLA F, YI JH, RICHERT L, WUEST JD, ROSEI F, NANCI A (2008) Tailoring the surface properties of Ti6Al4V by controlled chemical oxidation. Biomaterials. 29:1285-1298.

VOISIN M, MCNAMARA LM (2015) Differential β3 and β1 Integrin expression in bone marrow and cortical bone of estrogen deficient rats. Anat Rec (Hoboken). 298:1548-1559.

WANG B, SUN JY, QIAN S, LIU XY, ZHANG SL, DONG SJ, ZHA GC (2013) Adhesion of osteoblast-like cell on silicon-doped TiO2 film prepared by cathodic arc deposition. Biotechnol Lett. 35:975-982.

WANG K, BRUCE A, MEZAN R, KADIYALA A, WANG L, DAWSON J, YANG Y (2016). Nanotopographical Modulation of Cell Function through Nuclear Deformation. ACS Appl Mater Inter. 8: 5082–5092.

WANG W, ZHAO L, WU K, MA Q, MEI S, CHU PK, WANG Q, ZHANG Y (2013) The role of integrin-linked kinase/β-catenin pathway in the enhanced MG63 differentiation by micro/nano-textured topography. Biomaterials. 34:631-640.

WANG X, SCHWARTZ Z, GITTENS RA, CHENG A, OLIVARES-NAVARRETE R, CHEN H, BOYAN BD (2015) Role of integrin α2 β1 in mediating osteoblastic differentiation on three-dimensional titanium scaffolds with submicron-scale texture. J Biomed Mater Res A. 103:1907-1918.

WAZEN RM, KURODA S, NISHIO C, SELLIN K, BRUNSKI JB, NANCI A (2013) Gene expression profiling and histomorphometric analyses of the early bone healing response around nanotextured implants. Nanomedicine. 8:1385-95

WIELAND M, TEXTOR M, CHEHROUDI B, BRUNETTE DM (2005) Synergistic interaction of topographic features in the production of bone-like nodules on Ti surfaces by rat osteoblasts. Biomaterials. 26:1119-1130.

XIAO G, WANG D, BENSON MD, KARSENTY G, FRANCESCHI RT (1998) Role of the alpha2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the Osf2 transcription factor. J Biol Chem. 273:32988-32994.

XIAO-JIE L, HUI-YING X, ZUN-PING K, JIN-LIAN C, LI-JUAN J (2015) CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. J Med Genet. 52:289-296.

YUAN X, KANG Y, ZUO J, XIE Y, MA L, REN X, YU Z (2018) Micro/nano hierarchical structured titanium treated by NH_4OH/H_2O_2 for enhancing cell response. PLoS ONE. 13:e0196366.

ZHANG WM, POPOVA SN, BERGMAN C, VELLING T, GULLBERG MK, GULLBERG D (2002) Analysis of the human integrin alpha11 gene (ITGA11) and its promoter. Matrix Biol. 21:513-523.

ZHOU J, HAN Y, LU S (2014) Direct role of interrod spacing in mediating cell adhesion on Sr-HA nanorod-patterned coatings. Int J Nanomedicine. 9:1243-1260.

ZHOU J, ZHAO L, LI B, HAN Y (2018) Nanorod diameter modulated osteogenic activity of hierarchical micropore/nanorod-patterned coatings via a Wnt/β-catenin pathway. Nanomedicine. 14:1719-1731.

ZIMMERMAN D, JIN F, LEBOY P, HARDY S, DAMSKY C (2000) Impaired bone formation in transgenic mice resulting from altered integrin function in osteoblasts. Dev Biol. 220:2-15.

ZINGER O, ANSELME K, DENZER A, HABERSETZER P, WIELAND M, JEANFILS J, HARDOUIN P, LANDOLT D (2004) Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. Biomaterials. 25:2695-2711.

Anexos

ANEXOS

Tabela Suplementar: Expressão dos genes relacionados à via de sinalização das integrinas regulados positivamente (≥1,9-vezes, p≤0,05) em células-tronco mesenquimais crescidas sobre Ti-Controle, Ti-Nano e Ti-Micro aos 3, 5 e 7 dias

	Diferença Relativa							
	Dia 3		Dia 5			Dia 7		
Gene	Micro	Nano	Controle	Micro	Nano	Controle	Micro	Nano
Actb	1	1	1	1	1	1	1	1
Integrinas								
Itga10		1,97			3,97			3,93
Itga11		2,02	2,00			4,03	1,98	1,98
Itga1				0,49		2,00	0,98	
Itga2b			0,49	0,49	0,49		0,49	
Itga2	4,03					0,50	0,33	0,50
Itga3			0,49		0,49		0,24	0,50
Itga4						2,39		2,38
Itga5			0,49	0,49	0,49		0,49	0,49
Itga6							0,41	0,49
Itga7	2,01	2,01		2,01	1,99	8,08	1,98	4,04
Itga8				0,49		1,98	0,48	
Itgal	0,50			0,24	0,49	4,01	0,24	4,02
Itgav	2,01	1,96	1,99					2,00
Itgax				0,49		3,94	0,48	1,96
Itgb1						2,01		0,98
Itgb2				0,4987			0,49	2,00
Itgb3		2,01				2,02		
Itgb4						1,99	1,97	1,98
Itgb5		2,02				2,01		2,01
Itgb6				1,99		4,00		3,98
Sinalização da quinase de ligação da integrina								
Akt1							0,49	
Akt3			2,00			1,99	1,98	1,98
Ilk							0,49	
Sinalização da quinase AKT/PI-3								
Pdpk1						2,00	1,98	2,00
Pip5k1c						1,99		1,99
Ctnnb1							0,49	
Gsk3β						2,00	1,99	2,00
Proteínas de regulação e do citoesqueleto								
Dst	2,01	2,01	1,99	2,01	1,99	4,01	1,99	4,00
Plec							0,49	
Tln1						2,02		
Tns2				1,99		2,01		2,00
Tns4	2,00					1,99	1,98	
Vasp					0,49	1,00	0,24	0,49
Vcl							0,50	0,49
Zyx							0,49	
Proteínas de ligação da actina								
Actn1			0,49	0,49	0,49	0,49	0,24	0,49
Actn3						3,01		
Flna			0,48	0,48	0,49		0,24	0,49
Flnb							0,49	
Diaph1	2,01							
Parva								0,99
Outros receptores da superfície celular								
Cav1								0,48
Cav2						2,00	1,99	1,98
Cav3	0,49		0,49	0,49	0,49	0,49	0,41	0,49

Continua

Sinalização da proteína G								
Arhgap5	1,99				1,98	4,02	3,95	3,95
Braf			1,99				1,95	1,97
Cdc42						2,01		0,98
Crk						2,01		
Fyn						2,00	0,98	2,00
Hras			0,49	0,49	0,49		0,49	0,49
Pak1	2,01					2,00		
Pak3		2,02	1,98	2,02	1,98	4,02	3,95	4,01
Pak4			0,49		0,49	0,49	0,24	0,50
Rac2				0,49		4,02		4,02
Rap1a						1,99	1,99	1,99
Rapgef1					0,49			
Rasgrf1						2,01	1,98	1,99
Rhoa				2,04		2,02	2,03	2,03
Rock1	2,00	0,97	1,96		1,99	1,97		3,99
Rock2	2,02		2,01			2,01	1,99	2,01
Shc1						2,00		0,98
Shc2		2,02		2,01		4,04	2,00	1,99
Sos1	2,03	2,01	1,99	2,00	2,00	4,04	4,01	4,04
Sos2						3,01	2,97	2,98
Sinalização das quinases de adesão focal								
Bcar1					0,49		0,49	0,49
Capn2		2,03	2,02			2,01		2,02
Prkca	2,02	2,01	2,01	2,01	2,01	2,01	1,98	2,00
Prkcb	0,50	2,01	2,00	0,50		8,08		8,07
Prkcg			3,99		1,99			3,96
Pten			1,99	2,01		4,03	4,00	4,02
Ptk2						2,00		2,01
Src								0,99
Outros genes								
Sost					0,12			
Bmp2	1,98							0,98
Bmp4	0,49	0,49	1,99	0,49		15,83	7,83	15,68
Dkk1	0,50	0,49	0,49		0,49	0,16	0,20	0,12
Mapk1								0,98
Mapk3						2,01	1,99	2,00

As integrinas selecionadas para o silenciamento estão salientadas em cinza. Os dados da expressão gênica relativa foram normalizados pelo grupo controle aos 3 dias (valor igual a 1) não apresentado na tabela.

ANEXO A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o Protocolo nº 2014.1.796.58.7 sobre a pesquisa intitulada **"Participação de integrinas na diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais induzida por superfícies de titânio com micro e nanotopografia",** sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcio Mateus Beloti, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, foi APROVADO em reunião da CEUA de 17/09/2014 (totalizando 15 animais).

We hereby certify that the protocol nº 2014.1.796.58.7 regarding the research entitled "**Role of Integrins on the Osteoblast Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Induced by Titanium Surfaces with Micro and Nanotopography"**, under the responsibility of Prof. Dr. Marcio Mateus Beloti, is in accordance with the Ethical principles in animal research adopted by the Animal Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, and was approved in 17/09/2014 (totalizing 15 animals).

Ribeirão Preto, 17 de setembro de 2014.

Profa. Dra. Andiara De Rossi Daldegan
Coordenadora da CEUA – FORP/USP

ANEXO B

Produção científica durante o Doutorado:

Artigos publicados em periódicos

SOUZA ATP, FREITAS GP, **LOPES HB**, FERRAZ EP, OLIVEIRA FS, BELOTI MM, ROSA AL (2018) Effect of cell therapy with allogeneic osteoblasts on bone repair of rat calvaria defects. Cytotherapy. Doi: 10.1016/j.jcyt.2018.06.010 [Epub ahead of print].

ABUNA RPF, OLIVEIRA FS, RAMOS JIR, **LOPES HB**, FREITAS GP, SOUZA ATP, BELOTI MM, ROSA AL (2018) Selection of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction studies in rat osteoblasts. J Cell Physiol. Doi: 10.1002/jcp.26886 [Epub ahead of print].

FREITAS GP, **LOPES HB**, ALMEIDA ALG, ABUNA RPF, GIMENES R, SOUZA LEB, COVAS DT, BELOTI MM, ROSA AL (2017) Potential of osteoblastic cells derived from bone marrow and adipose tissue associated with a polymer/ceramic composite to repair bone tissue. Calcif Tissue Int. 101:312-320.

SILVA HF, ABUNA RPF, **LOPES HB**, FRANCISCHINI MS, DE OLIVEIRA PT, ROSA AL, BELOTI MM (2017) Participation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in osteoblast and adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells grown on titanium surfaces. Eur J Oral Sci 125:355-360.

LOPES HB, FERRAZ EP, ALMEIDA ALG, FLORIO P, GIMENES R, ROSA AL, BELOTI MM (2016) Participation of microRNA-34a and RANKL on bone repair induced by poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate membrane. J Biomat Sci-Polym E 13: 1369-79.

FREITAS GP, **LOPES HB**, MARTINS-NETO EC, de OLIVEIRA PT, BELOTI MM, ROSA AL (2016) Effect of surface nanotopography on bone response to titanium implant. J Oral Implantol 42: 240-247.

CASTRO-RAUCCI LMS, FRANCISCHINI MN, TEIXEIRA LN, FERRAZ EP, **LOPES HB**, de OLIVEIRA PT, HASSAN MQ, ROSA AL, BELOTI MM (2016) Titanium With nanotopography induces osteoblast differentiation by regulating endogenous bone morphogenetic protein expression and signaling pathway. Journal of Cell Biochemistry 117: 1718–1726.

HEAIR HM, KEMPER AG, ROY B, **LOPES HB**, RASHID H, CLARKE JC, AFREEN LK, FERRAZ EP, KIM E, JAVED A, BELOTI MM, MACDOUGALL M, HASSAN M (2015) MicroRNA-665 Regulates dentinogenesis through microRNA-mediated silencing and epigenetic mechanisms. Mol Cell Biol 35:3116-30.

Artigos enviados para publicação

LOPES HB, FREITAS GP, ELIAS CN, TYE C, STEIN JL, LIAN JB, STEIN GS, ROSA AL, BELOTI MM (2018) Participation of integrin <beta>3 in osteoblast differentiation induced by titanium with nano or microtopography. Acta Biomaterialia.

FREITAS GP, **LOPES HB**, SOUZA ATP, OLIVEIRA PGFP, ALMEIDA ALG, COELHO PG, BELOTI MM, ROSA AL (2018) Cell Therapy: Effect of locally injected mesenchymal stem cells derived from bone marrow or adipose tissue on bone regeneration of rat calvaria defects. J Bone Miner Res.

Resumos publicados em anais de congressos

ROSA AL, FREITAS GP, **LOPES HB**, BELOTI MM (2018) Cell therapy strategy for enhancing bone repair. In: 10th World Congress and Expo on Cell & Stem Cell Research 2018, New York City. Journal of Cell Science & Therapy. New York City: Atem Cell Research 9:67-67.

FREITAS GP, **LOPES HB**, DE ALMEIDA AL, SOUZA GL, SIESSERE S, BELOTI MM, ROSA AL (2017) Cells and biomaterial for bone repair under osteoporotic conditions. In: Academy of Dental Materials Annual Meeting 2017, Nuremberg. Dental Materials 33:e34.

SOUZA ATP, FREITAS GP, **LOPES HB**, BELOTI MM, ROSA AL (2017) Terapia celular: formação óssea induzida por células-tronco mesenquimais ou osteoblastos. In: XXIV Congresso Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, 2017, São Paulo-SP. Journal of the Brazilian College of Oral and Maxillofacial Surgery. 3:297-297.

LOPES HB, FANTACINI DMC, PICANÇO-CASTRO V, COVAS DT, ELIAS CN, DE OLIVEIRA PT, ROSA AL, BELOTI MM (2017) Participation of ITGAV on osteoblast induction by titanium with nanotopography. In: Academy of Dental Materials Annual Meeting 2017, Nuremberg. Dental Materials 33:e48.

FRANCISCHINI MS, **LOPES HB**, SOUZA ATP, ELIAS CN, OLIVEIRA PT, ROSA AL, BELOTI MM (2017) Participação de quinases de adesão focal na interação entre células osteoblásticas e superfícies de titânio com diferentes topografias. In: 34th SBPqO Annual Meeting, 2017, Campinas-SP. Brazilian Oral Research. 31:122-122.

SOUZA ATP, **LOPES HB**, FREITAS GP, FERRAZ EP, FERNANDES RR, BELOTI MM, ROSA AL (2017) Avaliação do potencial osteogênico de células osteoblásticas provenientes de origens embrionárias distintas. In: 34a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas 2017, Campinas. Brazilian Oral Research 33:48-48.

LOPES HB, ELIAS CN, DE OLIVEIRA PT, ROSA AL, BELOTI MM (2016) Effect of titanium surface topography on integrin signaling pathway and osteoblast genotype expression. In: The American Society for Cell Biology Annual Meeting 2016, San Francisco. Molecular biology of the cell 27:419-419.

LOPES HB, FREITAS GP, FLORIO P, DE OLIVEIRA PT, ROSA AL, BELOTI MM (2016) Regulation of genes involved in the intern signaling pathway induced by titanium with nanotopography. In: 43rd Annual European Calcified Tissue Society Congress 2016, Rome. Bone Abstracts. Rome: Bioscientifica 5:142-142.

LOPES HB, FERRAZ EP, ALMEIDA AL, FLORIO P, GIMENES R, ROSA AL, BELOTI MM. Participation of microRNA-34a/RANKL in the osteogenic potential of the Poly(vinylidene - trifluorethylene)/barium titanate membrane. In: 43rd Annual European Calcified Tissue Society Congress 2016, Rome. Bone Abstracts. Rome: Bioscientifica 5:152-152.

ALMEIDA ALG, SOUZA ATP, FREITAS GP, **LOPES HB**, CROVACE M, PEITL-FILHO O, SOUSA LG, SIESSERE S, BELOTI MM, ROSA AL (2016) Bone formation in calvarial defects treated with mesenchymal stem cells or osteoblasts derived from adipose tissue: microtomographic analysis.. In: Cell Biology 2016 - ASCB Annual Meeting, 2016, San Francisco. Molecular Biology of the Cell. 27:B1483-B1483.

LOPES HB, FERRAZ EP, HASSAN MQ, ROSA AL, BELOTI MM (2015) Large-scale analysis of microRNA expression in newly formed bone in contact with poly(vinylidene-trifluorethylene)/barium titanate composite. In: XIV Brazil Material Research Society Meeting 2015, Rio de Janeiro. XIV Brazil Material Research Society Meeting 1:1900-1900.

CASTRO-RAUCCI LMS; FRANCISCHINI MS, TEIXEIRA LN, FERRAZ EP, **LOPES HB**, DE OLIVEIRA PT, HASSAN MQ, ROSA AL, BELOTI MM. Titanium with Nanotopography Induces Osteoblast Differentiation mediated by Endogenous BMP 2-4. 10th Word Biomaterial Congress, 2016, Montreal. Abstracts flip ebook, 2016:1.