UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA BÁSICA E ORAL

RODRIGO PAOLO FLORES ABUNÁ

Participação das Vias de Sinalização Wnt no Potencial Osteogênico de Superfície de Titânio com Nanotopografia

RIBEIRÃO PRETO
2019

RODRIGO PAOLO FLORES ABUNÁ

Participação das Vias de Sinalização Wnt no Potencial Osteogênico de Superfície de Titânio com Nanotopografia

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

Programa: Biologia Oral
Área de concentração: Biologia Oral
Orientador: Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti

RIBEIRÃO PRETO
2019

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

Flores Abuná, Rodrigo Paolo

Participação das Vias de Sinalização Wnt no Potencial Osteogênico de Superfície de Titânio com Nanotopografia. Ribeirão Preto, 2019.

107p.: il.; 30cm

A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa"

Tese (Doutorado) apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto / USP. Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral
Área de concentração: Biologia Oral.

Orientador: Beloti, Márcio Mateus

1.Beta-catenina 2. CRISPR 3. Nanotopografia 4. Osteoblasto
5. Titânio 6. Wnt.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ABUNA, RPF. **Participação das Vias de Sinalização Wnt no Potencial Osteogênico de Superfície de Titânio com Nanotopografia**

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

Programa: Biologia Oral
Área de concentração: Biologia Oral

Aprovada em ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____Assinatura: _____

Trabalho realizado nos Laboratórios de Cultura de Células, de Biologia Molecular, LAB 3D BIO da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e no Department of Bucomaxilofacial Surgery da University of Alabama at Birmingham - UAB, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) nas modalidades Bolsa de Doutorado (Processo nº 2016/14711-4) e Auxílio Regular à Pesquisa (Processo nº 2016/14171-0). Este trabalho também foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) Código de Financiamento 001. E com Auxílio do Programa de Doutorado-sanduíche no Exterior, CAPES PDSE (Processo nº 88881.133022/2016-01).

Dedicatoria

A mi mamita Julieta, la mejor del mundo.

Y a mi abuelita Victoria, que desde el cielo me guía.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Professor Dr. Márcio Mateus Beloti**, pela orientação, amizade e pela oportunidade de aprendizado que me proporcionou.

Ao, **Professor Dr. Adalberto Luiz Rosa** pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Aos Professores de programa de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto: **Paulo Tambasco de Oliveira, Karina Fittipaldi Bombonato Prado, Selma Sieresse, Simone Hallack Regalo,** pelos conhecimentos transmitidos.

Às professoras, **Emanuela Prado Ferraz**, **Larissa Castro**, pela amizade e carinho durante todos estes anos.

À professora**, Mamie Mizusaki Iyomasa** (*in memoriam*) pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Ao **Professor Dr. Quamurul Hassan** da Universidade de Alabama em Birmingham pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Às queridas funcionárias **Imaculada**, **Clelia** e **Mary** por estarem sempre dispostas a me ajudarem.

Aos funcionários e amigos **Roger** e **Adriana**, pela paciência e dedicação, as quais foram muito importantes para a realização desse trabalho.

À **Fabíola,** pela amizade, carinho e ajuda indispensável durante o doutorado.

À **Milla,** pela amizade, carinho e complicidade em momentos bons e difíceis durante estes anos.

Aos colegas e amigos de laboratório, **Gileade, Helena, Alann**, Rayana, Leonardo, Mayara, Priscila, Rafaella, Natacha, Gabriela, Paola, Denisse, Leticia, pela amizade e por muitas conversas compartilhadas.

Aos que foram e aos que são alunos de iniciação científica, pessoas espectaculares que fazem dos dias no laboratório mais divertidos, alunos que fazem possível o desenvolvimento de nossas primeiras habilidades docentes. E todos eles grandes amigos: Bruna, Thales, Jaqueline, Maria Paula, Giovanna, Ana Carolina, Pedro, William, Gustavo, Caroline, Isabela, Ivana, Gabriela, Sayuri, Marina, Julia, Barbara, Eurípides, Pedro, Marcelo, Leonardo, Gabrielli, Adriana, Ingrid, Sofia.

Aos alunos da Unaerp, Nadyne, Gabriela, Jackeline, Antonio, Thais e Julia pela amizade, e por demostrar entusiasmo, responsabilidade e dedicação, contribuindo ao bom funcionamento do laboratório.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo** pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro nas modalidades Bolsa de Doutorado (Processo nº 2016/14711-4) e Auxílio Regular à Pesquisa (Processo no 2016/14171-0) durante a realização desse projeto.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo apoio financeiro na durante os primeiros anos do Doutorado. Código de Financiamento 001.

À minha querida avó**, Victoria** (*in memoriam*) mulher forte e guerreira. Meu exemplo de sabedoria.

À minha mãe, **Lucia Julieta** e meu irmão **Gabriel,** pelo incentivo e carinho. Sem vocês tudo seria mais difícil.

Muito obrigado

RESUMO

ABUNA, RPF. **Participação das Vias de Sinalização Wnt no Potencial Osteogênico de Superfície de Titânio com Nanotopografia.** Tese (Doutorado). Ribeirão Preto. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2019. 107p.

A transdução do sinal Wnt é responsável pela organização estrutural durante a embriogênese, participando da estimulação mitogênica, diferenciação celular e homeostase de tecidos adultos, incluindo o tecido ósseo. É bem estabelecido que a superfície de titânio com nanotopografia (Ti-Nano) favorece a diferenciação osteoblástica por modular as vias de sinalização das integrinas e proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs). Porém, poucos estudos têm abordado a participação da via Wnt nos efeitos da topografia em nanoescala. Portanto, formulamos a hipótese de que a via de sinalização Wnt está, ao menos em parte, envolvida no maior potencial osteogênico da superfície de Ti-Nano. Para testar essa hipótese, utilizamos discos de Ti, que foram tratados com solução de H_2SO_4/H_2O_2 para produzir superfícies nanotopográficas, e discos sem tratamento (Ti-Usinado), sendo considerados como controle. Células da linhagem MC3T3-E1, subclone 14, foram cultivadas sobre ambos os discos para avaliar o efeito do Ti-Nano sobre a expressão de genes relacionados às vias de sinalização canônica Wnt/β-catenina e não canônica Wnt/Ca^{2+}. Com base nos resultados do PCR em tempo real, os genes mais intensamente modulados pela superfície de Ti-Nano, *Fzd4* relacionado à via Wnt/β-catenina e *Fzd6* relacionado à via Wnt/Ca^{2+}, foram selecionados e silenciados por CRISPR-dCas9-KRAB e CRISPR-Cas9, respectivamente. Então, foi investigado o efeito desses silenciamentos sobre o potencial osteogênico em células MC3T3-E1, cultivadas sobre Ti-Nano e Ti-Usinado. Os dados foram comparados pelo Teste *t* de Student ou pelo teste ANOVA one-way ($p \leq 0,05$). Os resultados deste estudo revelaram que: 1) o silenciamento do gene *Fzd4* inibe a expressão do genótipo e fenótipo osteoblástico de células MC3T3-E1, coincidindo com a modulação negativa de alvos da via Wnt/β-catenina aos 5 dias sobre superfície de Ti-Nano; 2) o silenciamento de *Fzd6* inibe a expressão do genótipo e fenótipo osteoblástico de células MC3T3-E1; no entanto, os alvos da via Wnt/Ca^{2+} não foram modulados, e observou-se expressão negativa da proteína β-catenina aos 3 dias de cultivo das células MC3T3-E1 sobre Ti-Nano. Estes resultados indicam que o maior potencial osteogênico da nanotopografia deve-se, ao menos em parte, à ativação da via de sinalização Wnt/β-catenina, uma vez que o silenciamento dos genes *Fdz4 e Fzd6* reduziu intensamente a diferenciação osteoblástica de células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti-Nano, comparado ao Ti-Usinado. Em conjunto, nossos resultados revelam um novo mecanismo que envolve a via Wnt/β-catenina para explicar o maior potencial osteogênico da superfície com nanotopografia aqui avaliada.

Palavras-chave: Beta-catenina, CRISPR, Nanotopografia, Osteoblasto, Titânio, Wnt.

ABSTRACT

ABUNA, RPF. **Participation of Wnt Signaling Pathway on Osteogenic Potential of Titanium Surfaces with Nanotopography.** Thesis (Doctor's Degree). Ribeirão Preto. School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2019. 107p.

The Wnt signal transduction is crucial for the structural organization during embryogenesis, participating in mitogenic stimulation, cell differentiation and homeostasis of adult tissues, including bone. It is well established that the titanium surface with nanotopography (Ti-Nano) favors the osteoblastic differentiation by modulating the signaling pathways of integrins and bone morphogenetic proteins (BMPs). However, few studies have addressed the participation of the Wnt pathway on the effects of nanoscale topographies. Therefore, we hypothesized that the Wnt signaling pathway is, at least in part, involved in the higher osteogenic potential of Ti-Nano. To test this hypothesis, we used Ti discs, which were treated with H_2SO_4/H_2O_2 solution to produce nanotopographic surfaces, and discs without treatment (Ti-Machined), being considered as control. Then, MC3T3-E1 cells, subclone 14, were cultured on both surfaces to evaluate the effect of Ti-Nano on the gene expression related to the canonical Wnt/β-catenin and non-canonical Wnt/Ca^{2+} signaling pathways. Based on the real-time PCR results, the most intensely modulated genes by Ti-Nano, the Wnt/β-catenin pathway-related *Fzd4* and Wnt/Ca^{2+} pathway-related *Fzd6*, were selected and silenced by CRISPR-dCas9-KRAB and CRISPR-Cas9, respectively. Then, we investigated the effect of the silencing on the osteogenic potential of Ti-Nano. Data were compared by Student's t-test or one-way ANOVA ($p \leq 0.05$). The results of this study revealed that: 1) *Fzd4* gene silencing inhibits the osteoblast genotype and phenotype expression of MC3T3-E1 cells, corresponding to the negative modulation of Wnt/β-catenin targets in cells grown on Ti-Nano surface on day 5; 2) *Fzd6* silencing inhibits the osteoblast genotype and phenotype expression of MC3T3-E1 cells; however, Wnt/Ca^{2+} pathway targets were not modulated, but negative expression of β-catenin protein was detected in cells grown on Ti-Nano on day 3. These results indicate that the higher osteogenic potential of Ti-Nano is, at least in part, due to the activation of the Wnt/β-catenin signaling pathway, since the silencing of the *Fdz4* and *Fzd6* gene significantly reduced the osteoblast differentiation of MC3T3-E1 cells grown on Ti-Nano, compared to Ti-Machined. Taken together, our results revealed a new mechanism involving the Wnt/β-catenin signaling pathway to explain the higher osteogenic potential of the evaluated nanotopography.

Key-words: Beta-catenin, CRISPR, Nanotopography, Osteoblast, Titanium, Wnt.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da via de sinalização Wnt: via Wnt/β-catenina inativada (a), via Wnt/β-catenina ativada (b), via de polaridade celular planar (c) e via dependente de Ca^{2+} (d). Figura modificada de: Van Amerongen et al., 2010; Lerner e Ohlsson, 2015..... **29**

Figura 2: Esquema do sistema CRISPR-Cas9: Edição gênica por CRISPR-Cas9 (a), repressão da transcrição por CRISPR-Cas9-KRAB (b). Figura modificada de: https://www.genengnews.com/uncategorized/a-power-up-for-unbiased-screening-with-crispr..... **35**

Figura 3: Caracterização das superfícies de Ti. Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução da superfície de Ti-Usinado (a) e Ti-Nano (b). Barra de escala = 100 nm..... **42**

Figura 4: Expressão gênica de genes relacionados a via Wnt. Agrupamento hierárquico Heatmap representando 20 genes da via Wnt diferencialmente expressos em células MC3T3-E1 crescidas sobre superfícies de Ti-Usinado e Ti-Nano aos 5 e 7 dias. O verde indica indução da expressão, o vermelho indica repressão e o preto ausência de modulação em relação ao grupo Ti-Usinado calibrado com valor de 1 (a). Expressão dos genes mais intensamente modulados pela superfície de Ti-Nano, o gene *Fzd4* (b) e gene *Fzd6* (c). Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significante entre Ti-Nano e Ti-Usinado dentro do mesmo período ($p \leq 0,05$)..... **43**

Figura 5: Esquema das vias de sinalização Wnt/β-catenina, (a) e Wnt/Ca^{2+} (b), considerando a expressão gênica de alvos de Wnt em células da linhagem MC3T3-E1 crescidas sobre superfícies de Ti-Nano aos 5 dias..... **44**

Figura 6: Vetor pHAGE EF1α dCas9-KRAB (Addgene #50919). É formado por uma sequência de 12,843 pares de base. Suas principais características são; a sequênica para expressão do domínio de repressão KRAB (Krüppel-associated box), o gene dCas9, o gene de resistência a puromicina (PuroR) e o gene de resistência à ampicilina (AmpR)..... **50**

Figura 7: Desenho do gRNA próximo ao TSS do gene *Fzd4 Mus musculus*..... **53**

Figura 8: Vetor pLK5.sgRNA.EFS.GFP (Addgene #57822). É formado por uma sequência de 7408 pares de base. Suas principais características são; a sequência para expressão do promotor EF1∝ que permite a expressão da proteína GFP, o gene de resistência à ampicilina (AmpR) e o sitio Bsmb1 para clonagem do gRNA..... **54**

Figura 9: Fluorescência GFP+ para seleção de células infectadas com gRNA *Fzd4*. gRNA1 (a-b), gRNA2 (c-d), gRNA3 (e-f) 48 horas após infecção. Barra de escala = 100nm..... **55**

Figura 10: Expressão constitutiva de dCas9-KRAB em células MC3T3-E1. DNA genômico (a) e expressão proteica (b) da dCas9 em células MC3T3-E1 e em MC3T3-E1-KRAB..... **59**

Figura 11: Eficiência do CRISPR-dCas9-KRAB para silenciar o gene *Fzd4.* Regulação negativa da expressão dos genes alvo da via Wnt, *Lef* e *Tcf* sobre poliestireno em células *gFzd4* aos 3 dias de cultura após a seleção GFP+ por citometria de fluxo. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05)..... **60**

Figura 12: Efeito do silenciamento do *Fzd4*, sobre a expressão gênica e proteica de RUNX2 em células *gFzd4* crescidas sobre de Ti-Nano e Ti-Usinado. Expressão gênica de *Runx2* aos 5 dias (a) e 7 dias (b) em células *gFzd4*. Expressão proteica de RUNX2 (c-d) aos 5 e 7 dias em células *gFzd4.* Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05)..... **61**

Figura 13: Efeito do silenciamento do *Fzd4*, sobre a expressão de marcadores osteoblásticos em células MC3T3-E1 crescidas sobre de Ti-Nano e Ti-Usinado. Expressão gênica de osterix *(Osx*), fosfatase alcalina *(Alp),* colágeno *(Col1a1),* sialoproteína óssea *(Bsp*) e osteopontina *(Opn*) de células *gFzd4* aos 5 dias. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05)..... **62**

Figura 14: Efeito do silenciamento do *Fzd4* sobre a expressão do fenótipo osteoblástico em células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti-Nano e Ti-Usinado. Atividade de fosfatase alcalina (ALP) *in situ* aos 10 dias de *gFzd4* (a-b). Epifluorescência de osteopontina (OPN) aos 5 dias de células *gFzd4*. Fluorescência vermelha indica imunolocalização de OPN (c-f). Os dados quantativos são apresentados com média ± desvio padrão (n=15) (p≤0,05). Letras diferentes em minúscula indicam diferença estatisticamente significante. Barra de escala = 100 µm..... **64**

Figura 15: Efeito do silenciamento do *Fzd4*, sobre a expressão do fenótipo osteoblástico em células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti-nano e Ti-Usinado. Marcação de matriz mineralizada com vermelho de alizarina aos 14 dias de *gFzd4* (a-f). Epifluorescência de sialoproteína óssea (BSP) aos 14 dias de células *gFzd4* (c-f). Fluorescência verde indica imunolocalização de BSP e fluorescência vermelha indica marcação com vermelho de alizarina (A-D). Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=5) (p≤0,05). Barra de escala = 400 μm..... **65**

Figura 16: Efeito do silenciamento do *Fzd4*, sobre alvos da via Wnt/β-catenina em células MC3T3-E1 crescidas sobre superfície de Ti-Nano. Expressão proteica de β-Catenina fosforilada em células crescidas sobre Ti-Nano comparadas ao Ti-Usinado (a-b). Expressão gênica de *Lef* e *Tcf,* alvos da via Wnt/β-catenina em células *Fzd4* silenciadas aos 5 dias (c-d). Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * e letras diferentes em minúscula indicam diferença estatisticamente significante (p≤0,05)..... **67**

Figura 17: Efeito do silenciamento do *Fzd4*, sobre a expressão de marcadores da via BMP em células MC3T3-E1 crescidas sobre superfície de Ti-nano. Expressão gênica de *Bmp4, Bmpr1, Bmpr2, Smad1, Smad4* (a-b) e *Chrd, Grem, Nogg, Smad6, Smad7, Smurf1 e Smurf2* (c-d) de células *gFzd4* aos 5 dias de cultura em meio osteogênico. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05)..... **69**

Figura 18: Efeito do silenciamento do *Fzd4*, sobre a expressão de genes da via das Integrinas em células MC3T3-E1 crescidas sobre superfície de Ti-nano. Expressão gênica de integrina-**β**1 (*Itg**β**1*), integrina ∝1 (*Itg∝1*), integrina ∝V (*Itg*∝V) e proteína tirosina quinase 2 (*Ptk2*) (a-b) de células *gFzd4* aos 5 dias de cultura em meio osteogênico. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * Indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05)..... **69**

Figura 19: Plasmídeo CRISPR-Cas9 para o gene *Fzd6* de *Mus musculus*. Plasmídeo all in one desenhado pela Sigma-Aldrich contendo um gRNA específico para o exon 3 do gene *Fzd6*. A sequência codificante de Cas9 ligada coma sequência condificante de GFP……. **76**

Figura 20: Desenho e confirmação da localização do gRNA no exon 3 do gene *Fzd6* de *Mus musculus* na plataforma online Benchling…… **76**

Figura 21: Separação (Sorting por citometria de fluxo) de células MC3T3-E1 transfectadas com o plasmídeo CRISPR-Cas9 específico para o exon 3 do gene Fzd6 e o plasmídeo CRISPR-Cas9 não específico. Apenas as células transfectadas são positivas para GFP+ indicando que o processo de transfecção foi bem sucedido……..... **81**

Figura 22: Estratégia de expansão monoclonal para análise de RNAm, proteína e estocagem dos clones selecionados..... **82**

Figura 23: Western blot evidenciando a diminuição da proteína FZD6 (∽79kDa) no clones mutantes 1, 10, 11, 14, 78, e sua ausência no clone mutante 41 e 90 comparado às células transfectadas con CRISPR-Cas9 não específico, que evidenciam uma marcação forte para os clones 21, 64, 74 e particularmente os clones 22 e 97..... **83**

Figura 24: Expressão gênica para validação da eficiência do sistema all in one CRISPR-Cas9-*gFzd6* para silenciar o gene *Fzd6*, em clones pré-selecionados pela expressão proteica. Expressão dos genes *Fzd6* (A), *Runx2* (B) e os genes alvo da via Wnt *Tcf* (C) e *Lef* (D) em células MC3T3-E1 selecionadas para expressão do CRISPR-Cas9-*gFzd6* e CRISPR-Cas9 não específico em clones crescidos em meio de crescimento até subconfluência. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante (p≤0,05). ……..... **84**

Figura 25: Heatmap representando 6 genes marcadores osteoblásticos expressos entre o clone Controle e o clone *gFzd6* crescidos em meio osteogênico em 3, 5 e 7 dias sobre superfície de Ti-Nano e Ti-Usinado. O verde indica indução da expressão, o vermelho indica repressão e o preto ausência de modulação em relação ao Controle que foi previamente calibrado com valor de 1..... **85**

Figura 26: Efeito do silenciamento do *Fzd6*, sobre a expressão de marcadores osteoblásticos em células crescidas sobre superfície de Ti-Nano comparadas ao Ti-Usinado. Expressão gênica de osterix (*Osx*), fosfatase alcalina (*Alp*), colágeno (*Col1a1*), sialoproteína óssea (*Bsp*) e osteopontina (*Opn*) de células mutadas *gFzd6* e células controle aos 3 dias (a, d, g, j, m), 5 dias (b, e, h, k, n) e 7 dias (c, f, i, l e o) de cultura em meio osteogênico. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05)..... **87**

Figura 27: Efeito do silenciamento do *Fzd6,* sobre a expressão gênica aos 3 dias (a), 5 dias (b) e 7 dias (c) e expressão proteica nos mesmos periódos (d-e) de RUNX2 em células crescidas sobre superfície de Ti-Nano comparadas ao Ti-Usinado aos 3, 5 e 7 dias de cultura em meio osteogênico. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05)..... **88**

Figura 28: Efeito do silenciamento do *Fzd6,* sobre a expressão do fenótipo osteoblástico em células crescidas sobre superfície de Ti-Nano comparadas ao Ti-Usinado. Mineralização aos 14 dias de cultura de células MC3T3_E1 com o vetor vazio e células MC3T3-E1 com o *gFzd6* em meio osteogênico. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=5) (p≤0,05). Letrasiferentes em minúscula indicam diferença estatisticamente significante. Barra de escala = 200 μm..... **89**

Figura 29: Efeito do silenciamento do *Fzd6*, sobre a expressão gênica aos 3 dias (A), 5 dias (B) e 7 dias (C) e expressão proteica nos mesmos periodos (D e E) de calmodulina dependente de Ca^{2+} proteína quinase II (*Camk2d*) e para o western blot a a calmodulina dependente de Ca^{2+} proteína quinase II fosforilada (CAMKII-p) em células crescidas sobre superfície de Ti-nano comparadas ao Ti-Usinado aos 3, 5 e 7 dias de cultura em meio osteogênico. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05)..... **90**

Figura 30: Efeito do silenciamento do *Fzd6*, sobre a expressão gênica de *Nfatc1* aos 3 dias (a), 5 dias (b) e 7 dias (c) em em células crescidas sobre superfície de Ti-nano comparadas ao Ti-Usinado. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05)..... **91**

Figura 31: Efeito do silenciamento do *Fzd6*, sobre a expressão gênica de *Ctnnb1* aos 3 dias (a), 5 dias (b) e 7 dias (c) e expressão proteica (d-e) de β-Catenina em células MC3T3-E1 crescidas sobre superfície de Ti-nano comparadas ao Ti-Usinado aos 3, 5 e 7 dias de cultura em meio osteogênico. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05)..... **92**

Figura 32: Efeito do silenciamento do *Fzd6*, sobre a expressão gênica de *Nlk* aos 3 dias (a), 5 dias (b) e 7 dias (c) em em células MC3T3-E1 crescidas sobre superfície de Ti-nano comparadas ao Ti-Usinado Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05)…….. **93**

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO..... 25
Via de sinalização Wnt..... 25
Histórico da via de sinalização Wnt..... 26
Sinalização Wnt canônica..... 27
Sinalização Wnt não canônica..... 28
Modificações topográficas nos implantes de Ti..... 29
Sinalização Wnt sobr implantes de Ti..... 31
Edição gênica por nucleases..... 32
Mecanismo do sistema CRISPR-Cas9..... 33
CRISPR-Cas9-KRAB..... 34

OBJETIVO GERAL..... 37

CAPÍTULO 1 – EFEITO DA SUPERFÍCIE DE TI-NANO SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS ÀS VIAS DE SINALIZAÇÃO WNT..... 39
1.1 OBJETIVO ESPECÍFICO..... 39
1.2 MATERIAL E MÉTODOS..... 39
1.2.1 Cultura de células da linhagem MC3T3-E1..... 39
1.2.2 Obtenção das amostras de Ti..... 39
1.2.3 Caracterização das superfícies de Ti..... 40
1.2.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real..... 40
1.2.5 Análise estatística..... 41
1.3 RESULTADOS..... 42
1.3.1 Caracterização da superfície de Ti-Nano..... 42
1.3.2 Efeito da superfície de Ti-Nano sobre a expressão de genes relacionados às vias de sinalização Wnt..... 43
1.3.3 Análise do efeito da superfície de Ti-Nano sobre a expressão de genes relacionados às vias de sinalização Wnt 44
1.4 DISCUSSÃO..... 45
1.5 CONCLUSÕES..... 48

CAPÍTULO 2 – EFEITO DO SILENCIAMENTO DO RECEPTOR FRIZZLED 4 (FZD4) SOBRE O POTENCIAL OSTEOGÊNICO DA SUPERFÍCIE DE TI-NANO..... 49
2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO..... 49
2.2 MATERIAL E MÉTODOS..... 49
2.2.1 Expressão constitutiva de dCas9-KRAB por células MC3T3-E1 49
2.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional..... 50
2.2.3 Detecção da expressão proteica por Western Blot..... 51
2.2.4 Construção do RNA guia (gRNA) 53
2.2.5 Transdução de MC3T3-E1-dCas9-KRAB com partículas lentivirais contendo gRNA *Fzd4*..... 53
2.2.6 Efeito do silenciamento de *Fzd4* em células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti-Usinado e Ti-Nano..... 55
2.2.7 Detecção de fosfatase alcalina (ALP) *in situ*..... 56
2.2.8 Formação de matriz mineralizada..... 56
2.2.9 Imunolocalização de OPN..... 57

2.2.10 Análise estatística..... 59
2.3 RESULTADOS..... 59
2.3.1 Expressão constitutiva de dCas9 em células MC3T3-E1-KRAB 59
2.3.2 Avaliação da eficácia do silenciamento de *Fzd4* em células MC3T3-E1..... 60
2.3.3 Efeito do silenciamento de *Fzd4* em células MC3T3-E1 sobre a expressão gênica e proteica de RUNX2..... 61
2.3.4 Efeito do silenciamento de *Fzd4* sobre o genótipo osteoblástico em células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti-Nano..... 62
2.3.5 Efeito do silenciamento de *Fzd4* sobre o fenótipo osteoblástico em células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti-Nano..... 63
2.3.6 Efeito do silenciamento de *Fzd4* sobre alvos da via Wnt/β-catenina em células MC3T3-E1 crescidas sobre superfície de Ti-Nano..... 66
2.3.7 Efeito do silenciamento de *Fzd4* na expressão gênica dos componentes da via de sinalização BMP e Integrinas de células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti-Nano..... 68
2.4 DISCUSSÃO..... 70
2.5 CONCLUSÃO..... 74

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO DO RECEPTOR FRIZZLED 6 (FZD6) SOBRE O POTENCIAL OSTEOGÊNICO DA SUPERFÍCIE DE TI-NANO..... 75
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 75
3.2 MATERIAL E MÉTODOS..... 75
3.2.1 Linhagem celular MC3T3-E1..... 75
3.2.2 Desenho do plasmídeo CRISPR-Cas9 específico para o gene *Fzd6* de *Mus musculus*..... 75
3.2.3 Preparação de bactérias competentes e transformação bacteriana..... 76
3.2.4 Transfecção de células MC3T3-E1 com o plasmídeo CRISPR-Cas9 e lipofectamina..... 77
3.2.5 Sorting de células únicas GFP positivas..... 77
3.2.6 Identificação de mutações geradas em clones MC3T3-E1 GFP positivos..... 77
3.2.7 Detecção de fosfatase alcalina (ALP) *in situ*..... 77
3.2.8 Formação de matriz mineralizada..... 77
3.2.9 Análise estatística..... 79
3.3 RESULTADOS..... 80
3.3.1 Separação de células MC3T3-E1 transfectadas com plasmídeo CRISPR-Cas9-GFP específico para o exon 3 do *Fzd6*..... 81
3.3.2 Amplificação de clones de MC3T3-E1 GFP+ em cultura..... 82
3.3.3 Efeitos das mutações geradas pelo sistema CRISPR-Cas9 sobre a expressão proteica de FZD6..... 83
3.3.4 Efeitos das mutações geradas pelo sistema CRISPR-Cas9 sobre a expressão de RNAm de *Fzd6*..... 84
3.3.5 Efeitos das mutações geradas pelo sistema CRISPR-Cas9 sobre a expressão de RNAm de *Fzd6* no genótipo osteoblástico de células MC3T3-E1 cultivadas sobre superfície de Ti-Nano e Ti-Usinado..... 85

3.3.6 *Efeito do silenciamento de Fzd6 sobre a expressão gênica e proteica de Runx2*..... 88
3.3.7 Avaliação do efeito do silenciamento do gene *Fzd6* sobre o fenótipo osteoblástico: Atividade de ALP *in situ* e mineralização 89
3.3.8 Efeito do silenciamento de *Fzd6* sobre a expressão gênica e proteica da calmodulina dependente de Ca^{2+} proteína quinase II fosforilada (CAMKII-p) 90
3.3.9 Efeito do silenciamento de *Fzd6* sobre a expressão gênica do fator nuclear de células T ativadas (*Nfatc1*)..... 91
3.3.10 Efeito do silenciamento de *Fzd6* sobre a expressão gênica e proteica de β-Catenina..... 92
3.3.11 Efeito do silenciamento de *Fzd6* sobre a expressão gênica da quinase nemo-like (*Nlk*) 93

3.4 DISCUSSÃO..... 94

3.5 CONCLUSÃO..... 98

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 99

INTRODUÇÃO

A resposta das células à topografia em nanoescala é uma forma fundamental de interação para o controle das funções celulares. Naturalmente, na matriz extracelular, existem superfícies com nanotopografia produzindo efeitos mecanotrandutores que influenciam processos como os de migração e polarização celular (BETTINGER et al., 2009). Esse fato foi extrapolado para a modificação da topografia de superfícies de implantes de titânio (Ti), sendo produzidas diversas superfícies em micro e nanoescala para melhorar a taxa de osseointegração (DE OLIVEIRA et al., 2007; MENDONÇA et al., 2008). As superfícies com nanotopografia produzem modificações na regulação da adsorção de proteínas e adesões focais celulares alterando as vias de sinalização intracelulares e, consequentemente, influenciando o fenótipo e resposta biológica aos implantes (SCHARTWZ et al., 2001; De OLIVEIRA et al., 2007; OLIVARES-NAVARRETE et al., 2015). Essa resposta biológica está intimamente relacionada à capacidade de regulação das vias de sinalização da osteogênese, destacando-se a via de sinalização Wnt (Wnt, do inglês: wingless-related integration site) (BENNETT et al., 2005; GAUR et al., 2005; TAMURA et al., 2010; LERNER E OHLSSON, 2015). Entretanto, embora seja um fato que as superfícies de Ti com nanotopografia (Ti-Nano) favorecem a diferenciação osteoblástica, poucos estudos têm demonstrado a participação da via Wnt sobre os efeitos da topografia em nanoescala (WANG W et al., 2012; BOYAN et al., 2018).

Via de sinalização Wnt

As proteínas WNT são essencialmente responsáveis pela organização estrutural, durante a embriogênese, de todos os organismos no reino animal (CLEVERS e NUSSE, 2012). Além disso, a via de sinalização Wnt participa da homeostase de tecidos adultos, afetando a estimulação mitogênica, o comprometimento e a diferenciação celular, sendo, dessa forma, considerada pleiotrópica (LOGAN e NUSSE, 2004). A interação específica entre ligantes, receptores, correceptores e inibidores de Wnt regula a homeostase da massa óssea, estimulando sua formação e regulando sua reabsorção por meio da ativação da via canônica ou das vias não canônicas de Wnt (LERNER e OHLSSON, 2015).

Histórico da via de sinalização Wnt

Em 1976, foi descrita uma mutação no gene *Wingless* que resultou na perda de asas em *Drosophila melanogaster* (SHARMA et al., 1976). Alguns anos depois, em 1980, Nusslein-Volhard e Wieschaus encontraram vários genes importantes envolvidos na padronização dos parassegmentos ao longo do eixo anteroposterior de *Drosophila*, denominados genes de polaridade segmentar, sendo o mais conhecido deles o *Hedgehog*, além do *Wingless* (NUSSLEIN-VOLHARD e WIESCHAUS, 1980).

Em 1930, algumas linhagens de camundongos foram descritas como altamente susceptíveis ao desenvolvimento de câncer de mama e, pensava-se que por meio do leite, transferiam a doença para suas proles (BITTNER, KORTEWEG, 1936). Alguns anos depois, em 1962, descobriu-se que a “transmissão” ocorria em decorrência de um retrovírus denominado MMTV (MMTV, do inglês: mouse mammalian tumour virus) (LYONS, 1962). Vinte anos depois, Nusse e Varmus mostraram que o MMTV infectava com seu RNA o genoma de células mamárias que lentamente eram transformadas em células malignas e, posteriormente, as células infectadas expressavam RNA mensageiro não encontrado no tecido das glândulas mamárias normais, o que sugeriu que o vírus produzia crescimento tumorigênico pela ativação de determinados genes. Assim, um desses proto-oncogenes foi denominado *Int1* (*Int1*, do inglês: first common integration site) (NUSSE e VARMUS, 1982). No entanto, esse gene era fundamentalmente diferente dos proto-oncogenes conhecidos na época. O gene *Int1* possuía uma sequência indicativa de que a proteína INT1 produzida poderia ser um fator de crescimento extracelular, porém nenhuma tentativa de purificação dessa proteína mostrou-se eficaz. Anos depois, foram identificadas sequências relacionadas com o *Int1* no genoma de *Drosophila melanogaster* e, em 1987, Ritsewijk e colaboradores clonaram o homólogo de *Drosophila Int1* e descobriram que ele era idêntico ao *Wingless* (RIJSEWIJK et al., 1987), revelando assim que o mesmo gene estava envolvido no desenvolvimento embrionário e no câncer. Em 1991, foi estabelecido que os genes pertencentes à família *Int1/Wingless* fossem denominados Wnt (Wingless-related integration site) (NUSSE e VARMUS, 1992).

Sinalização Wnt canônica

Após as descobertas iniciais do gene *Wnt1* e seu correspondente receptor de membrana, os mecanismos de sinalização intracelulares subsequentes foram amplamente estudados e considerados incomumente complexos, embora os componentes principais sejam relativamente simples (MAC DONALD e TAMAI, 2009; CLEVERS e NUSSE, 2012). Três vias de sinalização Wnt foram caracterizadas: (1) a via canônica (Wnt/β-catenina), (2) a via não canônica Wnt/Ca^{2+} e (3) a via não canônica de polaridade celular planar, sendo as duas primeiras envolvidas na diferenciação e maturação osteoblástica e formação óssea, segundo achados de estudos *in vitro* e com modelos de animais knockout (YOSHIKAWA et al., 1997; YAMAGUCHI et al., 1999; GRIGORYAN et al., 2008; TAMURA et al., 2010). A via mais conhecida é a via Wnt/β-catenina cujos componentes consistem em um complexo heterotrimérico composto pelo ligante WNT, o correceptor de passagem única de transmembrana LRP (LRP, do inglês: low-density lipoprotein receptor protein) e os receptores de sinalização transmembrana Frizzled (FZD). Sua ativação ocorre pela interação de um dos ligantes da classe WNT1 (WNT1, WNT3, WNT3a, WNT7a, WNT7b, WNT8a, WNT10b) com receptores FZD e o complexo LRP5/6, resultando na fosforilação de LRP e ativação da proteína Dishevelled (DSH). Quando isso ocorre, enormes signalossomas são formados (BILIC et al., 2007; GAMMONS et al., 2016; DeBRUINE et al., 2017; GERLACH et al., 2018), inibindo o complexo de destruição formado pelo produto do gene APC (APC, do inglês: adenomatous polyposis coli), AXIN, CK1 (CK1, do inglês: casein kinase 1) e glicogênio sintase quinase 3β (GSK3β) (BERATIK et al., 2011). Consequentemente, a enzima GSK3β é incapaz de fosforilar a β-Catenina, que fica acumulada no citoplasma e posteriormente é translocada para o núcleo, onde desloca o correpressor GROUCHO e interage com o fator de transcrição celular T/intensificador linfoide (TCF/LEF) para mediar diversos efeitos da via Wnt sobre a transcrição gênica (BEHRENS et al., 1996; KRISHNAN et al., 2006) (Figura 1b). Na ausência de WNT, a β-Catenina citoplasmática é ligada por AXIN e APC, fosforilada por GSK3β e CK1 e ubiquitinada pela β-TrCP (β-TrCP, do inglês: beta-transducin repeat-containing protein) da ligase E3 (BEHRENS et al., 1998; STAMOS e WEIS, 2013). Assim, sem o sinal de WNT, esse "complexo de destruição" garante que a β-Catenina recém-sintetizada seja continuamente eliminada pelo proteassoma (Figura 1a).

Sinalização Wnt não canônica

As vias não canônicas medeiam a sinalização WNT independente de LRP e β-Catenina. Devido ao fato de o DSH possuir múltiplos domínios que permitem sua ligação a várias proteínas, a interação DSH/FZDs pode iniciar diferentes cascatas de sinalização, como a via de polaridade celular planar (JENNY et al., 2010), na qual a ligação de WNT com FZD e o correceptor ROR2 ou Ryk, produzem o recrutamento de DSH para o FZD e sua associação com a proteína DAMM1 (DAMM1, do inglês: dishevelled-associated activator of morphogenesis 1). O DAMM1, então, ativa a proteína G Rho por meio da troca de guanina, seguido pela ativação de ROCK (ROCK, do inglês: Rho-associated protein kinase), um importante regulador do citoesqueleto. Alternativamente, o citoesqueleto pode ser regulado pela associação de DSH e pela proteína de sinalização G (RAC1) ativando fatores de transcrição quinase amino-terminal c-Jun (JNK) e o fator ativador de transcrição 2 (ATF2) (LERNER e OHLSSON, 2015) (Figura 1c).

Já a via não canônica Wnt/Ca^{2+} regula a liberação de Ca^{2+} a partir do retículo endoplasmático, controlando seus níveis intracelulares. Como nas demais vias Wnt, sua ativação ocorre após a ligação de uma proteína WNT (WNT5a/WNT11) ao receptor FZD que interage diretamente com a proteína DSH, ativando uma ampla matriz de efetores, incluindo a fosfolipase C (PLC) e a subsequente formação de trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). Em seguida, o IP3 liga-se ao seu receptor no retículo endoplasmático, liberando cálcio para o citosol e ativando enzimas sensíveis ao Ca^{2+}, como a calmodulina dependente de Ca^{2+} proteína quinase II (CAMKII), a proteína quinase C (PKC), calcineurina e, finalmente, o fator nuclear de células T ativadas (NFAT) envolvido nos processos de adesão e migração celular. Uma vez ativadas, essas proteínas desencadeiam cascatas de sinalização que modulam a expressão gênica (GALLI et al., 2011, 2012; LERNER e OHLSSON, 2015) (Figura 1d).

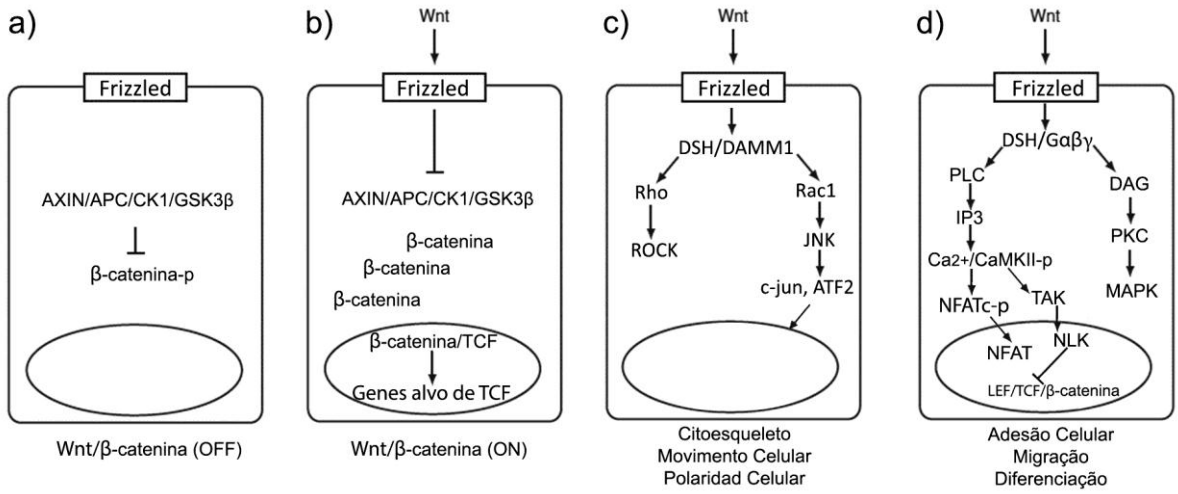

Figura 1. Esquema da via de sinalização Wnt: via Wnt/β-catenina inativada (a), via Wnt/β-catenina ativada (b), via de polaridade celular planar (c) e via dependente de Ca^{2+} (d). Figura modificada de: Van Amerongen et al., 2010; Lerner e Ohlsson, 2015.

Modificações topográficas nos implantes de Ti

O efeito da topografia de superfície sobre o comportamento celular foi evidenciado desde o início do século XX. Em 1911, Harrisson relatou sobre a migração de células embrionárias ao longo de filamentos com formato de teia de aranha. Muitos anos depois, Weiss (1945) demostrou que as células se alinhavam e migravam por fibras de vidro de 13 µm de espessura, denominando esse fenômeno como orientação por contato. Mais tarde, em 1964, Curtis e Varde mostraram que a orientação por contato é uma resposta direta das células à topografia. No início dos anos setenta, em experimentos *in vitro,* sulcos micrométricos foram introduzidos como uma alteração topográfica de superfície para melhorar a orientação celular de fibroblastos (ROVENSKY et al., 1971). Perto do final dos anos setenta, foi demonstrado que as placas de adesão focais reconheciam sulcos e picos nas modificações topográficas (OHARA e BUCK, 1979). Nos anos oitenta, vários grupos começaram a produzir microtexturas sobre substratos com alta precisão para o estudo do comportamento celular. Em 1986, Dunn e Brown demostraram que os fibroblastos se alinham a ranhuras de dimensões variando entre 1,65 e 8,96 µm e concluíram que a resposta celular depende da largura do rebordo e que o ângulo do sulco é um fator importante no espraiamento celular.

Os primeiros estudos clínicos considerando superfícies de implantes foram descritos a partir da década de 1960. Com estudos realizados por Branemark sobre a

microcirculação óssea, o Ti foi caracterizado como material capaz de sofrer osseointegração. Esse termo refere-se ao contato direto entre o tecido ósseo vivo e a superfície do metal (ALBREKTSSON et al., 1981). Porém, o conceito atual indica que a osseointegração é uma resposta de defesa em que o tecido ósseo forma uma interface para proteger o tecido ao redor do implante (ALBREKTSSON et al., 2017). A osseointegração é possível pelas excelentes propriedades mecânicas, resistência à corrosão e biocompatibilidade, o que tornou o Ti e suas ligas o material de escolha na confecção de implantes cirúrgicos, sejam ortopédicos ou dentários (KASEMO e LAUSMAA, 1988).

Nos anos seguintes à descoberta da osseointegração, alguns estudos foram realizados para avaliar o efeito de modificações na escala micrométrica sobre os implantes, revelando que as células se alinham ao longo dessas rugosidades e que também aumentam a formação óssea dependendo da profundidade das rugosidades no implante (CHEROUDI et al., 1997). Nos últimos anos, o cenário da modificação de topografia mudou da microtopografia para nanotopografia. Os pioneiros nesse campo foram os grupos de Jansen e Curtis (CURTIS et al., 2001; DALBY et al., 2002) realizando estudos *in vitro* com diversos tipos de nanotopografia. Várias técnicas têm sido empregadas para produzir superfícies nanotopográficas, seja por compactação de nanopartículas, usinagem, ataque químico e anodização. (RASOULI et al., 2018).

Em 1998, Nanci e colaboradores desenvolveram um método simples para obter superfícies de Ti com nanotopografia baseado na desoxidação e reoxidação controlada por meio de condicionamento químico com solução de H_2SO_4/H_2O_2. Os resultados experimentais revelaram que esse tratamento de superfície resulta na formação de nanotopografia caracterizada por uma rede de nanocavidades. Em 2004, De Oliveira e Nanci demonstraram que esse tratamento químico realizado por períodos de 1 a 4 horas em discos de liga de Ti estimula eventos iniciais em culturas primárias de células osteogênicas, aumentando a expressão citoplasmática e extracelular de osteopontina (OPN) e sialoproteína óssea (BSP) (DE OLIVEIRA E NANCI, 2004). Dados os resultados biológicos iniciais promissores, em 2006, Yi e colaboradores caracterizaram, através de diferentes métodos, a superfície de Ti com nanotopografia desenvolvida pelo condicionamento com H_2SO_4/H_2O_2 e revelaram que essa superfície é formada por uma camada de TiO_2, puro em sua maioria, com

espessura de 32 a 40 nm, de fase amorfa e altamente porosa, com nanocavidades com diâmetros de 22 ± 7 nm (YI et al., 2006).

Sinalização Wnt sobre implantes de Ti

Estudos genômicos *in vitro* e *in vivo* identificaram as vias de sinalização Wnt como sendo as mais intensamente moduladas por características da superfície de implantes, como a topografia e molhabilidade (WALL et al., 2009; VLACIC-ZISCHKE et al., 2011; IVANOVSKI et al., 2011a; 2011b). Sabe-se que diferentes vias Wnt são ativadas em resposta a alterações da topografia de superfície por meio da sobre-expressão de ligantes WNT como WNT2b, WNT8b, WNT10a e do receptor LRP5, resultando em aumento da diferenciação osteoblástica em culturas crescidas sobre superfícies de Ti microestruturadas (OLIVARES-NAVARRETE et al., 2011). Porém, os estudos que investigaram quais vias Wnt são mais importantes na interação entre osteoblastos e superfícies de Ti apresentaram resultados contraditórios. Foi demonstrado que a via de sinalização Wnt canônica é relevante na fase inicial da diferenciação osteoblástica, enquanto a via não canônica Wnt/Ca^{2+} é crítica nas fases posteriores da diferenciação induzida por superfícies de Ti com microtopografia (OLIVARES-NAVARRETE et al., 2010). Em estudo posterior, os mesmos autores sugeriram que a sinalização Wnt canônica não desempenha um papel crucial no processo de diferenciação osteoblástica (OLIVARES-NAVARRETE et al., 2011). Em contraste, a avaliação de células crescidas sobre Ti indicou que a topografia de superfície regula a produção de moduladores da via Wnt canônica, promovendo sua ativação e a consequente diferenciação osteoblástica (WANG W et al., 2012). Boyan, em 2018, demostrou que o ligante WNT11 interage com o WNT5a para mediar o comprometimento de células-tronco em osteoblastos, e este efeito é proporcional à presença de modificações topográficas em escala micrométrica contribuindo para a formação óssea peri-implantar através de uma cascata de sinalização regulada por proteínas autócrinas e parácrinas (BOYAN et al., 2018).

Nosso grupo de pesquisa vem investigando a interação entre osteoblastos e a superfície de Ti com nanotopografia obtida pelo condicionamento químico com solução de H_2SO_4/H_2O_2. Resultados prévios mostraram que a nanotopografia induz a diferenciação osteoblástica tanto em condições osteogênicas como não-osteogênicas

(DE OLIVEIRA et al., 2007; ROSA et al., 2014). Também demonstraram que o potencial osteogênico da nanotopografia envolve pelo menos dois mecanismos intracelulares: (1) produzindo a modulação da via de sinalização das BMPs por uma combinação de aumento da produção endógena de BMP2 e de redução da expressão dos microRNA-4448, -4708 e -4773, os quais inibem SMAD1 e SMAD4, ambas transdutoras do sinal osteogênico da BMP2 (KATO et al., 2014, CASTRO-RAUCCI et al., 2016) e (2) aumentando a expressão das integrinas α1β1, (ROSA et al., 2014) e integrina β3 que ativa sinais de transdução Wnt e BMP para regular a formação óssea (LOPES et al., 2019). Portanto, nós elaboramos a hipótese de que as vias de sinalização Wnt estão, ao menos em parte, envolvidas no potencial osteogênico da superfície de Ti com nanotopografia.

Para avaliar nossa hipótese, utilizamos a técnica CRISPR (CRISPR, do inglês: clustered regularly interspaced short palindromic repeats) associado à nuclease Cas9, (Cas9, do inglês: CRISPR-associated 9) (CRISPR-Cas9) por ser uma ferramenta que tem revolucionado a engenharia genética pela eficiência e simplicidade para modificação do DNA de forma precisa.

Edição gênica por nucleases

A edição precisa do genoma vem sendo utilizada como uma ferramenta eficaz para adicionar, remover ou alterar sequências de DNA, sendo essencial para realizar estudos que buscam a compreensão genética de características fenotípicas. Assim, ao longo dos últimos 50 anos, as tecnologias para modificar o genoma se desenvolveram rapidamente. Inicialmente dependia-se da mutação espontânea para estudar as características genéticas. Na década de 1940, tornou-se possível gerar mutações aleatórias no genoma, por meio da mutagênese gerada por tratamento químico ou radiação (AUERBACH et al., 1947). A geração de mutações aleatórias continuou apesar do uso de transposons que permitiam inserir DNA exógeno no genoma de alguns organismos e, só nos anos oitenta, foi possível a mutação direcionada com o desenvolvimento da recombinação homóloga (THOMAS, FOLGER E CAPECCHI, 1986). Porém, as inserções aleatórias geravam mutações indesejadas. Em 1989, começou o uso de nucleases: enzimas capazes de produzir quebras da dupla fita de DNA em um local específico (RUDIN et al, 1989). Com o tempo, os

métodos de análise genética melhoraram, aumentando a compreensão do sistema de reparo do DNA, seja por junção de extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês: non homologous end joint), ou por reparo dirigido por homologia (HDR, do inglês: homologous direct repair) (TSUKAMOTO et al., 1998). Nos anos noventa, a utilização de outras nucleases permitiu o aperfeiçoamento de técnicas como as ZFNs (ZFNs, do inglês: zinc finger nucleases) (KIM et al., 1996), ou TALENS (TALENS, do inglês: transcription activator like effector nucleases) (STERNEBERG et al., 1986; LI et al., 2011). Assim, edição genética através de cortes em locais específicos do DNA veio demonstrar todo o potencial das nucleases. A mais recente endonuclease é a Cas9, que é capaz de produzir a quebra da dupla fita de DNA direcionada por uma pequena sequência de RNA que reconhece o DNA alvo por complementariedade, tornando acessível à ação da Cas9 (CARROLL, 2017).

Mecanismo do sistema CRISPR-Cas9

A tecnologia CRISPR-Cas9 originou-se do sistema CRISPR-Cas do tipo II proveniente da bactéria *Streptococcus pyogenes.* É o sistema mais estudado devido à sua menor complexidade mecanística e mais fácil aplicabilidade (DOUDNA e CHARPENTIER, 2014; JINEK et al., 2012). O CRISPR-Cas9 foi descoberto como mecanismo de defesa de bactérias infectadas por fagos e plasmídeos de DNA. A memória imunitária surge após o DNA invasor ser cortado em pequenos fragmentos e incorporado no CRISPR locus do hospedeiro, passando a ser designado como protoespaçador (BARRANGOU et al., 2007; 2014; DOUDNA e CHARPENTIER, 2014). Em seguida, o locus é transcrito numa cadeia precursora de RNA não codificante (pre-crRNA). As cadeias repetidas do pre-crRNA sofrem hibridação com um segundo RNA não codificante, o tracrRNA (tracrRNA, do inglês: trans-activating CRISPR RNA), formando uma cadeia dupla de RNA que é clivada e processada pela enzima RNAse III. A forma duplex de crRNA-tracrRNA associa-se com a nuclease Cas9 para promover o reconhecimento e destruição do DNA invasor *in vitro* (CONG et al., 2013; MALI et al., 2013). A Cas9 promove o seu direcionamento à sequência de DNA alvo usando uma pequena região de três nucleotídeos, (NGG, base-guanosina-guanosina), denominada sequência PAM (PAM, do inglês: protospacer adjacent motif) presente no DNA alvo. Então, a Cas9 reconhece e separa os GG dos

seus pares complementares CC, expondo o grupo fosfato da base nucleotídica da PAM, promovendo o híbrido DNA-RNA upstream da PAM (SANDER e JOUNG, 2014). Uma vez ligada a Cas9 com a sequência alvo, o domínio da Cas9 HNH cliva a cadeia complementar e o domínio RuvC, a cadeia não complementar provocando a clivagem da dupla fita de DNA (RICHTER et al., 2012).

Essa clivagem da fita dupla de DNA, quando aplicada em células de eucariotos, tende a ser reparada por um dos dois mecanismos naturais de reparo celular: a junção de extremidades não homóloga (NHEJ), ou reparação por recombinação homóloga (HDR). O NHEJ pode levar ou à religação das extremidades resultando na reconstituição perfeita da sequência ou à ligação com erros, por causa de inserções ou deleções no locus genômico, produzindo mudanças na fase de leitura, como a formação de mutações tipo frameshift que levam à geração de um códon prematuro de parada (Stop codon) resultando na produção de proteínas não funcionais ou até no impedimento da produção de proteínas. O HDR necessita de um molde de DNA contendo a sequência homóloga da região afetada. Esse molde pode ser incorporado ao locus e gerar alterações na sequência genômica (DOUDNA e CHARPENTIER, 2014) (Figura 2a).

CRISPR-Cas9-KRAB

Em essência, a versão inicial da técnica CRISPR-Cas9 promove uma clivagem sítio-dirigida no DNA-alvo, que poderia ser reparada por NHEJ culminando em mutações pontuais aleatórias na sequência-alvo ou por HDR, resultando em alterações precisas na sequência nucleotídica-alvo.

A utilização de uma versão da nuclease Cas9 cataliticamente inativa, incapaz de clivar a dupla fita de DNA, mesmo estando associada ao gRNA, a dCas9 (dCas9, do inglês: dead-Cas9) permite que a técnica CRISPR-Cas9 seja explorada. O gene da dCas9 une-se a uma sequência codificadora de uma proteína de marcação, tal como a proteína verde fluorescente (GFP, do inglês: green fluorescent protein) ou uma sequência codificadora de antibiótico (Puromicina). Dessa forma, quando de sua expressão, a dCas9 apresenta-se indiretamente fluorescente ou permite uma melhoria de sua eficiência por seleção através de antibióticos. Assim, usar a dCas9 para reprimir a expressão de um gene é relativamente mais fácil e garantida do que usá-la para gerar um gene knockout. Isso ocorre uma vez que um único gRNA com

posicionamento adequado é suficiente para supressão de até 80% de transcrição (GILBERT et al., 2013). Entretanto, se a utilização de apenas um gRNA não alcançar a repressão gênica desejada, múltiplos gRNAs podem ser usados.

A utilização da dCas9 poder ocorrer isoladamente ou em sua forma conjugada ao repressor de transcrição o KRAB (KRAB, do inglês: krüppel-associated box domain). Em ambos os casos a dCas9 deve ser direcionada ao promotor de um gene ou ao seu sítio de início de transcrição, TSS (TSS, do inglês: transcription start site). A dCas9 liga-se com grande afinidade ao DNA através do gRNA, bloqueando a ligação de fatores de transcrição e do complexo da própria RNA polimerase, impedindo assim a transcrição (GILBERT et al., 2013).

A dCas9-KRAB é capaz de impedir fisicamente a ligação de outras proteínas ao DNA e também promover a formação de heterocromatina tornando-se essencial para a repressão eficiente da transcrição. O gRNA deve ser dirigido à região do TSS, ou até 100 pares de bases antes ou depois do mesmo (GILBERT et al., 2013). Sabe-se que, quanto mais longe do TSS estiver a dCas9, menos efetiva será a repressão. A exceção acontece quando a dCas9-KRAB é posicionada de forma a silenciar ativadores distantes (THAKORE et al., 2015) (Figura 2b).

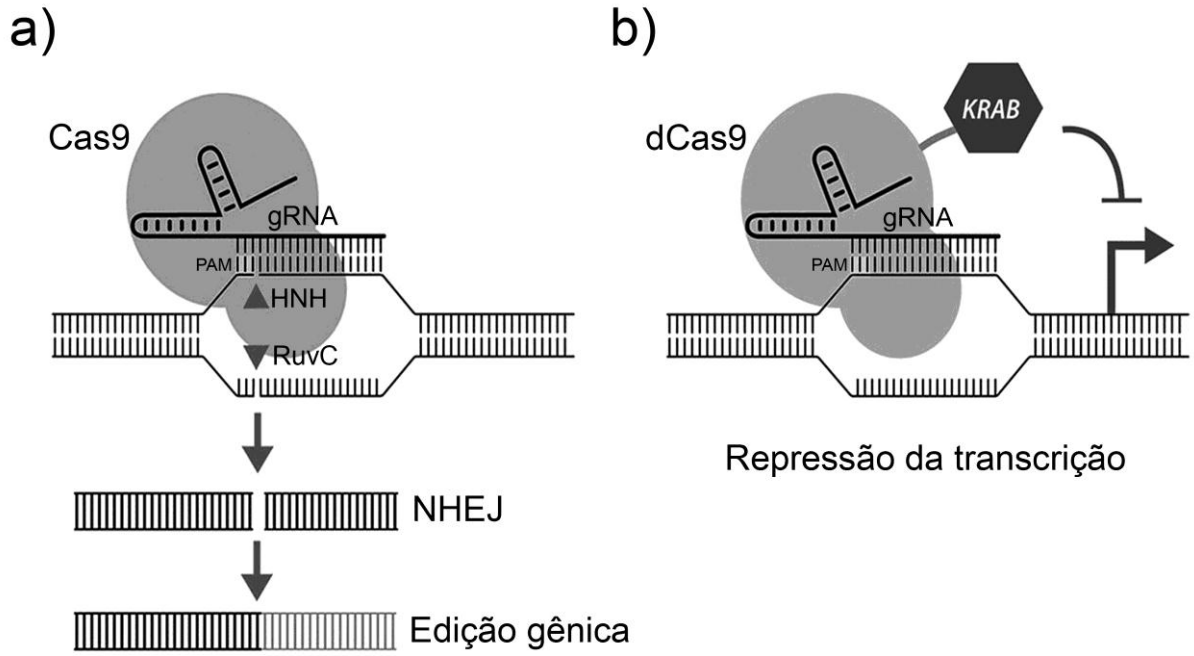

Figura 2. Esquema do sistema CRISPR-Cas9: Edição gênica por CRISPR-Cas9 (a), repressão da transcrição por CRISPR-Cas9-KRAB (b). Figura modificada de: https://www.genengnews.com/uncategorized/a-power-up-for-unbiased-screening-with-crispr

Neste estudo, utilizamos a ferramenta CRISPR-Cas9 e sua modificação CRISPR-Cas9-KRAB para investigar a participação das vias de sinalização Wnt no potencial osteogênico de superfícies de Ti-Nano.

OBJETIVO GERAL

Determinar a participação das vias de sinalização Wnt no potencial osteogênico da superfície de Ti com nanotopografia comparada à superfície de Ti usinada.

CAPÍTULO 1 – EFEITO DA SUPERFÍCIE DE TI-NANO SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS ÀS VIAS DE SINALIZAÇÃO WNT

1.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar o efeito da superfície de Ti-Nano sobre a expressão de genes relacionados às vias de sinalização canônica Wnt/β-catenina e não canônica Wnt/Ca^{2+} em células da linhagem MC3T3-E1.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Cultura de células da linhagem MC3T3-E1

Células da linhagem MC3T3-E1, subclone 14 obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, EUA) foram utilizadas com base nos estudos já realizados pelo nosso grupo em relação às vias de sinalização envolvidas no potencial osteogênico da superfície de Ti-Nano (KATO et al., 2014; CASTRO-RAUCCI et al., 2016). As células foram cultivadas em frascos de poliestireno de 75 cm^2 (Corning Incorporated, EUA) em meio de cultura constituído por Meio Essencial Mínimo, modificação α (α -MEM, Gibco, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 µg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina (Life Technologies, EUA), denominado meio de crescimento. Na subconfluência da cultura (4–5 dias), foi adicionada solução de tripsina a 0,25% (Gibco) e EDTA a 1 mM (Gibco) para obtenção da suspensão de células que foram utilizadas nos experimentos descritos abaixo. Após o plaqueamento, as culturas foram mantidas por períodos de até 7 dias e a progressão foi avaliada em microscópio de fase invertido Axiovert 25 (Zeiss, Alemanha). O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas e durante todo o tempo de cultura e as células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico.

1.2.2 Obtenção das amostras de Ti

Discos de Ti comercialmente puros, grau 2, de 13 mm de diâmetro e 2 mm de altura (Realum, Brasil), usinados, foram lixados com lixas de carbeto de silício de granulação 180, 320 e 600, lavados em ultrassom e submetidos a condicionamento

em solução de H_2SO_4 10 N e H_2O_2 30% por 4 horas a 4ºC em gelo, sob agitação constante. Os discos foram, em seguida, lavados em água destilada e secos ao ar. Discos usinados apenas lixados e lavados foram utilizados como controle.

1.2.3 Caracterização das superfícies de Ti

Discos de Ti de ambos os grupos foram examinados em microscópio eletrônico de varredura Inspect S50 (FEI Company, Hillsboro, OR, EUA) para confimação da geração da nanotopografia.

1.2.4 Reação em cadeia da polimerase em tempo real

As células foram plaqueadas na densidade de $2x10^4$ células/poço sobre os discos de Ti-Usinado e Ti-Nano, em placas de 24 poços e mantidas em meio osteogênico, composto por meio de expansão suplementado com 5 µg/mL de ácido ascórbico (Gibco) e beta-glicerofosfato a 7 mM (Sigma-Aldrich, EUA). Ao final de 5 e 7 dias de cultura, foi avaliada a expressão gênica, por PCR em tempo real, dos marcadores da via Wnt canônica, *Fzd4, Fzd7*, *Fzd8, Lrp5, Lrp6, Ctnnb1, Axin2, Sfrp1, Sfrp2, Dkk1, Wnt10b, Lef e Tcf* e da não-canônica*, Fzd6, Ror1, Ror2, Wnt5a, Wnt11, Camk2a e Camk2d*. O meio de cultura foi removido dos poços e foi adicionado o reagente Trizol LS (Invitrogen) à temperatura ambiente, por 5 minutos, sob agitação por pipetagem. A extração do RNA total foi realizada utilizando o kit SV Total RNA Isolation System (Promega, EUA) de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (260, 280, 230 e 320 nm) em espectrofotômetro (GE Healthcare, EUA) e sua integridade avaliada por meio do aparelho Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, EUA). A integridade do RNA foi verificada a partir de 100 ng do RNA total, seguindo as instruções do fabricante, sendo que valores de RIN (RIN, do inglês: RNA integrity number) superiores a 8 foram considerados adequados (FLEIGE e PFAFFL, 2006; SCHROEDER et al., 2006). Em seguida, foi confeccionada a fita de cDNA a partir de 1 µg de RNA total. Esse procedimento foi feito no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf, Alemanha) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando o kit High-capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para a reação de PCR em tempo real, foram utilizadas sondas TaqMan® (Applied Biosystems) para os genes-alvo, sendo as reações feitas no aparelho StepOne Plus

(Life-Technologies, EUA). As reações foram realizadas em triplicata (n=3), utilizando 5 µL de Taqman® Gene Expression Master Mix, 0,5 µL de Taqman® Gene Expression Master Mix (Sondas + Primers) e 4,5 µL de cDNA (11,25 ng), para um volume final de 10 µL/reação. As reações de amplificação consistiram em 2 minutos a 50ºC, 10 minutos a 95ºC, quarenta ciclos de 15 segundos a 95ºC e 1 minuto a 60ºC (desnaturação e extensão). Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (cicle threshold ou ciclo limiar), sendo esse o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras) que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Como controle endógeno, foi avaliada a expressão do gene beta actina (ACTB). Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada sonda Taqman® utilizada. O método comparativo de 2^{-ddCt} foi utilizado para comparar a expressão gênica das células dos diferentes grupos experimentais (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

1.2.5 Análise estatística

Os dados da expressão gênica foram obtidos em triplicata (n=3) e submetidos aos testes de aderência à curva normal e homogeneidade de variâncias. Constatada a normalidade da distribuição amostral, foi aplicada a análise de variância (ANOVA one-way), seguida de pós-teste Student Newman Keuls. O nível de significância foi de 5% ($p \leq 0,05$).

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Caracterização da superfície de Ti-Nano

Na nanoescala, a superfície de Ti-Usinado apresentou uma superfície lisa irregular (Figura 3a), enquanto o Ti-Nano apresentou uma rede de nanoporos (Figura 3b).

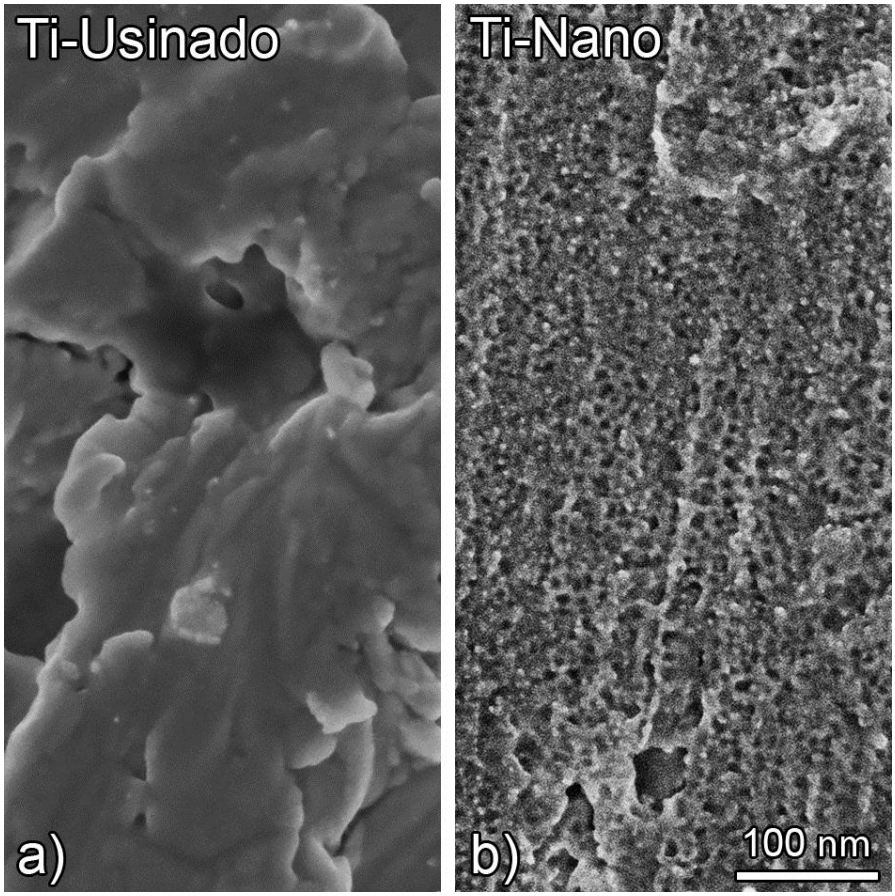

Figura 3. Caracterização das superfícies de Ti. Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução da superfície de Ti-Usinado (a) e Ti-Nano (b). Barra de escala = 100 nm.

1.3.2 Efeito da superfície de Ti-Nano sobre a expressão de genes relacionados às vias de sinalização Wnt

A expressão dos genes relativos a via de sinalização Wnt foi diferente, na dependência da superfície avaliada e do tempo experimental. Aos 5 dias de cultivo, nota-se o aumento da expressão dos genes *Sfrp2, Wnt10b, Wnt11, Fzd4, Fzd6, Fzd7, Fzd8, Lpr5, Lpr6, Ror1, Axin2, Camk2a, Camk2d* e *Lef* nas células da linhagem osteoblástica MC3T3-E1 crescidas sobre a superfície Ti-Nano comparada ao Ti-Usinado; aos 7 dias apenas os genes *Wnt10b, Fzd3, Fzd6* e *Lef* apresentaram maior expresão (Figura 4a; Heatmap). Os genes mais intensamente modulados pela superficie de Ti-Nano foram os genes *Fzd4* (p=0.001) e *Fzd6* (p=0.0001) aos 5 dias de diferenciação osteoblástica (Figura 4a-4c).

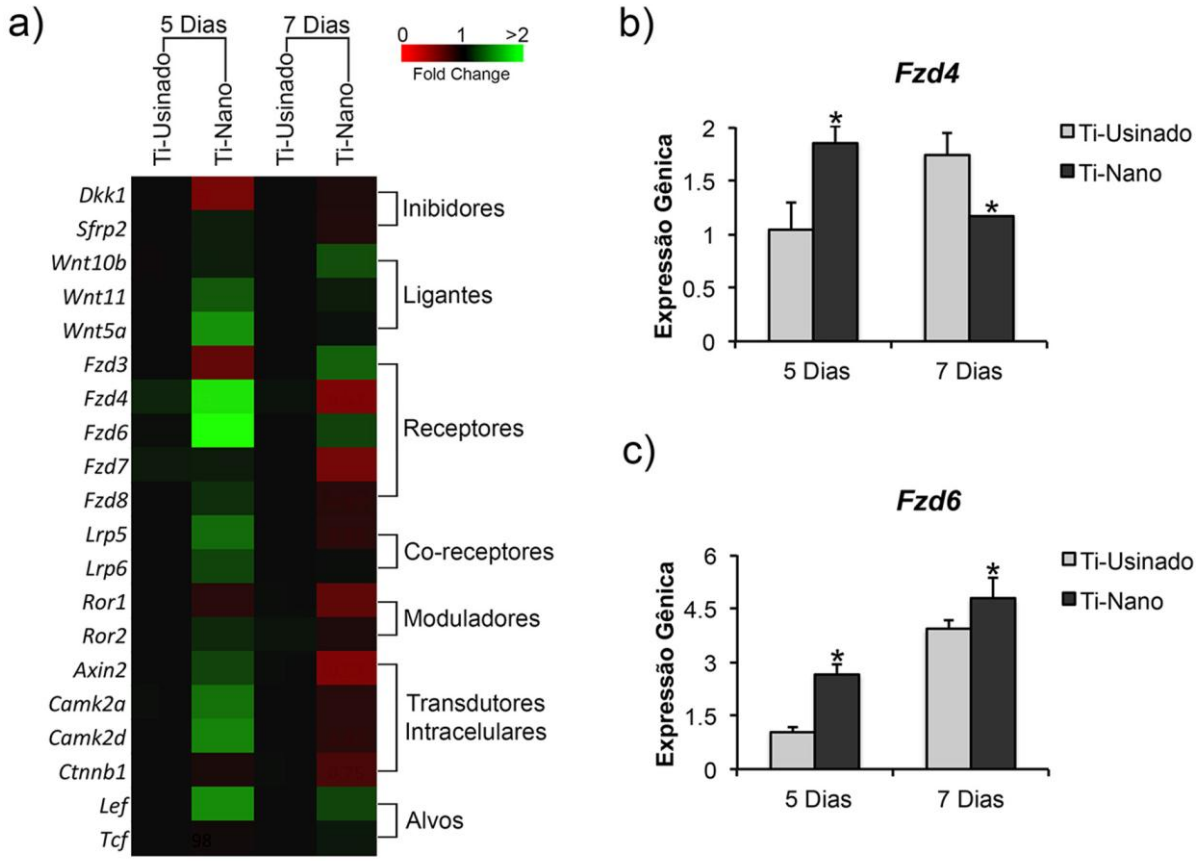

Figura 4. Expressão gênica de genes relacionados a via Wnt. Agrupamento hierárquico Heatmap representando 20 genes da via Wnt diferencialmente expressos em células MC3T3-E1 crescidas sobre superfícies de Ti-Usinado e Ti-Nano aos 5 e 7 dias. O verde indica indução da expressão, o vermelho indica repressão e o preto ausência de modulação em relação ao grupo Ti-Usinado calibrado com valor de 1 (a). Expressão dos genes mais intensamente modulados pela superfície de Ti-Nano, o gene *Fzd4* (b) e gene *Fzd6* (c). Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significante entre Ti-Nano e Ti-Usinado dentro do mesmo período (p≤0,05).

1.3.3 Análise do efeito da superfície de Ti-Nano sobre a expressão de genes relacionados às vias de sinalização Wnt

De uma maneira geral, a superfície de Ti-Nano modula a expressão dos genes relacionados a via de sinalização Wnt, principalmente aos 5 dias (Figura 4a). Assim, considerando a maior expressão de *Wnt10b, Fzd4, Axin2* e os alvos *Tcf/Lef,* a via Wnt/β-catenina, pode estar modulando positivamente o aumento da diferenciação osteoblástica e, considerando a expressão de *Wnt5a, Wnt11, Fzd6 e Camk2a e Camk2d* a via Wnt/Ca^{2+} pode estar regulando os processos de adesão, migração e diferenciação de células MC3T3-E1 crescidas sobre superfícies Ti-Nano. A participação *a priori* das vias de sinalização Wnt está esquematizada abaixo (Figura 5a-5b).

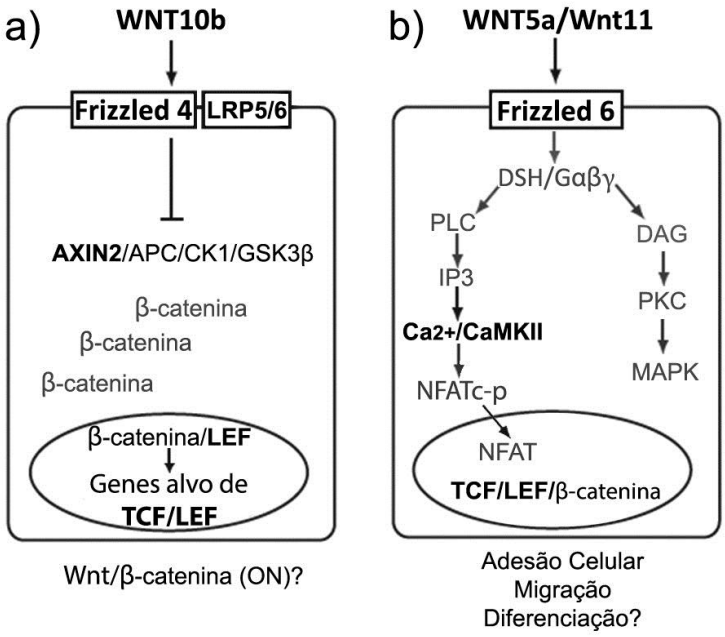

Figura 5. Esquema das vias de sinalização Wnt/β-catenina, (a) e Wnt/Ca^{2+} (b), considerando a expressão gênica de alvos de Wnt em células da linhagem MC3T3-E1 crescidas sobre superfícies de Ti-Nano aos 5 dias.

1.4 DISCUSSÃO

A via de sinalização Wnt está constituída por proteínas extracelulares que ativam diferentes domínios nos receptores transmembrana Frizzled e iniciam assim a ativação tanto da via canônica Wnt/β-catenina como das vias não canônicas, Wnt/Ca^{2+} e de polaridade celular planar (LERNER e OHLSSON, 2015). Embora várias WNTs ativem vias dependentes ou não de β-Catenina, a atividade das WNTs depende do contexto celular e do receptor e, portanto, não podem ser rigorosamente subdivididas de acordo com a via que eles induzem. Isso ocorre porque existem 19 genes que codificam WNTs em mamíferos e que interagem com 15 receptores e correceptores diferentes, e a combinação particular destes com uma determinada WNT determina qual via de sinalização será utilizada. No entanto, esse código de interação ligante e receptor, está começando a ser elucidado, por exemplo, a WNT1, WNT3A, WNT8 e WNT10b são mais comumente encontradas na sinalização dependente de β-Catenina, e WNT5A e WNT11 estão predominantemente envolvidas na sinalização independente de β-Catenina. Por outro lado, as proteínas Frizzled atuariam como receptores comuns para as vias dependentes de β-Catenina e independentes de β-Catenina, e o uso de LRP5 e LRP6 ou ROR1 e ROR2 determina as vias dependentes de β-Catenina e independentes de β-Catenina, respectivamente (TAMURA et al., 2010; CAWTHORN et al., 2012; JANDA et al., 2012)

Nossos resultados revelam que os genes *Wnt5a/Wnt11 e Wnt10b* têm maior expressão aos 5 e 7 dias, respectivamente, em células da linhagem MC3T3-E1 crescidas sobre superfícies de Ti-Nano quando comparado ao grupo Usinado (Figura 4a). Várias linhas de pesquisa apontam que o ligante WNT5a antagoniza a sinalização Wnt/β-catenina, como por exemplo, ativando a via WNT/Ca^{2+} (ISHITANI et al., 2003). Em outro estudo, em células HEK293 a WNT5a compete com o ligante WNT3a canônico pelo receptor FZD2, pois a adição de ambos os ligantes diminui a ativação da via Wnt/β-catenina quando comparada à adição da WNT3a isolada (SATO et al., 2010). No entanto, a WNT5a poderia participar tanto da inibição como da ativação da via Wnt/β-catenina, já que foi demostrado que ela regula autonomamente a expressão de LRP5/6, promovendo, assim, a diferenciação osteoblástica e ainda a produção da inibição da diferenciação adipocítica (OKAMOTO et al., 2014). A adição de WNT5a recombinante estimula a via não canônica, inibindo a β-Catenina, quando ligada ao

ROR2, porém quando ligada ao FZD4 estabiliza a β-Catenina, favorecendo a via canônica (MIKELS e NUSSE., 2006). O ligante WNT10b estimula a osteoblastogênese por meio da sinalização Wnt/β-catenina, favorecendo a indução de fatores de transcrição osteogênicos RUNX2, DLX5 e OSX e a supressão dos fatores de transcrição adipogênicos C/EBPα e PPARy. Foi demostrado que sua supressão em camundongos *Wnt10b-/-* produz a diminuição de osso trabecular e de osteocalcina sérica (BENNET et al., 2005; GREGORY et al., 2005).

Os ligantes WNT são glicoproteínas secretadas lipídio-modificadas que interagem com a superfície celular e os glicosaminoglicanos sulfatados da matriz extracelular, modulando sua biodistribuição e atividade (REICHSMAN et al., 1996). Devido à sua natureza hidrofóbica e afinidade por sulfatos de heparano e condroitina, a análise de WNTs por técnicas convencionais quantitativas como o ELISA ainda apresenta dificuldades (KUMMCITA et al., 2010). Pela mesma razão, a análise de WNTs por Western blot nesses tipos de experimentos poderia ser imprecisa devido ao acúmulo de WNTs na matriz extracelular ao longo do tempo (OLIVARES-NAVARRETE et al., 2011). Portanto, selecionamos alvos que não são ligantes WNT para serem silenciados pela técnica CRISPR-Cas9.

Visando à escolha de genes candidatos a serem silenciados pela técnica CRISPR-Cas9, identificamos os genes que codificam os receptores FZD4 e FZD6 por apresentar maior expressão gênica em células da linhagem MC3T3-E1 crescidas sobre superfícies de Ti-Nano quando comparado ao grupo usinado em 5 dias (Figura 4). Os receptores Frizzled compartilham uma arquitetura comum e todos eles conservam um domínio rico em cisteína (CRD) seguido por um domínio com sete segmentos transmembrana (GUBB e GARCIA-BELLIDO, 1982). A identificação dos Frizzled como receptores de WNT implica que atuam em pelo menos duas vias de sinalização distintas: via de polaridade celular planar/PCP (que pode ou não envolver um ligante Wnt) e a sinalização Wnt canônica. A primeira envolve a reorganização do citoesqueleto e é caracterizada por um pequeno conjunto de proteínas de membrana plasmática assimetricamente localizadas (incluindo Frizzled) e proteínas citosólicas associadas à membrana (GOODRICH e STRUTT, 2011). A via canônica envolve a ligação Wnt–Frizzled e leva à inibição da fosforilação e proteólise da β-Catenina, resultando na migração de β-Catenina para o núcleo regulando a transcrição em combinação com os fatores LEF/TCF (MACDONALD, TAMAI e HE, 2009; NUSSE,

2012). Uma terceira via, a via Wnt/Ca^{2+}, é menos definida e sugere-se que envolva um sistema de transdução baseado na proteína G (WANG e MALBON, 2003). Dentre todos os Frizzled conhecidos por ativar a via WNT canônica, o FZD4 é o melhor compreendido em termos de função biológica, interação com outros ligantes e receptores e, portanto, também por seu papel em doenças humanas (WANG Y et al., 2001; 2012). Em relação à osteogênese, foi demostrado que o microRNA 139-5p inibe a diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais, atingindo diretamente o FZD4 e a β-Catenina e impedindo assim a ativação da via Wnt canônica (LONG et al., 2017).

O FZD6 está envolvido principalmente na via Wnt/PCP, onde desempenha um papel importante na orientação dos folículos pilosos (GUO et al., 2014; nas células sensoriais auditivas e no fechamento do tubo neural (WANG Y et al., 2006). A mutação (R511C) do FZD6 altera a distribuição subcelular do receptor produzindo disfunção da sinalização WNT-FZD. Em fibroblastos induzidos com WNT3a e *Fzd6* mutante a estabilidade da β-Catenina é inibida, assim como é inibido o aumento de WNT5a quando regulado pelo inibidor DKK1 (FROJMARK et al., 2011; NAZ et al., 2012). A maioria dos estudos demostra que o FZD6 está associado com a sinalização independente de β-Catenina. De fato, Golan e colaboradores, em 2004, demostraram que o FZD6 atua como regulador negativo da cascata de sinalização dependente de β-Catenina. A combinação do *Fzd6* com o repórter Luciferase *Tcf/Lef* e *Wnt1, Wnt3, Wnt3a, Wnt4 ou Wnt5a*, em células HEK293T, não induziu aumento da atividade do repórter com qualquer um dos Wnts escolhidos. Ao contrário, o *Fzd6* inibiu a atividade do repórter induzido pelo *Fzd1 e Wnt3a.* Este efeito inibitório de *Fzd6* resulta da ativação de vias alternativas, por exemplo, a via da NLK (Nlk, do inglês: nemo-like kinase), que leva à fosforilação de TCF/LEF, reduzindo sua ligação ao DNA alvo (GOLAN et al., 2004). Heinonen e colaboradores identificaram o FZD6 como receptor para WNT4 em células progenitoras hematopoiéticas imaturas após comprovar a diminuição da proliferação celular quando mediada por WNT4 em ausência do FZD6 (HEINONEN et al., 2011). Porém, apesar de estar comprovada a associação entre FZD6 e a transdução de sinal independente de β-Catenina, o FZD6 também pode estar associado à via canônica. Kolben e colaboradores, em 2012, relataram uma associação positiva em células-tronco mesenquimais humanas entre FZD6 e WNT3a, levando à ativação da β-Catenina.

1.5 CONCLUSÕES

- A superfície de Ti-Nano induz a expressão de genes da via Wnt, principalmente aos 5 dias.
- Os genes mais intensamente modulados pela superfície de Ti-Nano são o *Fzd4* e o *Fzd6* aos 5 dias de diferenciação osteoblástica em células MC3T3-E1.

CAPÍTULO 2 – EFEITO DO SILENCIAMENTO DO RECEPTOR FRIZZLED 4 (FZD4) SOBRE O POTENCIAL OSTEOGÊNICO DA SUPERFÍCIE DE TI-NANO

2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Investigar o efeito do silenciamento do gene relacionado à via de sinalização Wnt canônica, Frizzled 4, sobre o potencial osteogênico da superfície de Ti-Nano em culturas de células osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Expressão constitutiva de dCas9-KRAB por células MC3T3-E1

Para obter a expressão estável de células MC3T3-E1, partículas lentivirais foram infectadas contendo o vetor lentiviral dCas9-KRAB seguido da seleção com puromicina. Previamente, para gerar as partículas lentivirais, células 293-FT (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA) foram transfectadas com o vetor lentiviral pHAGE EF1α dCas9-KRAB (Addgene #50919), o codificador de envelope pMD2.G e o vetor empacotador pspAX2 (radio 3:2:1) e o reagente de transfecção XtremeGENE HP DNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. O meio contendo o vírus foi coletado 48 e 72 horas após a transfecção e as partículas virais foram concentradas utilizando o Lenti-X concentrator (Clontech, Mountain View, CA, EUA). Em seguida, as células MC3T3-E1 foram plaqueadas em placas de 6 poços a uma densidade celular de 1×10^5 células/poço e mantidas em meio de crescimento, a 37ºC em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico. Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado por uma solução contendo meio de crescimento com adição de 8 µg/mL de Polibreno (Sigma-Aldrich) e o vírus previamente preparado foi mantido a 37ºC em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico. No dia seguinte, a solução lentiviral foi substituída por meio de crescimento fresco e 48 horas após a infecção, a seleção com puromicina (1,5 ng/µL) foi iniciada (Thermo Fischer Scientific) e mantida por 7 dias. A

presença de dCas9-KRAB foi confirmada por PCR em tempo real e Western blot para a proteína dCas9 (Figura 10a e 10b, respectivamente). Essas células MC3T3-E1-KRAB foram consideradas posteriormente como controle.

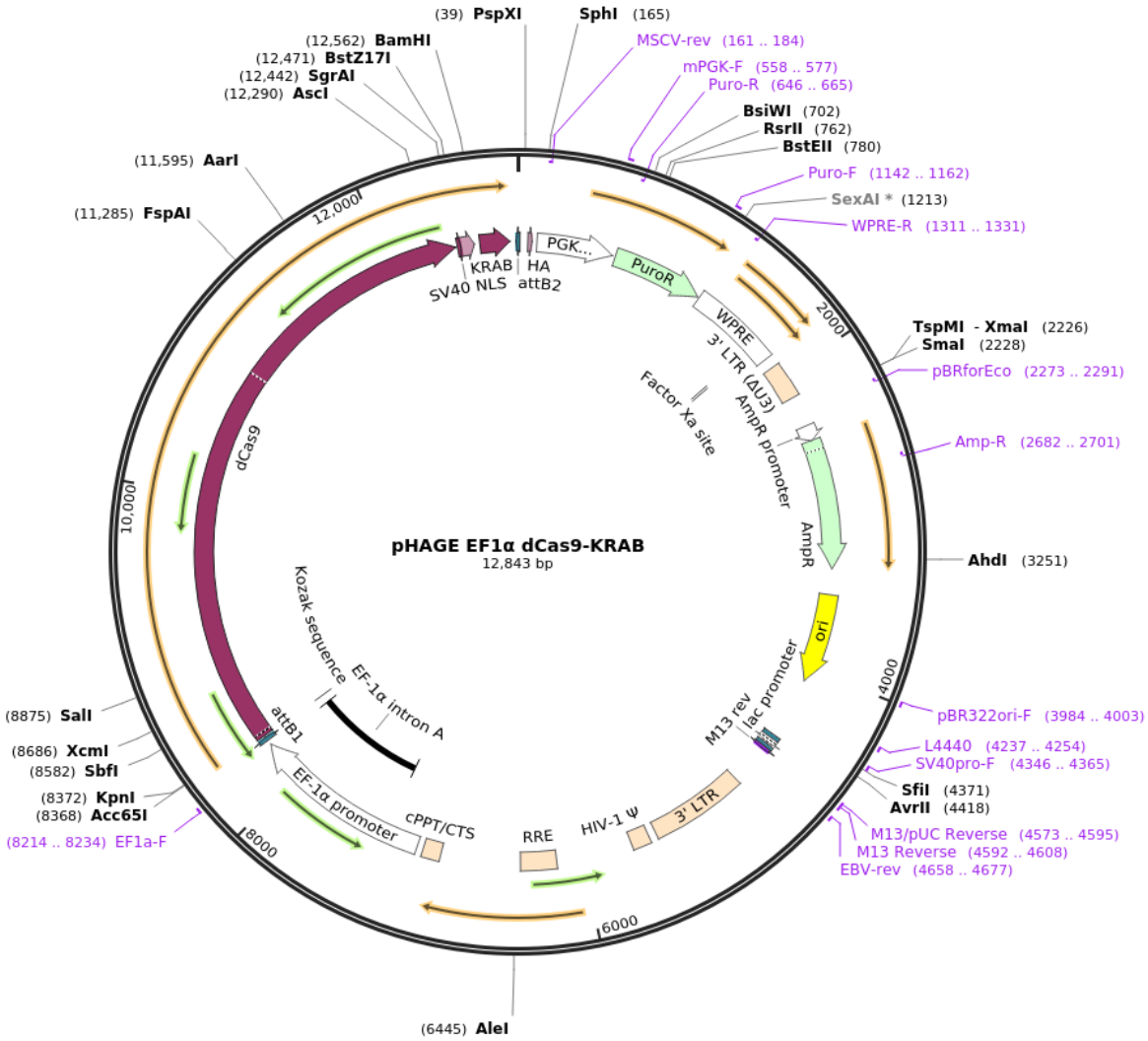

Figura 6. Vetor pHAGE EF1α dCas9-KRAB (Addgene #50919). É formado por uma sequência de 12,843 pares de base. Suas principais características são; a sequênica para expressão do domínio de repressão KRAB (Krüppel-associated box), o gene dCas9, o gene de resistência a puromicina (PuroR) e o gene de resistência à ampicilina (AmpR).

2.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional

Para amplificação do produto de PCR convencional, inicialmente foi isolado o DNA genômico. Para isso, aproximadamente 1×10^5 células MC3T3-E1 e KRAB (Controle) foram resuspendidas em 50 µL de solução QuickExtract (Lucigen-Epicenter, Middleton, WI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A reação

de PCR convencional foi preparada com 10 µL de KAPA HiFi HotStart ReadyMix (2x) (Kapa Biosystems - Roche Applied Science Penzberg, DE-BY, DE), 0,5 µl de oligonucleotídeos forward e reverse (10 µM) com a seguintes sequências: (Forward-ACTGATAAGGCTGACTTGCGGT, Reversse-CGAAGTTCCAGGGAGTGATGGT), 100 ng de DNA genômico e complementada com H2O até 20 µL. A mistura foi submetida ao termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf, Alemanha) à desnaturação inicial a 94ºC durante 15 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final por 10 minutos a 72°C. Aos produtos de PCR convencional foram adicionados 4 µL do Orange DNA loading dye (6x) (Thermo Fischer Scientific) e separados por eletroforese em gel a 1%. As bandas foram registradas no GelDoc UV (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

2.2.3 Detecção da expressão proteica por Western Blot

Para a detecção da proteína dCas9 por Western blot, as células MC3T3-E1 e KRAB (Controle) foram destacadas por tratamento com solução de 1mM EDTA, 1,3 mg/mL de colagenase e tripsina a 0,25% (Gibco, EUA), homogeneizadas, transferidas para tubo falcon e centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas 3 vezes com 5 mL de PBS. Após a última centrifugação, todo o PBS foi removido e foi adicionado o tampão RIPA (NACl 150 mM, Sigma-Aldrich; NP40 10%, Sigma-Aldrich; $C_{24}H_{39}O_4Na$ 0,5%, Sigma-Aldrich; SDS 0,1%, Sigma-Aldrich; e Tris base 50 mM, pH 8, Roche, EUA). A extração da proteína total foi realizada por lise celular, utilizando o aparelho de ultrassom (Misonix, EUA) com 5 pulsos de 10 segundos e intervalo de 10 segundos entre pulsos. Primeiramente, foi determinada a concentração de proteínas das amostras, em µg/mL, utilizando o kit comercial Protein Assay (BioRad) de acordo com as instruções do fabricante. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (BioTek Instruments Inc., EUA) com comprimento de onda de 750 nm. Em seguida, foram preparados géis de poliacrilamida 8,5% para separação das proteínas contendo, para um volume final de 10 mL: 2,84 mL de acrilamida, 2,60 mL de tampão Tris a 1,5% e SDS a 0,4%, pH 8,8, 4,8 mL de água destilada, 10 µL de Temed e 75 µL de persulfato de amônio a 10% (National Diagnostics, EUA). Após a polimerização do gel de separação, foi

confeccionado o gel de empilhamento 5% contendo, para um volume final de 5 mL: 0,83 mL de acrilamida, 0,13 mL de tampão Tris HCl pH 6,8 1M e SDS 10%, 3,44 mL de água destilada, 12 µL de Temed e 20 µL de persulfato de amônia 10% (National Diagnostics, EUA). Após a polimerização, os géis foram montados em aparato próprio e foi adicionado o tampão de corrida composto por 3,01 g de Tris base (Roche), 14,4 g de glicina (USB Corporation, EUA) e 1 g de SDS (Sigma-Aldrich) para um volume final de 1 L de água destilada. Para o ensaio, 30 µg de proteína de cada grupo, contidos em um volume final de 20 µL, foram misturados com 5 µL de tampão de amostra, contendo 7 mL de Tris base pH 6,8 (Roche), 3 mL de glicerol (Sigma-Aldrich), 1 g de SDS (Sigma-Aldrich), 0,93 g de DTT (Sigma-Aldrich), 1,2 mg de bromofenol (Sigma-Aldrich) e 10 mL de água destilada e β-mercaptoetanol. Após aquecimento em banho-maria a 100°C por 5 minutos, as amostras foram aplicadas nos géis e a separação das proteínas foi realizada por eletroforese com aplicação de 100 Volts por 1 hora. Como referência para identificação do peso molecular das proteínas marcadas, foi utilizado o marcador de bandas entre 10 e 250 kDa (Bio-Rad). As proteínas foram transferidas dos géis para membranas de nitrocelulose (Hybond C-Extra, EUA) com o aparelho Trans-Blot® SD (BioRad), operado com 12 Volts por 45 minutos. As membranas foram submetidas a três incubações: à temperatura ambiente, sendo: (1) bloqueio dos sítios inespecíficos por 1 hora, com leite desnatado 5% diluído em Tampão Salino de Tris com Tween 20 (TBS-T), composto por 2.43 g de Tris, (Roche), 8 g de NaCl (Sigma-Aldrich), 1 mL de Tween 20 e 1 L de água destilada, pH 7,6, (2) incubação overnight a 4ºC com o anticorpo primário anti-CRISPR (Cas9) (1:500, Biolegend, San Diego, CA, EUA) diluído em solução de leite desnatado 2,5% em TBS-T e (3) incubação por 1 hora com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:2000, cabra anti-coelho IgG HRP; Santa Cruz Biotechnology) diluído em solução de leite desnatado 2,5% em TBS-T. Ao final de cada incubação, as membranas foram lavadas três vezes, 10 minutos cada, com TBS-T. Por fim, as membranas foram incubadas com solução quimiluminescente (Perkin Elmer, EUA) por 1 minuto e transferidas para o aparelho G:BOX (SynGene, EUA). Para a captação de imagens das bandas relativas às proteínas-alvo e obtenção dos dados quantitativos, foi utilizado o programa GeneSnap (SynGene, EUA). A expressão proteica foi normalizada pela expressão da proteína constitutiva Tubulina. Para isso, as membranas foram submetidas a tratamento com solução Re-blot plus mild

(Milipore, EUA) por 20 minutos, à temperatura ambiente, para a remoção dos anticorpos e incubadas de acordo com os procedimentos previamente descritos, utilizando o anticorpo primário antitubulina (1:1000, Santa Cruz, Biotechnology), seguido do anticorpo secundário (1:2000, goat anti-rabbit IgG HRP, Santa Cruz, Biotechnology).

2.2.4 Construção do RNA guia (gRNA)

A fim de silenciar a expressão de *Fzd4*, três gRNAs foram desenhados e avaliados por meio da plataforma Benchling (https://benchling.com). A região alvo foi -300 a +100 pares de bases do sítio de início de transcrição gênica (TSS). O gRNA com 20 pares de bases, foi selecionado considerando a melhor pontuação para “on-target” e pior pontuação para “off-target”. As sequências oligonucleotídicas foram compradas da Invitrogem (Invitrogen-Life Technologies).

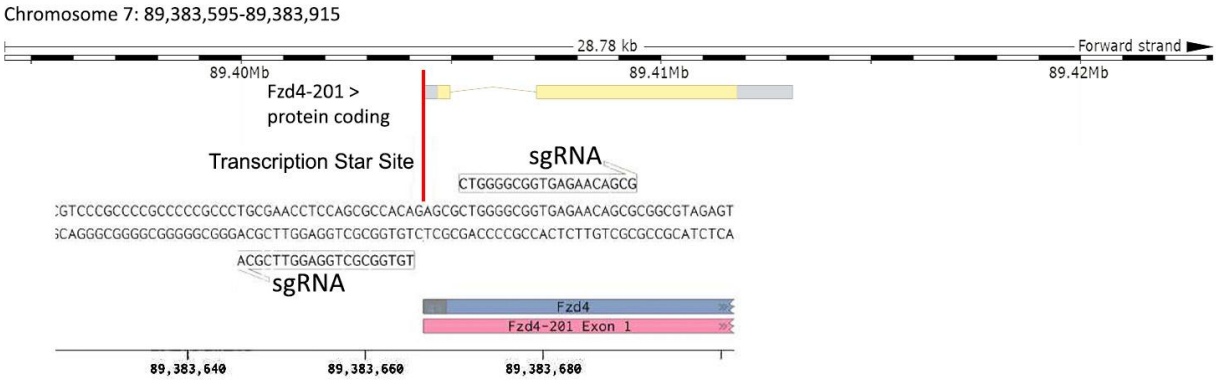

Figura 7. Desenho do gRNA próximo ao TSS do gene *Fzd4 Mus musculus.*

2.2.5 Transdução de MC3T3-E1-dCas9-KRAB com partículas lentivirais contendo gRNA *Fzd4*

Para produzir as partículas lentivirais contendo o gRNA, os oligonucleotídeos foram, previamente, anelados e sujeitos à reação de digestão e ligação com o plasmídeo pLK5.sgRNA.EFS.GFP (Addgene #57822) (Figura 8). Em seguida, o plasmídeo foi transformado em células competentes *Stbl3* (Invitrogen) e as colônias formadas foram crescidas em meio LB contendo ampicilina (50 µg/mL). A purificação foi realizada utilizando o kit ZRM Plasmid Maxiprep (Zymo Research, Irvine, CA, EUA)

de acordo com as instruções do fabricante e a concentração avaliada por densidade ótica a 260 nm. As partículas lentivirais foram geradas como descrito acima e as células KRAB (Controle) foram infectadas com o vírus para cada gRNA para gerar células *gFzd4*-MC3T3-E1. Em seguida, as células foram submetidas à seleção por citometria de fluxo por meio da expressão positiva de GFP. Para testar a eficiência do *gFzd4,* a expressão gênica do gene foi avaliada em células cultivadas sobre poliestireno e analisadas após atingir a subconfluência (80%) depois da seleção por citometria. A expressão do gene *Fzd4* foi avaliada por PCR em tempo real como descrito previamente.

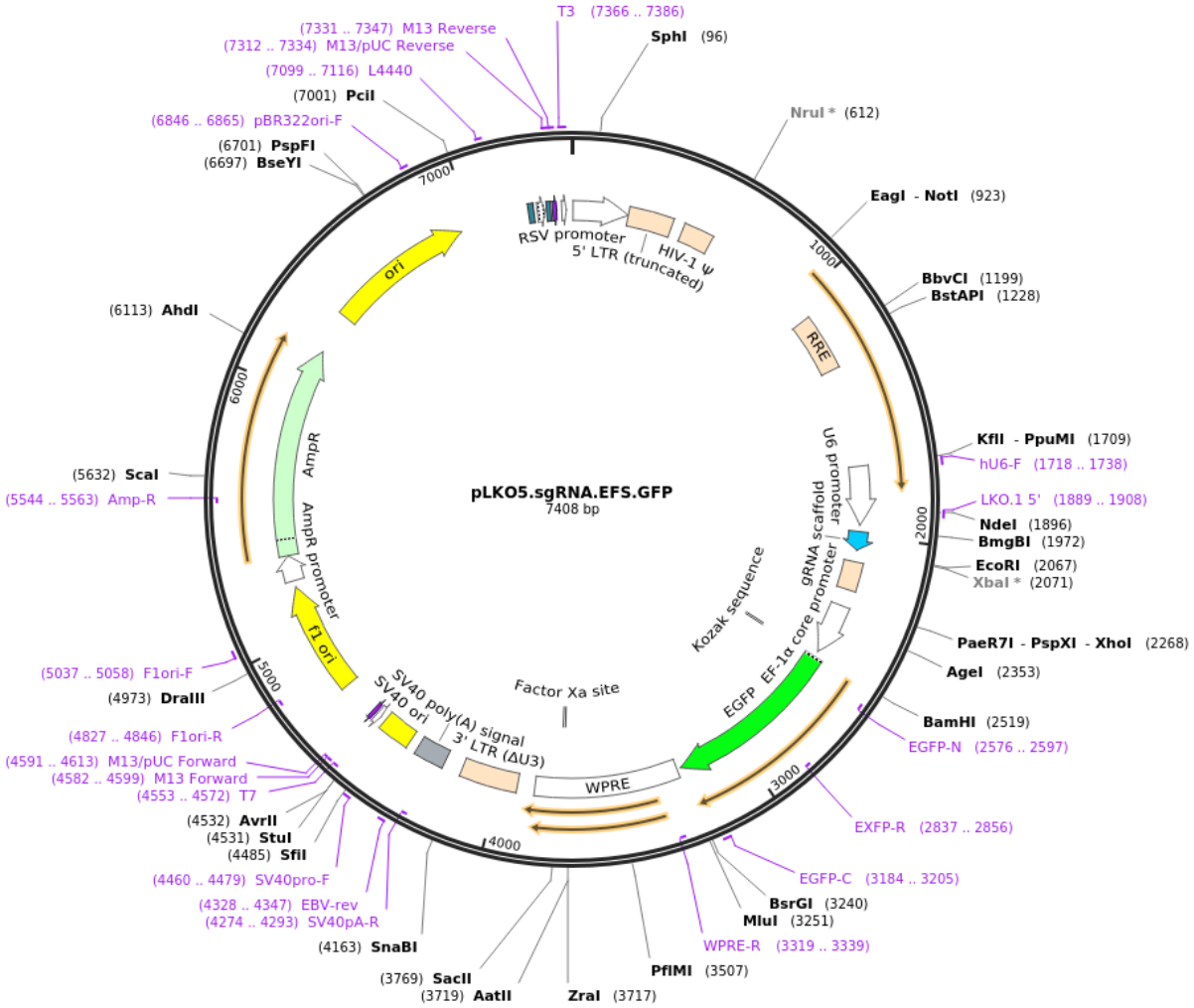

Figura 8. Vetor pLK5.sgRNA.EFS.GFP (Addgene #57822). É formado por uma sequência de 7408 pares de base. Suas principais características são; a sequência para expressão do promotor EF1∝ que permite a expressão da proteína GFP, o gene de resistência à ampicilina (AmpR) e o sitio Bsmb1 para clonagem do gRNA.

A seleção do melhor gRNA foi baseada na melhor resposta celular após a infecção em células MC3T3-E1 e com maior intensidade de fluorescência GFP+.

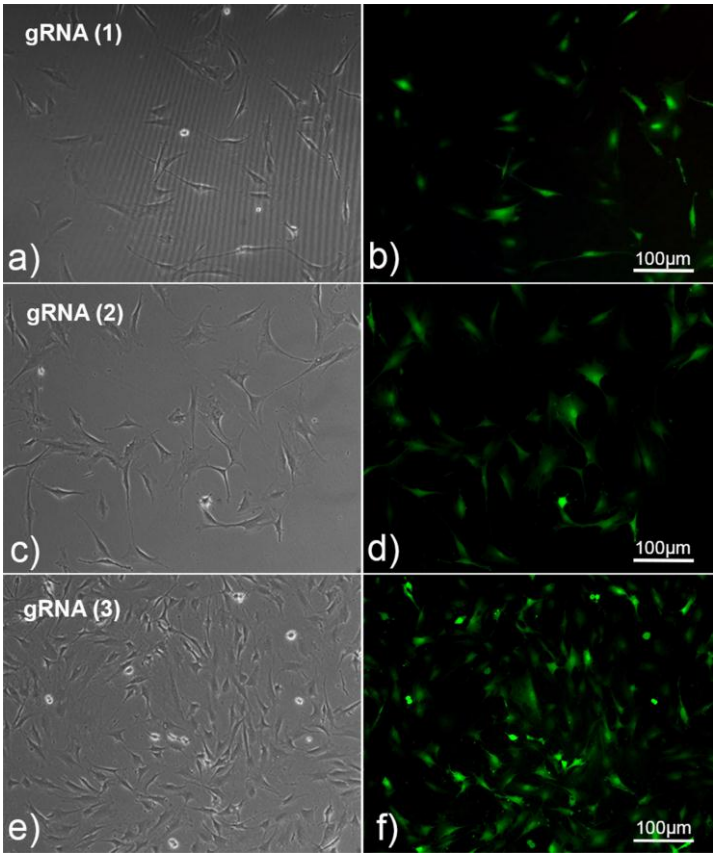

Figura 9. Fluorescência GFP+ para seleção de células infectadas com gRNA *Fzd4*. gRNA1 (a-b), gRNA2 (c-d), gRNA3 (e-f) 48 horas após infecção. Barra de escala = 100nm.

2.2.6 Efeito do silenciamento de *Fzd4* em células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti-Usinado e Ti-Nano

Com base nas análises de cada gRNA, foram selecionadas as células com o *gFz4* mais eficiente, selecionado através de intensidade de GFP+ por citometria de fluxo. Então, as células Controle e *gFzd4* foram contadas e plaqueadas na densidade de 2×10^4 células/disco em placas de cultura de 24 poços (Corning Incorporated) contendo discos de Ti-Usinado e Ti-Nano e cultivados em meio de crescimento por até 17 dias a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico. A avaliação do efeito do silenciamento foi realizada por expressão proteica de RUNX2, expressão gênica de marcadores osteogênicos aos 5 e 7 dias, ensaio de fosfatase alcalina aos 10 dias e ensaio de formação de matriz mineralizada aos 14 dias, como descritos abaixo.

Para a detecção da expressão proteica de RUNX2, usamos o anticorpo primário anti-RUNX2 (1: 1000, MBL, Woburn, MA, EUA) overnight a 4°C seguido da

incubação com o anticorpo goat anti-mouse IgG conjugado com peroxidase (1: 2000, Santa Cruz Biotechnology).

2.2.7 Detecção de fosfatase alcalina (ALP) *in situ*

A atividade de ALP foi avaliada qualitativamente aos 10 dias pelo método Fast red (MAJORS et al., 1997). O meio de cultura foi removido das células cultivadas sobre Ti-Usinado e Ti-Nano 1 mL/poço e depois removido, e os discos lavados com solução de Hank (Hank's Balanced Salts, Sigma-Aldrich) aquecida a 37°C. Foi adicionado 1 mL/poço de solução tampão Tris (Sigma-Aldrich) 120 mM com pH 8,4, contendo 1,8 mM de Fast red TR (Sigma), 0,9 mM de naftol-ASMX-fosfato (Sigma-Aldrich) e 1:9 de dimetilformamida (Merck) e os discos foram mantidos por 30 minutos em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico. As amostras foram depois examinadas sob epifluorescência, utilizando um Axio Imager - Microscópio de fluorescência M2 (Carl Zeiss, Göttingen, GO, DE) equipado com uma câmera digital Axiocam MRM (Carl Zeiss).

As imagens adquiridas foram processadas usando o software Adobe Photoshop CS6 Extended, versão 13.0.4 (Adobe Systems, San Jose, CA, EUA). E analisadas em três campos escolhidos de forma randomizada em cinco discos de cada grupo (n=15) para ambos os discos Ti-Usinado e Ti-Nano no software ImageJ 1.52 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Os resultados foram expressos como quantificação de pixels por área total.

2.2.8 Formação de matriz mineralizada

A detecção de matriz mineralizada foi realizada aos 14 dias de cultura. Ao final desse período, o meio de cultura foi removido, os discos lavados três vezes com solução de Hanks (Gibco) aquecida a 37°C e preenchidos com álcool a 70% por 1h a 4ºC. Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com PBS, seguido de uma lavagem com H_2O deionizada e processados para coloração com vermelho de alizarina (Sigma) por 15 minutos. O vermelho de alizarina colore áreas de mineralização ricas em cálcio. Depois desse tempo, o discos foram lavados duas vezes H_2O deionizada e 1 vez com PBS. Para quantificação da coloração segundo

método de Gregory et al. (2004), 280 µL de ácido acético a 10% foram acrescentados a cada poço e as placas deixadas sob agitação suave por 30 min. A camada de células foi então raspada e a solução transferida para tubos de 1,5 mL e agitadas em vórtex por 30s. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 85°C por 10 min e transferidos para o gelo por 5 min. Na sequência, os tubos foram centrifugados a 13000 g por 20 min e 100 µL do sobrenadante transferido para placas de 96 poços (Corning) previamente contendo 40 µL de hidróxido de amônia a 10%. Em seguida, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (BioTek Instruments) utilizando comprimento de onda de 405 nm. A formação de matriz mineralizada foi expressa como densidade óptica.

2.2.9 Imunolocalização de OPN

Aos 5 dias de cultura as superfícies de Ti foram fixadas em paraformaldeído 4% com tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,2, por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram processadas para imunofluorescência indireta. A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, EUA) a 0,5% em tampão fosfato por 10 minutos, seguida de bloqueio com leite desnatado a 5% em tampão fosfato por 30 minutos. Anticorpos primários para sialoproteína óssea (1:200, WV1D1-9C5, Developmental Studies Hybridoma Bank – DSHB, Iowa City, IA, EUA), osteopontina (1:800, MPIIIB10-1, DSHB), foram utilizados, seguidos de anticorpos secundários conjugados com fluoróforo Alexa Fluor 594 (fluorescência vermelha; 1:200, Molecular Probes, EUA). Foi utilizada faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (fluorescência verde; 1:200, Molecular Probes), para visualização de actina. Todas as incubações dos anticorpos foram feitas em atmosfera úmida por 60 minutos à temperatura ambiente. Entre cada incubação, as amostras foram lavadas três vezes (5 minutos cada) em tampão fosfato.

Antes da montagem para observação microscópica, os núcleos celulares foram marcados com DAPI (Molecular Probes) a 300 nM por 5 minutos. Os discos foram montados diretamente em lâminas de vidros e, em seguida, após montagem de lamínula de vidro Fisherbrand 12 mm (Fisher Scientific, EUA) com meio de montagem anti-fade (Vectashield, Vector Labs, EUA) sobre as superfícies contendo células, as amostras foram examinadas utilizando microscópio de fluorescência Leica DMLB (Leica, Alemanha) acoplado a uma câmera digital. As imagens adquiridas foram

processadas com o programa Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Inc.).

2.2.10 Análise estatística

Os dados da expressão gênica foram obtidos em triplicata (n=3) e submetidos ao Teste *t* Student utilizando o programa SigmaPlot (Systat Software) para comparações dentro de cada período.

Os dados da atividade de ALP *in situ* obtidos em três campos escolhidos de forma randomizada em cinco discos de cada grupo (n=15) e os dados do ensaio de mineralização obtidos em quintuplicata (n=5) foram submetidos aos testes de aderência à curva normal e homogeneidade de variâncias. Constatada a normalidade da distribuição amostral, foi aplicada a análise de variância (ANOVA one-way), seguida de pós-teste Student Newman Keuls. Para todos os testes o nível de significância foi de 5% ($p \leq 0,05$).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Expressão constitutiva de dCas9 em células MC3T3-E1-KRAB

Confirmamos a expressão constitutiva de dCas9 em células MC3T3-E1-KRAB por meio de avaliação do DNA genômico (Figura 10a) e da expressão proteica de dCas9 (Figura 10b).

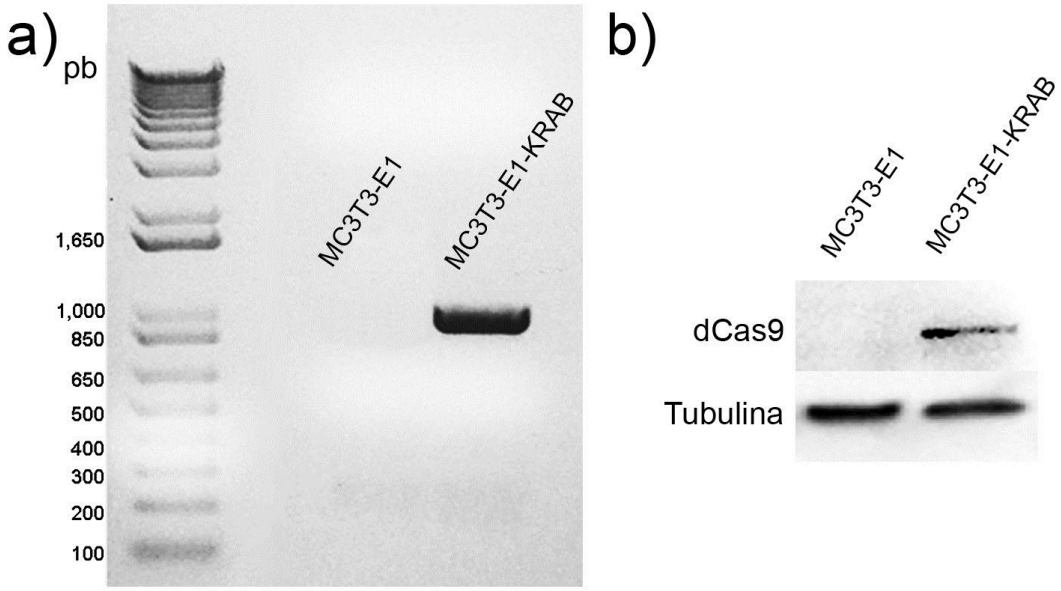

Figura 10. Expressão constitutiva de dCas9-KRAB em células MC3T3-E1. DNA genômico (a) e expressão proteica (b) da dCas9 em células MC3T3-E1 e em MC3T3-E1-KRAB.

2.3.2 Avaliação da eficácia do silenciamento de *Fzd4* em células MC3T3-E1

Considerando que o Ti-Nano regulou positivamente o *Fzd4* e os alvos *Lef* e *Tcf* (Capítulo 1; Figura 3), a via Wnt/β-catenina pode estar envolvida no potencial osteogênico da superfície de Ti-Nano, e para testar esta hipótese, silenciamos o *Fzd4* usando o sistema CRISPR-dCas9-KRAB.

Aos 3 dias após o sorting, a expressão de *Fzd4* foi avaliada em culturas de células MC3T3-E1-KRAB denominadas Controle e, em células *gFzd4*-MC3T3-E1 denominadas *gFzd4*. O gRNA mais eficiente (Figura 9f) reduziu aproximadamente 40% a expressão gênica do *Fzd4* (Figura 11, p=0.0045), 30% a expressão gênica do *Lef* (p=0.0001) e 80% o gene alvo *Tcf* (p=0.0001).

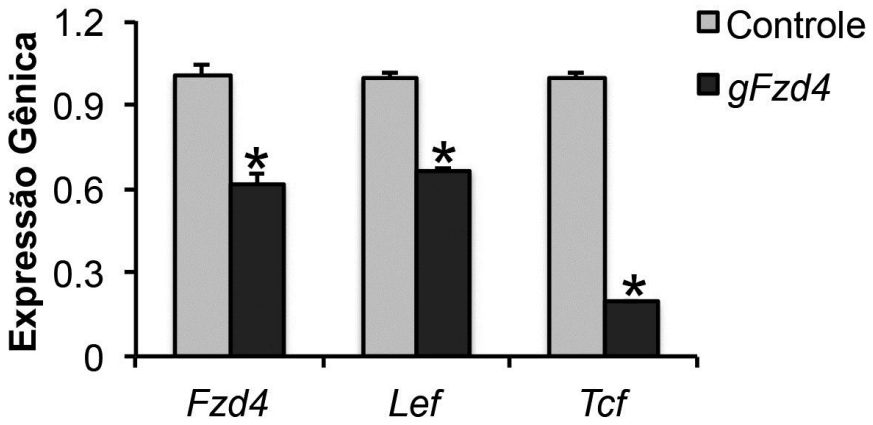

Figura 11. Eficiência do CRISPR-dCas9-KRAB para silenciar o gene *Fzd4.* Regulação negativa da expressão dos genes alvo da via Wnt, *Lef* e *Tcf* sobre poliestireno em células *gFzd4* aos 3 dias de cultura após a seleção GFP+ por citometria de fluxo. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05).

2.3.3 Efeito do silenciamento de *Fzd4* em células MC3T3-E1 sobre a expressão gênica e proteica de RUNX2

O RUNX2 é o principal fator de transcrição durante a diferenciação osteoblástica, regula a expressão do osterix (*Sp7*), como dos genes da matriz óssea; osteopontina (*Spp1*), osteocalcina (*Bglap*), Colágeno (*Col1a1*), sialoproteína óssea (*Bsp*) (KOMORI et al., 1997; LIAN et al., 2003; KOMORI, 2011). A expressão proteica de RUNX2 foi menor em células *gFzd4* crescidas sobre Ti-Usinado (49,49%) e Ti-Nano (59,11%) aos 5 dias (Figura 12c-12d).

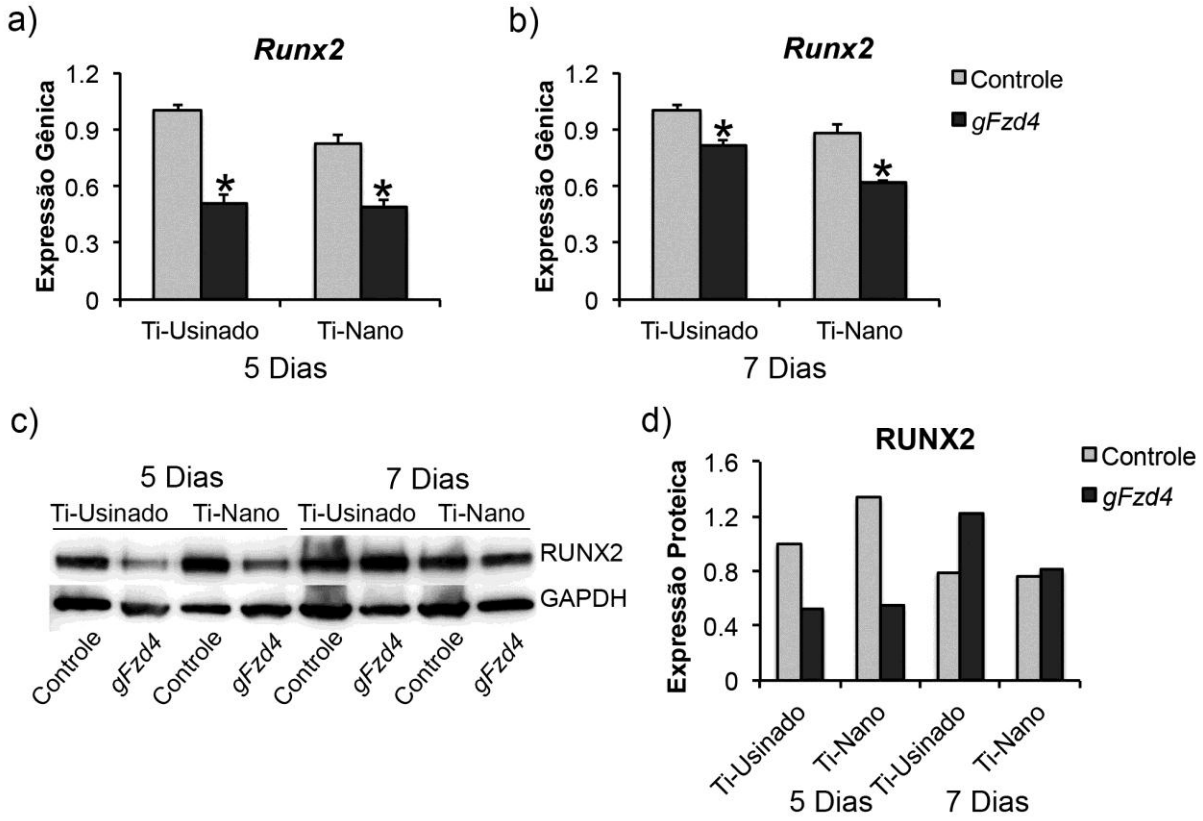

Figura 12. Efeito do silenciamento do *Fzd4*, sobre a expressão gênica e proteica de RUNX2 em células *gFzd4* crescidas sobre de Ti-Nano e Ti-Usinado. Expressão gênica de *Runx2* aos 5 dias (a) e 7 dias (b) em células *gFzd4*. Expressão proteica de RUNX2 (c-d) aos 5 e 7 dias em células *gFzd4.* Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05).

Os resultados revelam que o silenciamento do gene *Fzd4* tem impacto relevante na expressão gênica e proteica de RUNX2 aos 5 dias. Portanto, a avaliação da expressão gênica de maracadores osteoblásticos e expressão proteica de OPN foi realizada aos 5 dias. A expressão de ALP *in situ* foi realizada aos 10 dias e, aos 14 dias a expressão proteica de BSP e formação de matriz mineralizada.

2.3.4 Efeito do silenciamento de *Fzd4* sobre o genótipo osteoblástico em células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti-Nano

Os resultados da expressão gênica e proteica de RUNX2 (Figura 12), demostram que o efeito do silenciamento de *Fzd4* é mais relevante aos 5 dias. Portanto, escolhemos este período para realizar a avalização completa do genótipo osteoblástico.

A expressão gênica dos marcadores osteoblásticos em células *gFzd4* foi menor tanto sobre Ti-Usinado como sobre Ti-Nano para os genes *Osx* (Figura 13a, p=0.00187 e p=0.00603), *Alp* (Figura 13b, p=0.00025 e p=0.00015), *Col1a1* (Figura 13c, p=0.00001 e p=0.00003), *Bsp* (Figura 13d, p=0.00007 e p=0.00013) e maior para a *Opn* (Figura 13e, p=0.00018 e p=0.00018) respectivamente.

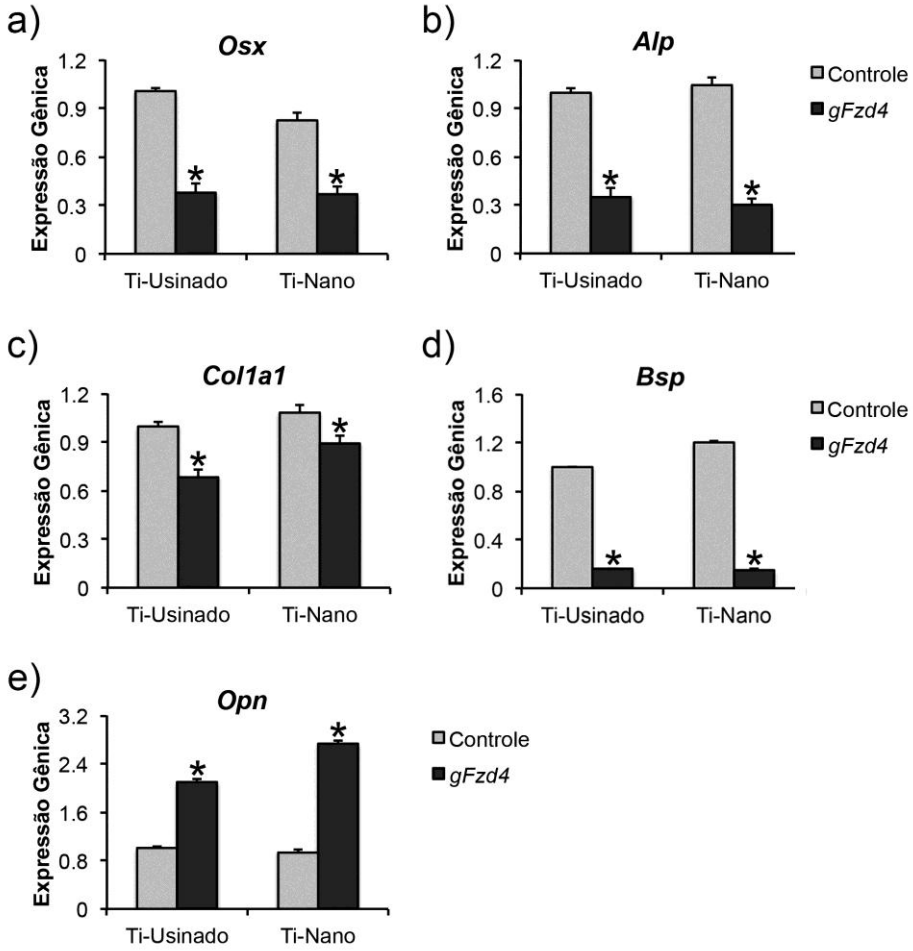

Figura 13. Efeito do silenciamento do *Fzd4*, sobre a expressão de marcadores osteoblásticos em células MC3T3-E1 crescidas sobre de Ti-Nano e Ti-Usinado. Expressão gênica de osterix *(Osx*), fosfatase alcalina *(Alp),* colágeno *(Col1a1),* sialoproteína óssea *(Bsp*) e osteopontina *(Opn*) de células *gFzd4* aos 5 dias. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05).

2.3.5 Efeito do silenciamento de *Fzd4* sobre o fenótipo osteoblástico em células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti-Nano

O efeito do silenciamento de *Fzd4* sobre o fenótipo osteoblástico foi avaliado por meio da análise das proteínas OPN aos 5 dias, ALP aos 10 dias e BSP e acumulação de matriz extracelular mineralizada aos 14 dias.

Aos 10 dias, após o silenciamento de *Fzd4* a expressão proteica de ALP *in situ* foi menor em células *gFzd4* crescidas sobre Ti-Usinado (86%, p=0.001) e Ti-Nano (81%, p=0.001) (Figura 14a-14b). Aos 5 dias, nota-se menor expressão proteica de OPN (Marcação em vermelho) em células *gFzd4* (Figura 14e-14f) e observa-se também que há maior marcação de OPN nas superfícies de Ti-Nano comparadas ao Ti-Usinado (Figura 14d-14f).

Aos 14 dias, a formação de matriz mineralizada foi maior (p=0.0305) sobre a superfície de Ti-Nano comparada ao Ti-Usinado e após o silenciamento de *Fzd4* sua expressão foi significativamente diminuída sobre o Ti-Nano (28%, p=0.001), entretanto, não houve diferença no Ti-Usinado (7%, p=0.072) (Figura 15a-15b).

A dupla marcação com vermelho de alizarina ARS (Vermelho) e sialoproteína óssea (BSP) (Verde) não revelou diferenças entre Ti-Nano (Figura 15d) e Ti-Usinado (Figura 15d), no entanto, após o silenciamento de *Fzd4,* a expressão de BSP foi maior em ambas as superfícies sendo, evidentemente, maior no Ti-Nano (Figura 15f) comparado ao Ti-Usinado (Figura 15e).

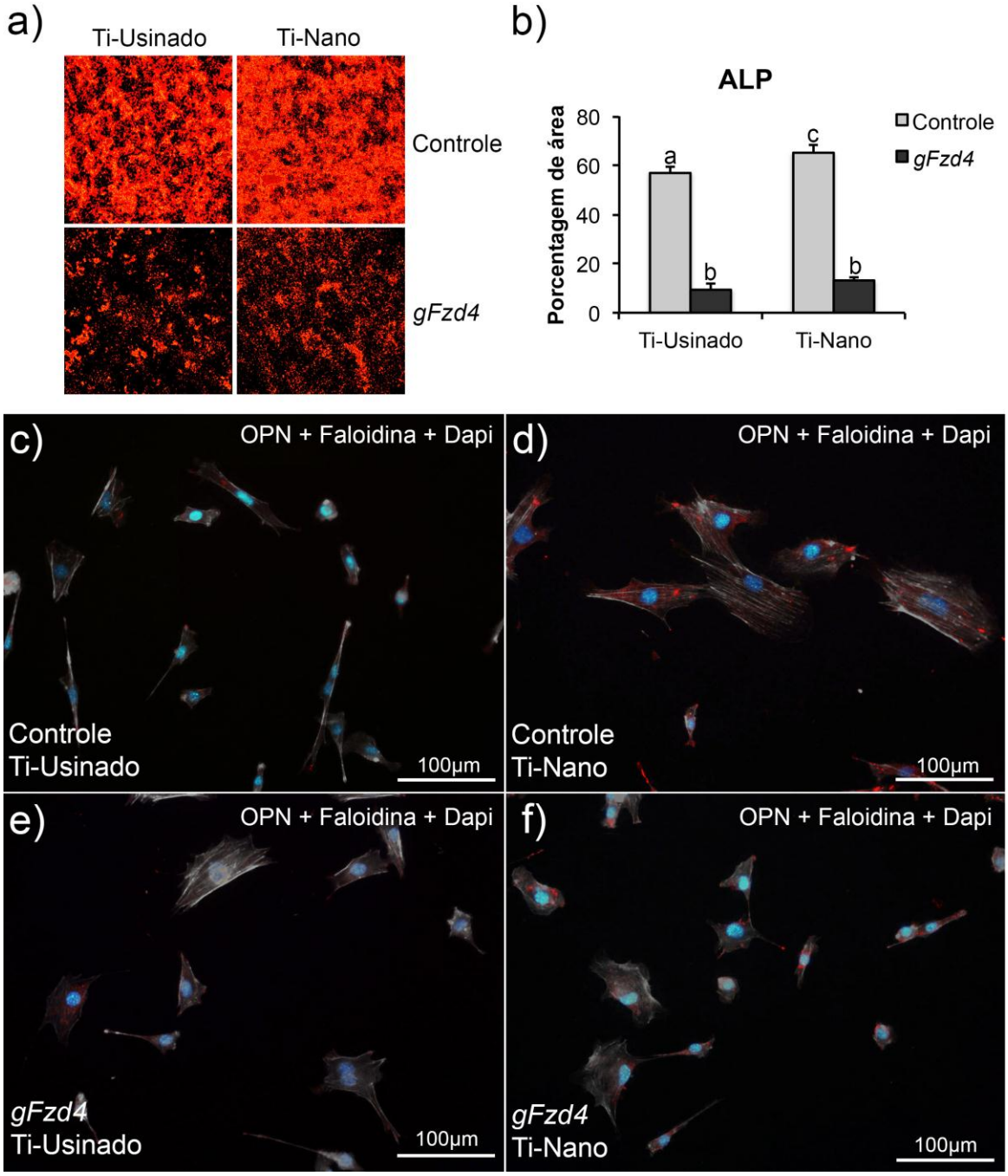

Figura 14. Efeito do silenciamento do *Fzd4* sobre a expressão do fenótipo osteoblástico em células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti-Nano e Ti-Usinado. Atividade de fosfatase alcalina (ALP) *in situ* aos 10 dias de *gFzd4* (a-b). Epifluorescência de osteopontina (OPN) aos 5 dias de células *gFzd4*. Fluorescência vermelha indica imunolocalização de OPN (c-f). Os dados quantativos são apresentados com média ± desvio padrão (n=15) ($p \leq 0,05$). Letras diferentes em minúscula indicam diferença estatisticamente significante. Barra de escala = 100 µm.

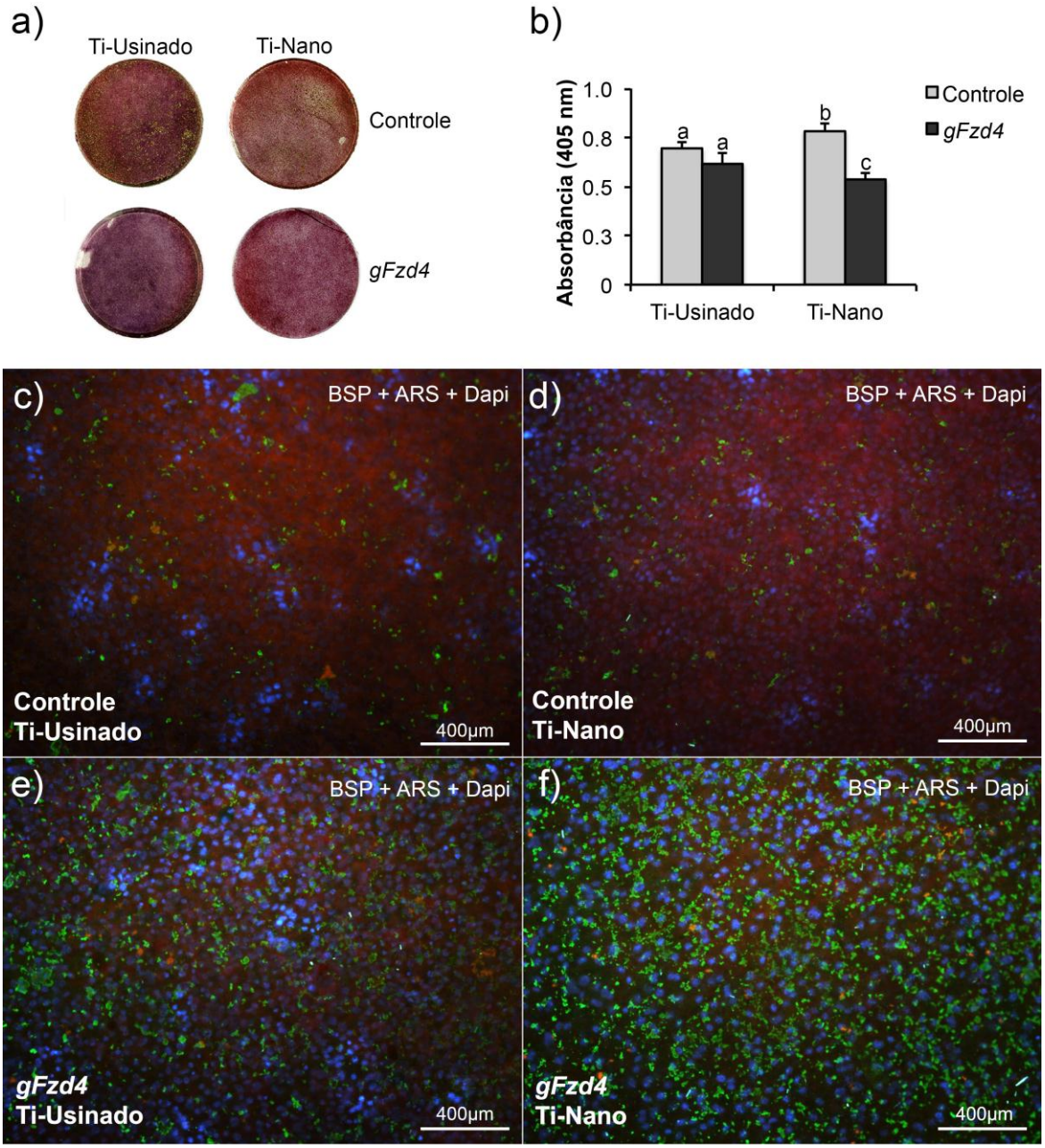

Figura 15. Efeito do silenciamento do *Fzd4*, sobre a expressão do fenótipo osteoblástico em células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti-nano e Ti-Usinado. Marcação de matriz mineralizada com vermelho de alizarina aos 14 dias de *gFzd4* (a-f). Epifluorescência de sialoproteína óssea (BSP) aos 14 dias de células *gFzd4* (c-f). Fluorescência verde indica imunolocalização de BSP e fluorescência vermelha indica marcação com vermelho de alizarina (A-D). Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=5) ($p \leq 0,05$). Barra de escala = 400 **µm.**

2.3.6 Efeito do silenciamento de *Fzd4* sobre alvos da via Wnt/β-catenina em células MC3T3-E1 crescidas sobre superfície de Ti-Nano

A ativação do complexo de receptores Frizzled produz a inibição da cascata de fosforilação que estabiliza os níveis de β-Catenina intracelular. Subsequentemente, a β-Catenina é translocada ao núcleo para formar complexos transcricionais DNA-ligantes β-Catenina/TCF/LEF. Este complexo regula diretamente o gene *Runx2* promovendo a formação óssea (GAUR et al., 2005). Considerando a menor expressão de RUNX2 aos 5 dias após o silenciamento de *Fzd4* (Figura 13) e, o efeito negativo no fenótipo osteoblástico (Figura 14-15), avaliamos o efeito do silenciamento de *Fzd4* sobre a expressão proteica de β-Catenina fosforilada, e dos genes *Lef* e *Tcf,* alvo da via Wnt/β-catenina.

Aos 5 dias, a expressão proteica de β-Catenina fosforilada foi menor no Ti-Nano comparado ao Ti-Usinado (p=0.006) e após o silenciamento de *Fzd4* a expressão de β-Catenina fosforilada sobre o Ti-Nano foi aumentada em um (11,32%, p=0.001) mas não sobre o Ti-Usinado (p=0.448) (Figura 16a e 16b). A expressão gênica do *Lef* (Figura 16c) foi menor sobre Ti-Usinado (p=0.001) mas não sobre Ti-Nano (p=0.303), entanto que a expressão génica de *Tcf* (Figura 16d) foi menor em ambas as superficies Ti-Usinado e Ti-Nano (p=0.001).

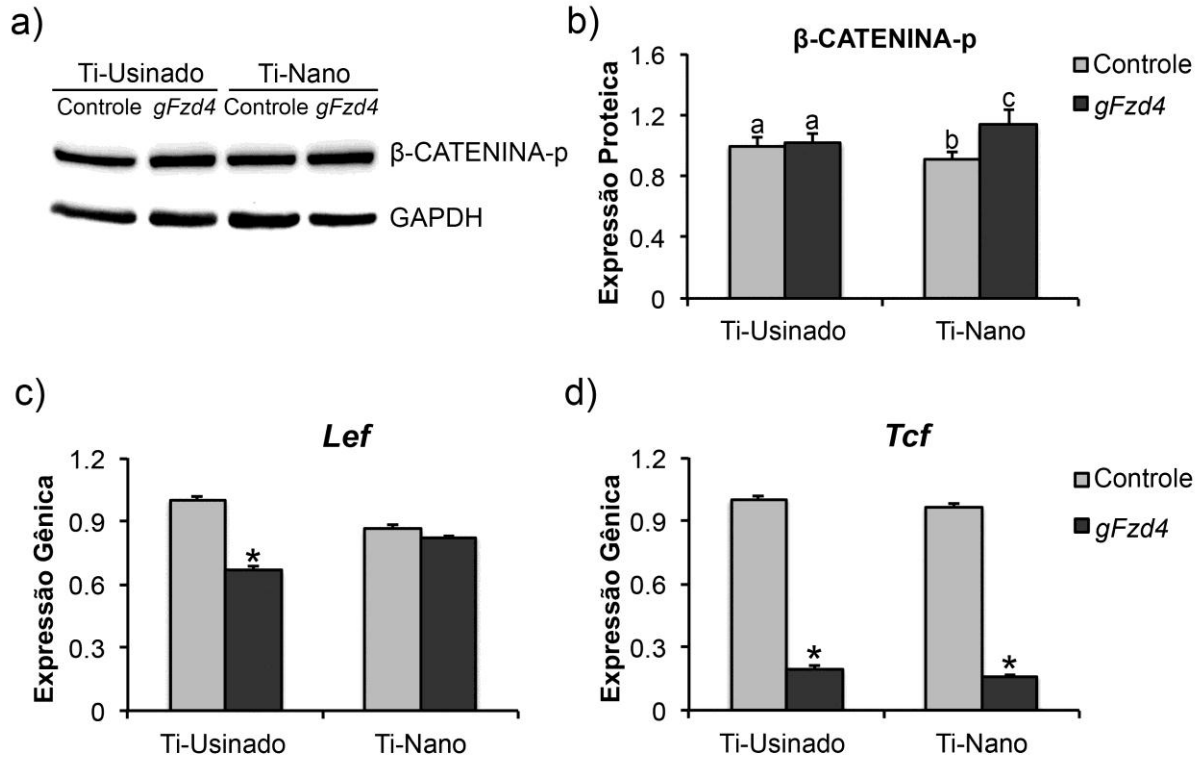

Figura 16. Efeito do silenciamento do *Fzd4*, sobre alvos da via Wnt/β-catenina em células MC3T3-E1 crescidas sobre superfície de Ti-Nano. Expressão proteica de β-Catenina fosforilada em células crescidas sobre Ti-Nano comparadas ao Ti-Usinado (a-b). Expressão gênica de *Lef* e *Tcf,* alvos da via Wnt/β-catenina em células *Fzd4* silenciadas aos 5 dias (c-d). Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * e letras diferentes em minúscula indicam diferença estatisticamente significante (p≤0,05).

2.3.7 Efeito do silenciamento de Fzd4 na expressão gênica dos componentes da via de sinalização BMP e Integrinas de células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti-Nano

Considerando a intercomunicação entre as vias de sinalização Wnt e as vias BMPs e Integrinas (DEJAEGER et al., 2017; LOPES et al., 2019), nós investigamos se o silenciamento de *Fzd4* poderia afetar a expressão gênica de componentes da via de sinalização das BMPs e das intengrinas em células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti-Nano.

A expressão gênica dos componentes da via das BMPs sobre Ti-Usinado e Ti-Nano; *Bmp4* (p=0.0006 e p=0.0005), *Bmpr1a* (p=0.06264 e p=0.00352), *Bmpr2* (p=0.00769 e p=0.00294), *Smad1* (p=0.0001 e p=0.0001), *Smad4* (p=0.0006 e p=0.00028) respectivamente, foi diminuída após o silenciamento de *Fzd4* (Figura 17a-17b). A expressão dos inibidores da via das BMPs sobre Ti-Usinado e Ti-Nano; *Grem* (p=0.0003 e p=0.00019), *Nogg* (p=0.00683 e p=0.00497), *Smad7* (p=0.06019 e p=0.00327), *Smad1* (p=0.000) e *Smurf1* (p=0.00757 e p=0.00814) foi aumentada após silenciamento do *Fzd4* (Figura 17c-17d). A expressão sobre Ti-Usinado e Ti-Nano de *Chrd* (p=0.08365 e p=0.00237), *Smad6* (p=0.006 e p=0.43069) e *Smurf2* (p=0.46609 e p=0.99186) não foi afetada após o silenciamento de *Fzd4* (Figura 17c-17d).

A expressão gênica dos componentes da via das integrinas sobre Ti-Usinado e Ti-Nano; *Itgb1* (p=0.0121 e p=0.0022), *Itga1* (p=0.0022 e p=0.0056), *ItgV* (p=0.0404 e p=0.0423), *Ptk2* (p=0.0214 e p=0.0122) foi respectivamente diminuída após o silenciamento de Fzd4 (Figura 18a-18b)

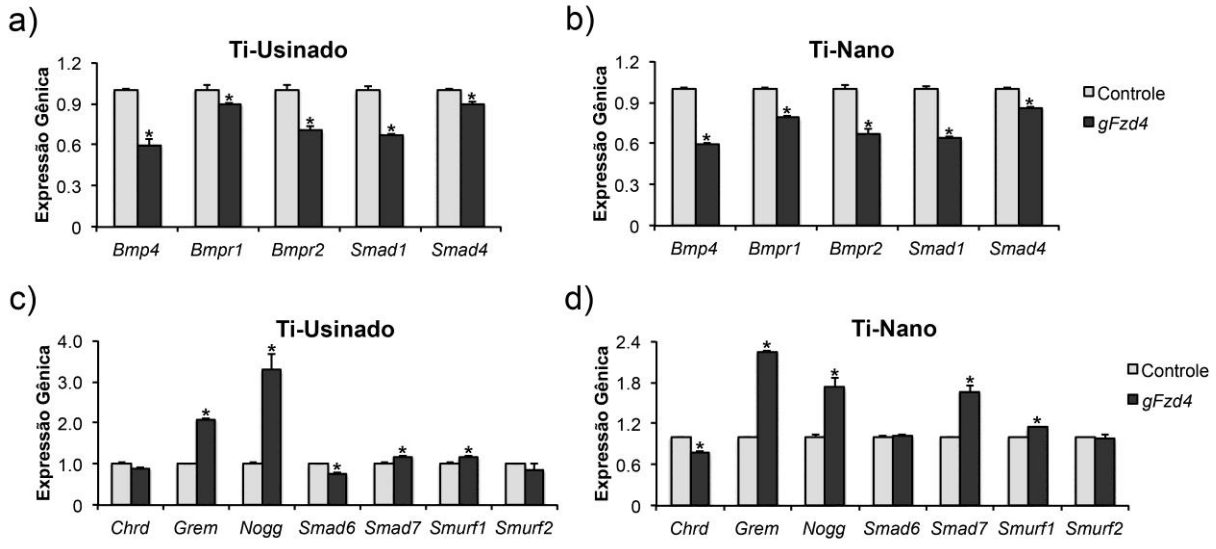

Figura 17. Efeito do silenciamento do *Fzd4*, sobre a expressão de marcadores da via BMP em células MC3T3-E1 crescidas sobre superfície de Ti-nano. Expressão gênica de *Bmp4, Bmpr1, Bmpr2, Smad1, Smad4* (a-b) e *Chrd, Grem, Nogg, Smad6, Smad7, Smurf1 e Smurf2* (c-d) de células *gFzd4* aos 5 dias de cultura em meio osteogênico. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05).

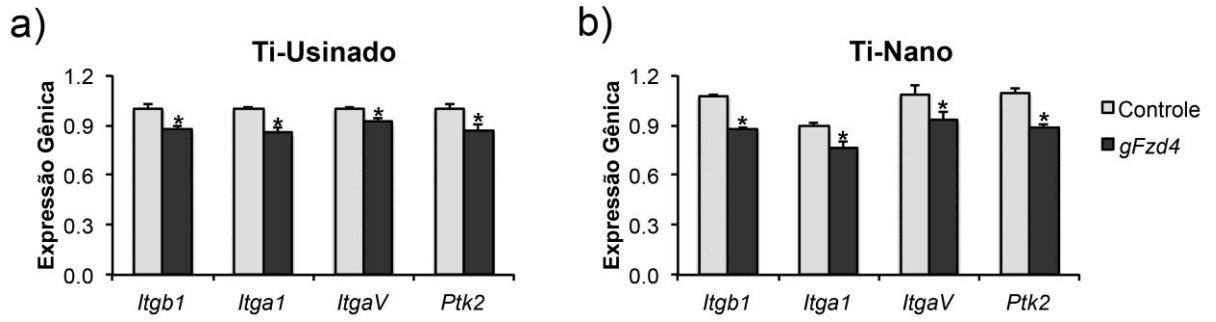

Figura 18. Efeito do silenciamento do *Fzd4*, sobre a expressão de genes da via das Integrinas em células MC3T3-E1 crescidas sobre superfície de Ti-nano. Expressão gênica de integrina-**β**1 (*Itg**β**1*), integrina ∝1 (*Itg∝1*), integrina ∝V (*Itg*∝V) e proteína tirosina quinase 2 (*Ptk2*) (a-b) de células *gFzd4* aos 5 dias de cultura em meio osteogênico. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * Indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05).

2.4 DISCUSSÃO

Em estudos anteriores, demostrou-se que a superfície de Ti-Nano modula mecanismos intracelulares produzindo uma melhor resposta biológica e consequente osteogênese (KATO et al., 2014; ROSA et al., 2014; CASTRO-RAUCCI et al., 2016; ZHUKOVA et al., 2017; SOUZA et al., 2018; LOPES et al., 2019). Os mecanismos previamente estudados incluem a participação da via das Integrinas e BMPs e, adicionalmente, observou-se que a intercomunicação dessas vias com a via Wnt contribui com o potencial osteogênico da nanotopografia (LOPES et al., 2019). Entretanto, apesar de a via Wnt ser fundamental para o desenvolvimento do tecido ósseo (ZHONG et al., 2014; WANG Y et al., 2014; LI et al., 2018), sua participação no potencial osteogênico de superfícies de Ti-Nano ainda é incerta (OLIVARES-NAVARRETE et al., 2011; WANG W, et al., 2012; GUOLI et al., 2016). Portanto, neste capítulo procuramos entender melhor a participação da via Wnt/β-catenina no potencial osteogênico da superfície de Ti-Nano.

Utilizando a técnica CRISPR-dCas9-KRAB, demostramos que o silenciamento do gene *Fzd4* produz inibição do genótipo e fenótipo osteoblástico de células crescidas sobre superfícies de Ti-Nano (Figura 13-14-15) e essa diminuição é decorrente do aumento da β-Catenina fosforilada (11%) seguida da diminuição de expressão dos genes *Tcf/Lef*. O silenciamento de *Fzd4* em torno de 40% (Figura 11) foi atingido usando um único gRNA (Figura 9e-9f). A escolha da sequência alvo do gRNA pode afetar significativamente o desempenho do sistema CRISPR-Cas9 (PETERS et al., 2016; MOREB et al., 2017) e, apesar de a eficiência de repressão pela dCas9-KRAB ser incrementada quando utilizados vários gRNAs simultaneamente em mais de um alvo no DNA (STERNBERG e DOUDNA, 2015; FONTANA et al., 2018) durante a clonagem dos nossos vetores, o melhor resultado foi obtido com um único gRNA. A eficiência de repressão do *Fzd4* foi confirmada pela menor expressão dos genes alvo da via Wnt, *Tcf* (80%) *e Lef* (25%) (Figura 11).

Na literatura, apenas um estudo mostra o efeito da inibição de FZD4 em células MC3T3-E1. Shi e colaboradores (2015), em um estudo sobre o efeito inibitório de glucocorticóides, demostraram que aos 5 dias de diferenciação osteoblástica, o microRNA-199a-5p inibe o sítio de ligação 3'-UTR de *Fzd4* e *Wnt2*, diminuindo drasticamente a proliferação de células MC3T3-E1 e de calvaria de camundongos,

comprometendo assim, o fenótipo osteoblástico (SHI et al., 2015). Em outro estudo, usando RNA de interferência para *Fzd4* em células-tronco mesenquimais de medula óssea foi descrita a diminuição da expressão da RUNX2 seguida da inibição do fenótipo osteoblástico (QINGGUO et al., 2018). De igual forma, nossos resultados mostram aos 5 dias a diminuição da proteína RUNX2 quando silenciado o gene *Fzd4* (Figura 12c-12d), evidenciando eventualmente a participação do receptor FZD4 na regulação da diferenciação osteoblástica sobre superfície de Ti-Nano.

Qingguo e colaboradores (2018) também descreveram a menor regulação dos genes *Fzd4, Fzd6 e Fzd7, Wnt5a* e *Wnt9a* em modelo animal e em pacientes com osteoporose e demonstraram que a modulação de marcadores osteoblásticos é dependente da interação WNT5a-FZD4. Nossos resultados também evidenciam a maior expressão de *Wnt5a* aos 5 dias em células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti-Nano (Capítulo 1; Figura 4a). O ligante WNT5a comumente é associado à via não canônica, por inibir a β-Catenina quando ligada ao correceptor ROR2 (MIKELS e NUSSE., 2006) ou por antagonizar a sinalização Wnt/β-catenina, ativando a via WNT/Ca^{2+}. Entretanto, também foi descrito que a WNT5a pode participar tanto da inibição como da ativação da via Wnt/β-catenina, pois foi demostrada sua capacidade de regular autonomamente a expressão de LRP5/6, promovendo a diferenciação osteoblástica e produzindo a inibição da diferenciação adipocítica (OKAMOTO et al., 2014; GUOLI et al., 2016). Além disso, a associação de WNT5a e FZD4/LRP5 foi capaz de ativar a via Wnt/β-catenina em células HEK293 (MIKELS e NUSSE, 2006). Recentemente, Boyan e colaboradores (2018) sugerem que a maior diferenciação osteoblástica da superfície com micro/nanotopografia acontece em decorrência da interação entre o ligante WNT11 e WNT5a, porém não estabelece claramente a participação da via Wnt/β-catenina ou das vias não canônicas Wnt sobre essa superfícies.

Desde as primeiras publicações envolvendo Wnts, sabe-se que os receptores FZD tem uma tendência a ativar a via Wnt/β-catenina (SHIMIZU et al., 1997), como por exemplo o FZD4, que é um importante mediador da via Wnt/β-catenina para o desenvolvimento da retina e da angiogênese (ROBITAILLE et al., 2002). A via Wnt/β-catenina inicia quando o receptor FZD recruta os correceptores LRP5/6 em um complexo oligomérico denominado signalossoma (BILIC et al., 2007; SCHAEFER et al., 2019). No citoplasma, o complexo formado pelo CK1, DVL e GSK3β produz a estabilização do regulador transcricional β-Catenina, que é translocado ao núcleo para

ativar os mediadores de transcrição TCF/LEF (MACDONALD et al., 2009; CLEVERS e NUSSE, 2012;).

O RUNX2 é o fator de transcrição essencial mais upstream da diferenciação osteoblástica regulando a expressão de osterix (*Sp7*) e os subsequentes genes da matriz óssea: *Alp, Col1a1, Ibsp, Oc* e *Opn* (LIAN et a., 2003; KOMORI et a., 2011; KOMORI, 2017). A diminuição da expressão da proteína RUNX2 após o silenciamento do gene *Fzd4,* além de diminuir a expressão de genes marcadores osteoblásticos (Figura 13), evidencia que os cofatores de transcrição TCF/LEF estão envolvidos, uma vez que, durante a diferenciação osteoblástica existe uma regulação recíproca entre RUNX2 e *Tcf*. Essa regulação acontece porque um complexo proteico formado por DLX5/6, MEF2, CTNNB1, SOX5/6, SMAD1, SP7 e TCF7 regula a expressão da proteína RUNX2, e em contrapartida o RUNX2 regula a expressão gênica do *Tcf7* (HOEPPNER et al., 2009; MIKASA et al., 2011; YOSHIDA et al., 2012; KOMORI et al., 2017).

Nossos resultados evidenciam que após o silenciamento de *Fzd4* houve menor expressão de ALP *in situ* sobre Ti-Usinado (86%) e Ti-Nano (81%). Também observamos que o silenciamento de *Fzd4* produz um impacto negativo na formação de matriz mineralizada sobre o Ti-Nano (28%) comparado ao Ti-Usinado (7%) (Figura 15a-15b). Entretanto, observamos que a expressão de BSP foi maior após inibição do *Fzd4,* e maior no Ti-Nano comparado ao Ti-Usinado (Figura 15e-15f).

Corroborando nossos resultados, Wang W e colaboradores, em 2012, descreveram que superfícies com modificações em micro/nanoescala levam à modulação de WNT3a e inibem o DKK1 e SFRP2, ativando assim a via Wnt/β-catenina em um ciclo autócrino/parácrino que promove a diferenciação celular. Outros estudos avaliando a resposta celular sobre superfícies com microtopografia demostraram que a via de sinalização Wnt/β-catenina é relevante na fase inicial da diferenciação osteoblástica, enquanto a via não-canônica WNT/Ca^{2+} é mais crítica nas fases posteriores (OLIVARES-NAVARRETE et al., 2010). No entanto, em estudo posterior, os mesmos autores sugeriram que a sinalização WNT canônica não desempenha um papel crucial no processo de diferenciação (OLIVARES-NAVARRETE et al., 2011).

A interação entre BMPs, Integrinas e Wnt sobre superfícies de Ti-Nano tem sido relatada recentemente (LOPES et al., 2019). Foi observado que o silenciamento

da integrina β3 produz a diminuição de genes reguladores de BMP e genes relacionados à via Wnt/β-catenina sugerindo que a integrina β3 ativa sinais de transdução de Wnt e BMP (LOPES et al., 2019). Com o objetivo de verificar a interação entre essas vias em células *Fzd4* silenciadas, avaliamos a expressão gênica de marcadores de BMP (Figura 17) e integrinas (Figura 18), sugerindo a interação entre a via Wnt/BMP/integrina. No entanto, percebe-se que o efeito do silenciamento da integrina β3 sobre a via Wnt (LOPES et al., 2019) produziu, em células cultivadas sobre Ti-Nano, maior inibição da expressão gênica comparado ao efeito do silenciamento de *Fzd4* sobre a via das integrinas (Figura 18b). A observação destas diferenças sugere que a regulação da via das integrinas acontece upstream da via Wnt. Na via das integrinas, a proteína ILK (ILK, do inglês: integrin-linked kinase) exerce papel de adaptador entre integrinas, citoesqueleto e proteínas que regulam outras vias de sinalização como demonstrado por El-Hos e colaboradores (2014), em que a inibição de ILK em células MC3T3-E1 reduz a fosforilação do GSK3β (EL-HOS et al., 2014; MARIE et al., 2014). Contudo, apesar de demostrar que existe interação entre as vias Wnt/integrina, não evidenciamos que essas diferenças sejam decorrentes do efeito da superfície de Ti-Nano comparado ao Ti-Usinado (Figura 18a-18b).

Tem sido demostrado que o maior potencial osteogênico da superfície de Ti-Nano está relacionado a dois mecanismos intracelulares: à via das BMPs e à via das Integrinas (KATO et al., 2014, ROSA et al., 2014; CASTRO-RAUCCI et al., 2016; LOPES et al., 2019). Entretanto, a via Wnt, sabidamente envolvida no processo de diferenciação osteoblástica (GAUR et al., 2005; LERNER e OHLSSON, 2015) tem sido pouco estudada em experimentos envolvendo superfícies de Ti-Nano (BOYAN et al., 2018). Nossos resultados evidenciam que, após silenciamento do gene *Fzd4,* houve uma diminuição relevante da expressão do genótipo e fenótipo osteoblástico de células MC3T3-E1 crescidas sobre a superfície de Ti-Nano; além disso, a inibição do *Fzd4* também produziu o aumento da expressão de β-Catenina fosforilada e diminuição da expressão de *Tcf* e *Lef* sobre Ti-Nano, indicando que a via Wnt/β-catenina está envolvida no maior potencial osteogênico da superfície de Ti-Nano.

2.5 CONCLUSÃO

- Nossos resultados indicam que o maior potencial osteogênico da nanotopografia deve-se, ao menos em parte, à ativação da via de sinalização Wnt/β-catenina, uma vez que o silenciamento do gene *Fdz4* reduziu mais intensamente a diferenciação osteoblástica de células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti-Nano comparado ao Ti-Usinado.

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO DO RECEPTOR FRIZZLED 6 (FZD6) SOBRE O POTENCIAL OSTEOGÊNICO DA SUPERFÍCIE DE TI-NANO

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito do silenciamento de gene relacionado à via de sinalização Wnt não canônica, Frizzled 6, sobre o potencial osteogênico da superfície de Ti-Nano em culturas de células osteoblásticas da linhagem MC3T3-E1

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Linhagem celular MC3T3-E1

Células da linhagem MC3T3-E1, subclone 14, obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, EUA) foram utilizadas para a geração dos clones mutantes, como descrito no capítulo 1.

3.2.2 Desenho do plasmídeo CRISPR-Cas9 específico para o gene *Fzd6* de *Mus musculus*.

Um plasmídeo *all in one* (gRNA-Cas9-GFP) foi desenhado pela Sigma-Aldrich (Sant Louis, USA) codificando um gRNA específico para o exon 3 do gene *Fzd6* com a sequência TCATGTAGTTCTACCCTGT (Cromossomo: GRCm38:15:39,006,034-39,038,188) (Figura 19). O gRNA com 20 pares de bases, foi selecionado considerando a melhor pontuação para “on-target” e pior pontuação para “off-target” usando a ferramenta online Benchling. (https://benchling.com).

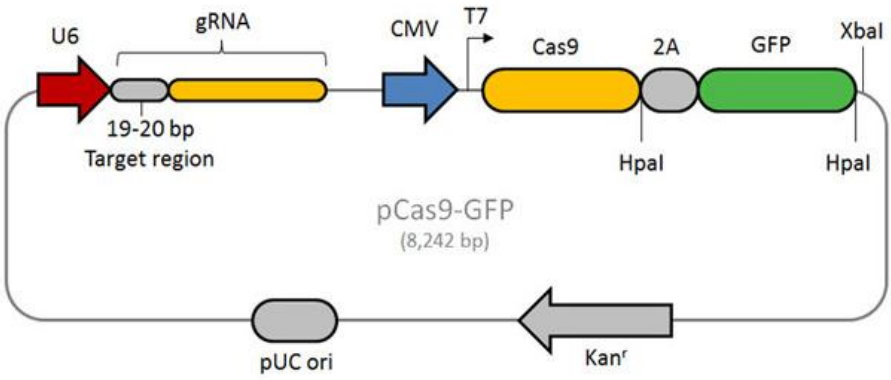

Figura 19. Plasmídeo CRISPR-Cas9 para o gene *Fzd6* de *Mus musculus*. Plasmídeo all in one desenhado pela Sigma-Aldrich contendo um gRNA específico para o exon 3 do gene *Fzd6*. A sequência codificante de Cas9 ligada coma sequência condificante de GFP.

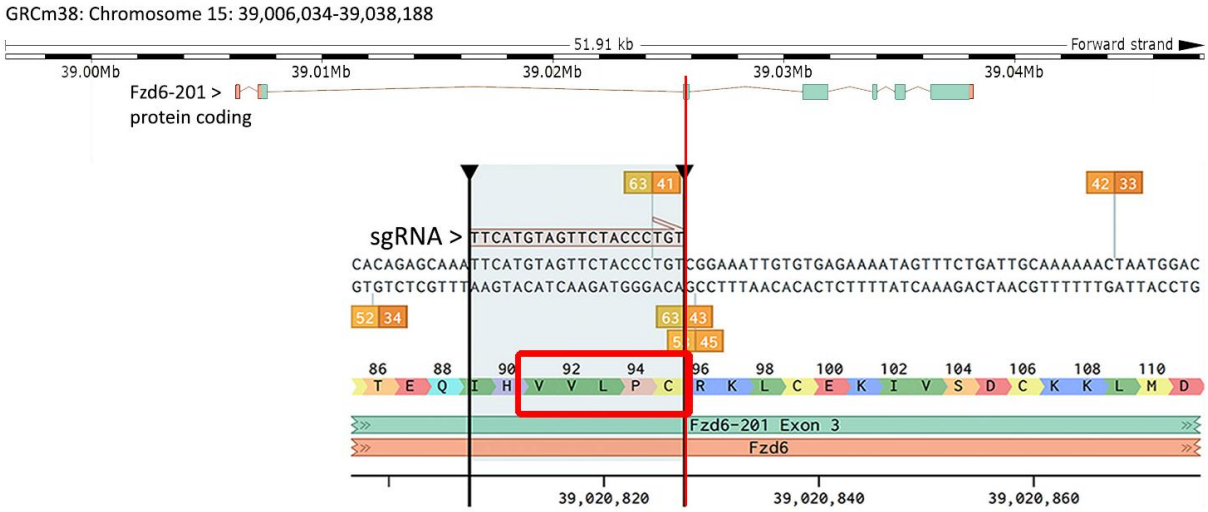

Figura 20. Desenho e confirmação da localização do gRNA no exon 3 do gene *Fzd6* de *Mus musculus* na plataforma online Benchling.

3.2.3 Preparação de bactérias competentes e transformação bacteriana

Bactérias *E. coli Stbl3* quimicamente competentes foram preparadas e transformadas pelo método de cloreto de cálcio gelado por meio do choque térmico de acordo com protocolos já descritos (HANAHAN, 1983). Então os clones bacterianos do (CRISPR-Cas9-*gFzd6*-GFP) foram semeados por esgotamento em placas de Petri de 100 mm contendo meio de Luria Bertani Agar (Fisher Scientific, Bélgica) e kanamicina (50µg/mL, Sigma Aldrich) para obtenção de colônias individualizadas. Uma colônia foi selecionada e transferida para um tubo contendo

meio de Luria-Bertani Broth (Fisher Scientific) suplementado com 100µg/mL de ampicilina e mantidas overnight a 37°C sob agitação a 250 rpm em Shaker de bancada (Thermo Scientific) para favorecer a proliferação das bactérias. Na sequência, realizou-se extração do DNA plasmidial por meio do kit Qiaprep Spin Miniprep kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. A concentração dos plasmídeos foi quantificada a partir de 2 µL de amostra no aparelho NanoVue (GE Healthcare). Além do (CRISPR-Cas9-*gFzd6*-GFP) desenhado para o gene *Fzd6*, também foi selecionado um gRNA não específico, sem o gRNA sendo denominado (Controle).

3.2.4 Transfecção de células MC3T3-E1 com o plasmídeo CRISPR-Cas9 e lipofectamina

Células MC3T3-E1 foram descongeladas, expandidas em meio de crescimento plaqueadas na densidade de $1x10^5$ células/poço em placas de 6 poços de poliestireno. Após 24 horas, na confluência de 70% as células foram submetidas a transfecção utilizando o plasmídeo CRISPR-Cas9-*gFzd6*-GFP e o plasmídeo sem o gRNA. Os plasmídeos foram transfectados na concentração de 2,5 µg/poço utilizando o reagente lipofectamina 3000 (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, o complexo foi preparado em Opti-MEM (Gibco-Life Technologies), utilizando a proporção de 1:2:2, respectivamente, de DNA (µg), reagente P3000 (µL) e lipofectamina 3000 (µL) e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos previamente à adição nas culturas.

3.2.5 Sorting de células únicas GFP positivas

O plasmídeo CRISPR-Cas9 utilizado codifica a proteína GFP, facilitando a identificação da eficiência de transfecção por fluorescência direta. As células foram transfectadas e cultivadas durante 48 horas e então foram tripsinizadas, coletadas e suspensas em 500 µL de meio de crescimento en um tubo falcon de 15 mL. As células foram separadas em razão da sua expressão de GFP através de um citometro de fluxo (FACSAria III (Bechkton Dickinson, Franklin Lakes, NJ. USA). Células únicas foram colocadas consecutivamente em uma placa de 96 poços contendo 100 µL de meio de crescimento e incubadas a 37ºC, 5% de CO_2. O crescimento das células foi

acompanhado com um microscópio invertido por um período aproximado de 5 semanas com troca de meio a cada 36 horas. As células que sobreviveram ao processo de transfecção, sorting e expansão em cultura foram repicadas sucessivamente em placa de 96 poços e, quando confluentes, as culturas foram transferidas, clone a clone para uma placa de 24 poços, e depois para uma de 6 poços, e por último para uma garrafa de 25 cm^2 (Corning) (Figura 22). Os clones então foram conservados na temperatura de 80ºC negativos seguindo o procedimento de criopreservação convencional.

3.2.6 Identificação de mutações geradas em clones MC3T3-E1 GFP positivos

O desenho experimental comtemplava seguir com a purificação do amplicon por PCR convencional do exon 3 de *Fzd6*, ensaio da enzima T7 endonuclease, sequenciamento de DNA pelo método de Sanger e finalmente as análises bioinformáticas para a caracterização molecular das células mutadas. No entanto, a pesar de diversas repetições, não foi possível obter o fragmento amplificado. Consequentemente, utilizamos outra estratégia para avaliar a eficiência do CRISPR-Cas9. Em cada clone gerado avaliamos a expressão gênica e proteica do FZD6. Para isso, um total de 45 clones transfectados com o plásmideo CRISPR-Cas9-*gFzd6* e 52 clones trasfectados com o controle foram crescidos em meio de crescimento e avaliados por Western Blot e PCR em tempo real como descrito previamente.

3.2.7 Detecção de fosfatase alcalina (ALP) *in situ*

A atividade de ALP foi avaliada qualitativamente pelo método Fast red (Majors et al., 1997). Como descrito no capítulo 2.

3.2.8 Formação de matriz mineralizada

A detecção de matriz mineralizada foi realizada aos 14 dias de cultura. Ao final deste período, o meio de cultura foi removido, os discos lavados três vezes com solução de Hank (Gibco) aquecida a 37°C e preenchidos com álcool a 70% por 1h a 4ºC. Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com PBS, seguido de uma

lavagem com H_2O deionizada e processados para coloração com vermelho de alizarina (Sigma) por 15 minutos.

As amostras foram depois examinadas sob epifluorescência, utilizando um Axio Imager - Microscópio de fluorescência M2 (Carl Zeiss, Göttingen, GO, DE) equipado com uma câmera digital Axiocam MRM (Carl Zeiss).

As imagens adquiridas foram processadas usando o software Adobe Photoshop CS6 Extended, versão 13.0.4 (Adobe Systems, San Jose, CA, EUA). E analisadas em três campos escolhidos de forma randomizada em cinco discos de cada grupo (n=15) para ambos os discos Ti-Usinado e Ti-Nano no software ImageJ 1.52 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Os resultados foram expressos como quantificação de pixels por área total.

3.2.9 Análise estatística

Os dados da expressão gênica em tempo real foram obtidos em triplicata (n=3) e submetidos ao Teste *t* Student utilizando o programa SigmaPlot (Systat Software) para comparações dentro de cada período e, para comparações múltiplas foram submetidos aos testes de aderência à curva normal e homogeneidade de variâncias. Constatada a normalidade da distribuição amostral, foi aplicada a análise de variância (ANOVA one-way), seguida de pós-teste Student Newman Keuls.

Os dados da atividade de ALP *in situ* e os dados do ensaio de mineralização foram obtidos em três campos escolhidos de forma randomizada em cinco discos de cada grupo (n=15) foram submetidos aos testes de aderência à curva normal e homogeneidade de variâncias. Constatada a normalidade da distribuição amostral, foi aplicada a análise de variância (ANOVA one-way), seguida de pós-teste Student Newman Keuls. Para todos os testes o nível de significância foi de 5% ($p \leq 0,05$).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Separação de células MC3T3-E1 transfectadas com plasmídeo CRISPR-Cas9-GFP específico para o exon 3 do *Fzd6*

Analisando o número total de eventos reportados tanto para as células controle como para as células transfectadas (10.000 eventos mínimos) observou-se que em comparação às células controles, as células transfectadas apresentam 3% de sobrevivência (310 eventos) indicando que a taxa de mortalidade após o tratamento com lipofectamina é alta. No entanto, o processo permitiu coletar uma quantidade suficiente de células sobreviventes para amplificar em cultura e visto que o alvo principal seria obter pelo menos um clone mutante, as condições de tratamento selecionadas não foram alteradas. Nossos resultados mostraram que apenas as células transfectadas expressam GFP (Figura 21) sendo possível sua separação por citometria de fluxo. Ao final, 310 células GFP positivas foram recuperadas o que representa 3% do total de células transfectadas.

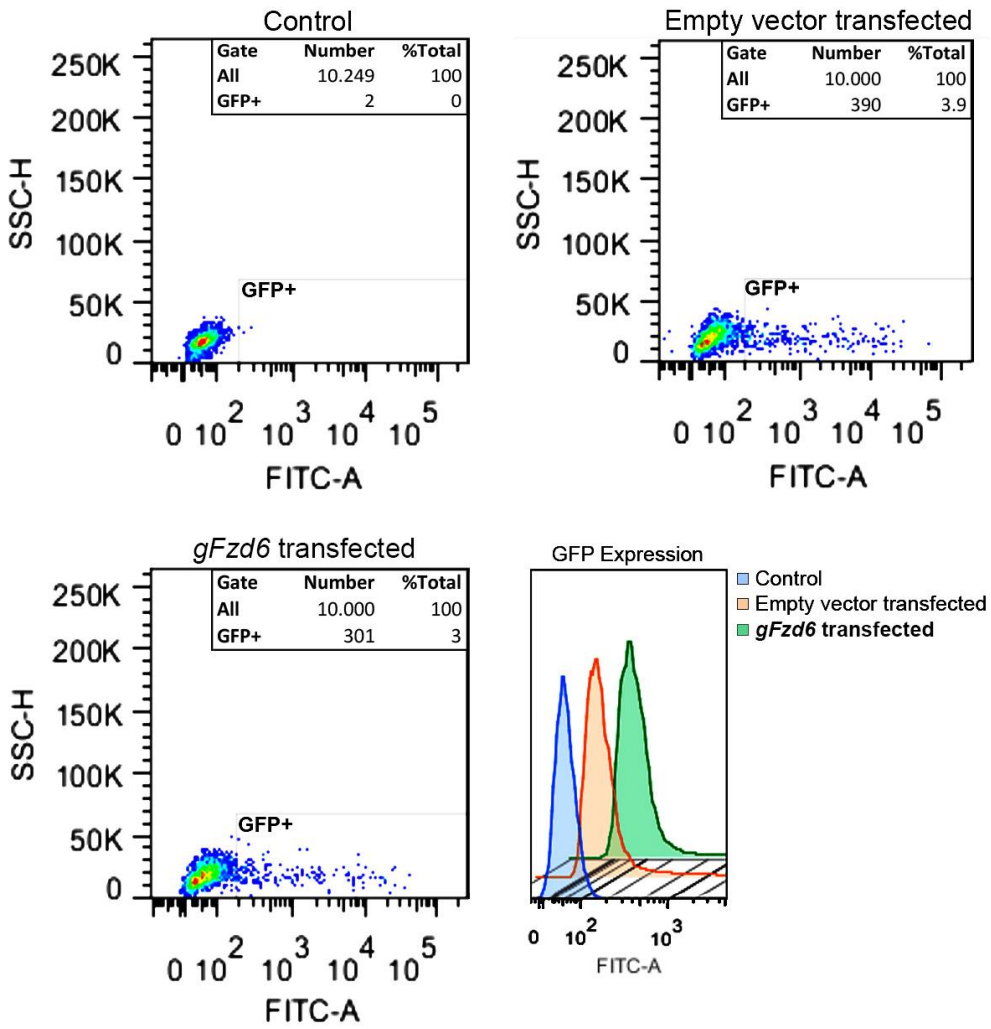

Figura 21. Separação (Sorting por citometria de fluxo) de células MC3T3-E1 transfectadas com o plasmídeo CRISPR-Cas9 específico para o exon 3 do gene *Fzd6* e o plasmídeo CRISPR-Cas9 não específico. Apenas as células transfectadas são positivas para GFP+ indicando que o processo de transfecção foi bem sucedido

3.3.2 Amplificação de clones de MC3T3-E1 GFP+ em cultura

As células transfectadas cultivadas como clones isolados foram acompanhadas ao longo de aproximadamente 5 semanas, das 301 células recuperadas inicialmente 45 células com CRISPR-Cas9-*gFzd6* sobreviveram, e 52 células transfectadas com CRISPR-Cas9 não especifico de 390 células contabilizadas como GFP+. Para cada um dos clones GFP+ que sobreviveram, o RNA e a proteína foram extraidos para avaliarmos a expressão gênica e proteica diminuidas decorrentes de uma possível mutação no receptor FZD6.

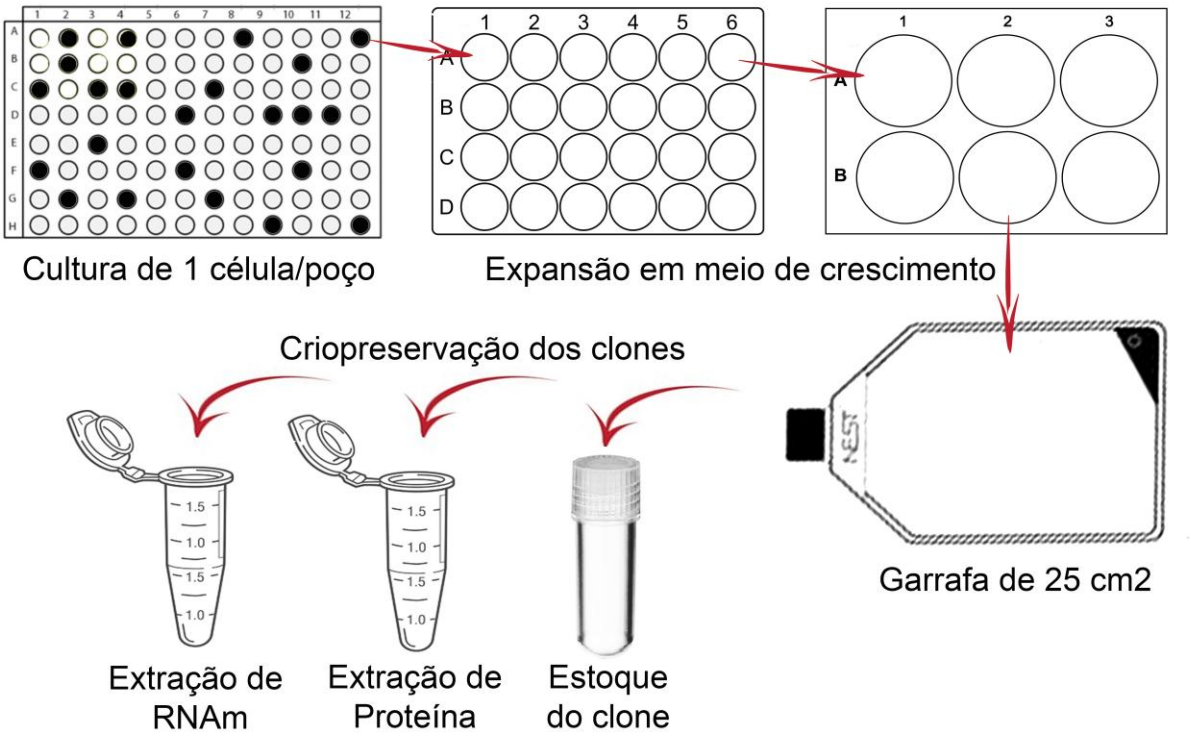

Figura 22. Estratégia de expansão monoclonal para análise de RNAm, proteína e estocagem dos clones selecionados.

3.3.3 Efeitos das mutações geradas pelo sistema CRISPR-Cas9 sobre a expressão proteica de FZD6

Os resultados apresentados na figura 23 evidenciam células MC3T3_E1 mutadas com menor expressão proteica de FZD6, particularmente o clone 1 e 41 evidenciam uma diminuição completa na banda 79kDa. A expressão proteica de FZD6 é maior nos grupos de células transfectadas com CRISPR-Cas9 não específico (Controle) nos clones 21, 22 e 97.

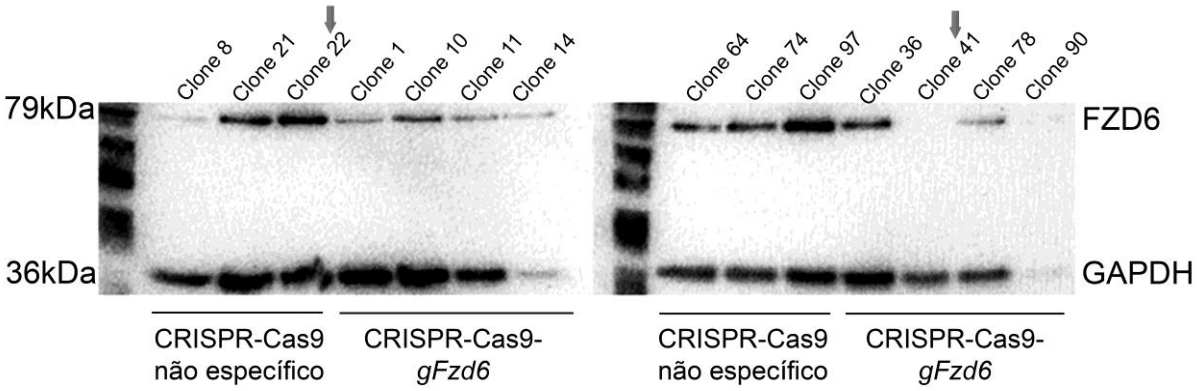

Figura 23. Western blot evidenciando a diminuição da proteína FZD6 (∽79kDa) no clones mutantes 1, 10, 11, 14, 78, e sua ausência no clone mutante 41 e 90 comparado às células transfectadas con CRISPR-Cas9 não específico, que evidenciam uma marcação forte para os clones 21, 64, 74 e particularmente os clones 22 e 97.

3.3.4 Efeitos das mutações geradas pelo sistema CRISPR-Cas9 sobre a expressão de RNAm de *Fzd6*

A quantificação relativa dos transcritos de *Fzd6* mostra uma redução significativa para o clone 41 correspondente ao clone transfectado com CRISPR-Cas9-*gFzd6* quando comparado ao clone 22 correspondente ao clone transfectado com CRISPR-Cas9 não específico, nos níveis de *Fzd6 e Lef* (Figura 24a-24c, p=0.00007), *Runx2* (Figura 24b, p=0.00017). O clone 97 apresenta expressões menores comparadas ao clone 22 (Figura 24a-24c, *Fzd6*, *Lef*, p=0.0001; *Runx2*, p=0.0007), apesar de que previamente tinha se mostrado com similar expressão proteica de FZD6 (Figura 23).

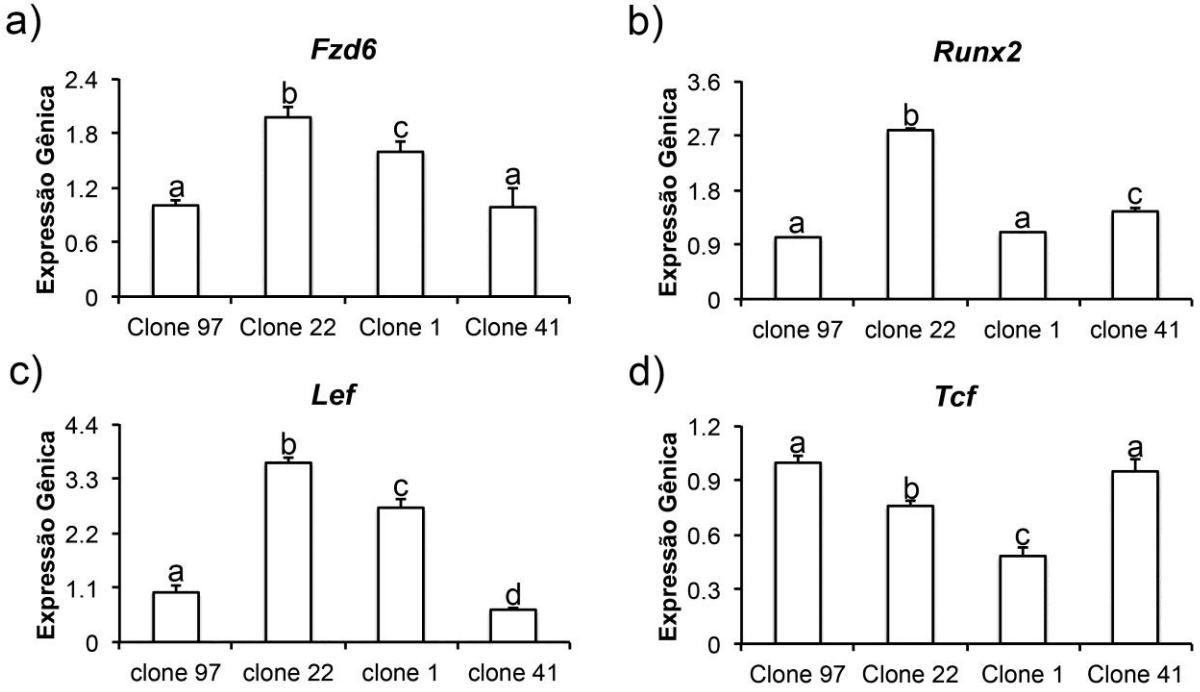

Figura 24. Expressão gênica para validação da eficiência do sistema all in one CRISPR-Cas9-*gFzd6* para silenciar o gene *Fzd6*, em clones pré-selecionados pela expressão proteica. Expressão dos genes *Fzd6* (A), *Runx2* (B) e os genes alvo da via Wnt *Tcf* (C) e *Lef* (D) em células MC3T3-E1 selecionadas para expressão do CRISPR-Cas9-*gFzd6* e CRISPR-Cas9 não específico em clones crescidos em meio de crescimento até subconfluência. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante (p≤0,05).

3.3.5 Efeitos das mutações geradas pelo sistema CRISPR-Cas9 sobre a expressão de RNAm de *Fzd6* no genótipo osteoblástico de células MC3T3-E1 cultivadas sobre superfície de Ti-Nano e Ti-Usinado

A avaliação da eficácia do silenciamento do gene *Fzd6* sobre o fenótipo osteoblástico foi realizada utilizando como controle as células transfectadas com o CRISPR-Cas9 não específico, ou seja não contendo o gRNA, por tanto, denominando-se daqui em diante como grupo Controle, e as células mutadas para inibição do gene *Fzd6* correspondem ao clone 41 selecionado previamente após a transfecção com CRISPR-Cas9-Fzd6, sendo denominado daqui em diante como grupo *gFzd6*. As células foram cultivadas sobre superfície de Ti-Nano e Ti-Usinado em meio osteogênico. Observa-se o efeito negativo na expressão dos marcadores osteoblásticos após inibição do gene *Fzd6* em 3, 5 e 7 dias (Figura 25)

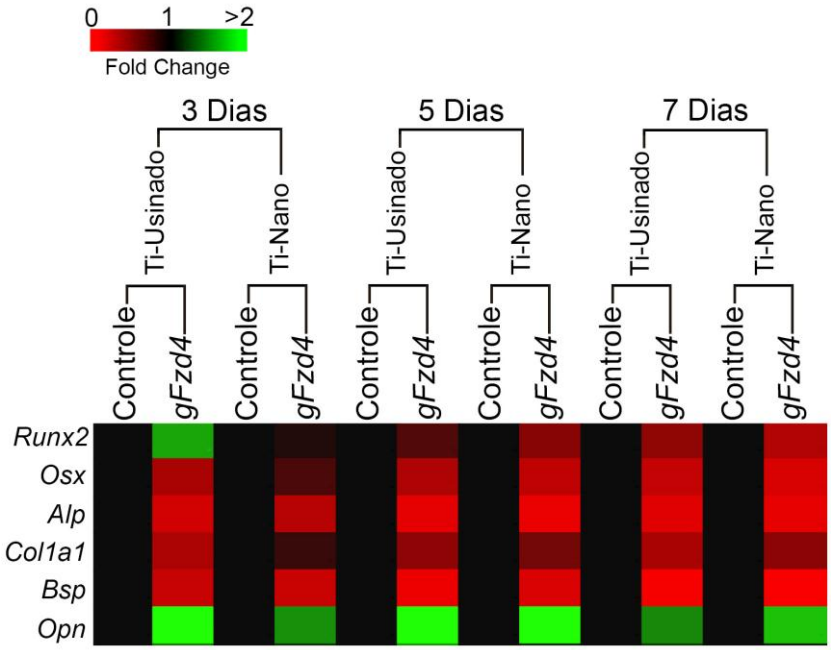

Figura 25. Heatmap representando 6 genes marcadores osteoblásticos expressos entre o clone Controle e o clone *gFzd6* crescidos em meio osteogênico em 3, 5 e 7 dias sobre superfície de Ti-Nano e Ti-Usinado. O verde indica indução da expressão, o vermelho indica repressão e o preto ausência de modulação em relação ao Controle que foi previamente calibrado com valor de 1.

Aos 3 dias de diferenciação osteoblástica a expressão gênica dos marcadores osteoblásticos em células *gFzd6* foi menor tanto sobre Ti-Usinado como sobre Ti-Nano para os genes *Osx* (Figura 26a, p=0.00001 e p=0.0005), *Alp* (Figura 26d, p=0.00001 para ambos), *Col1a1* (Figura 26g, p=0.00025 e p=0.00986), *Bsp* (Figura 26j, p=0.00001 e p=0.00019) e maior para a *Opn* (Figura 26m, p=0.00002 e p=0.00039) respectivamente.

Aos 5 dias de diferenciação osteoblástica a expressão gênica dos marcadores osteoblásticos em células *gFzd6* foi menor tanto sobre Ti-Usinado como sobre Ti-Nano para os genes *Osx* (Figura 26b, p=0.00004 e p=0.00068), *Alp* (Figura 26e, p=0.00001 para ambos), *Col1a1* (Figura 26g, p=0.00053 e p=0.00037), *Bsp* (Figura 26h, p=0.00004 e p=0.00003) e maior para a *Opn* (Figura 26n, p=0.00003 e p=0.00004) respectivamente.

Aos 7 dias de diferenciação osteoblástica a expressão gênica dos marcadores osteoblásticos em células *gFzd6* foi menor tanto sobre Ti-Usinado como sobre Ti-Nano para os genes *Osx* (Figura 26c, p=0.00008 para ambos), *Alp* (Figura 26f, p=0.00001 para ambos), *Col1a1* (Figura 26i, p=0.00018 e p=0.00106), *Bsp* (Figura 26l, p=0.00001 para ambos) e maior para a *Opn* (Figura 26o, p=0.00039 e p=0.00027) respectivamente.

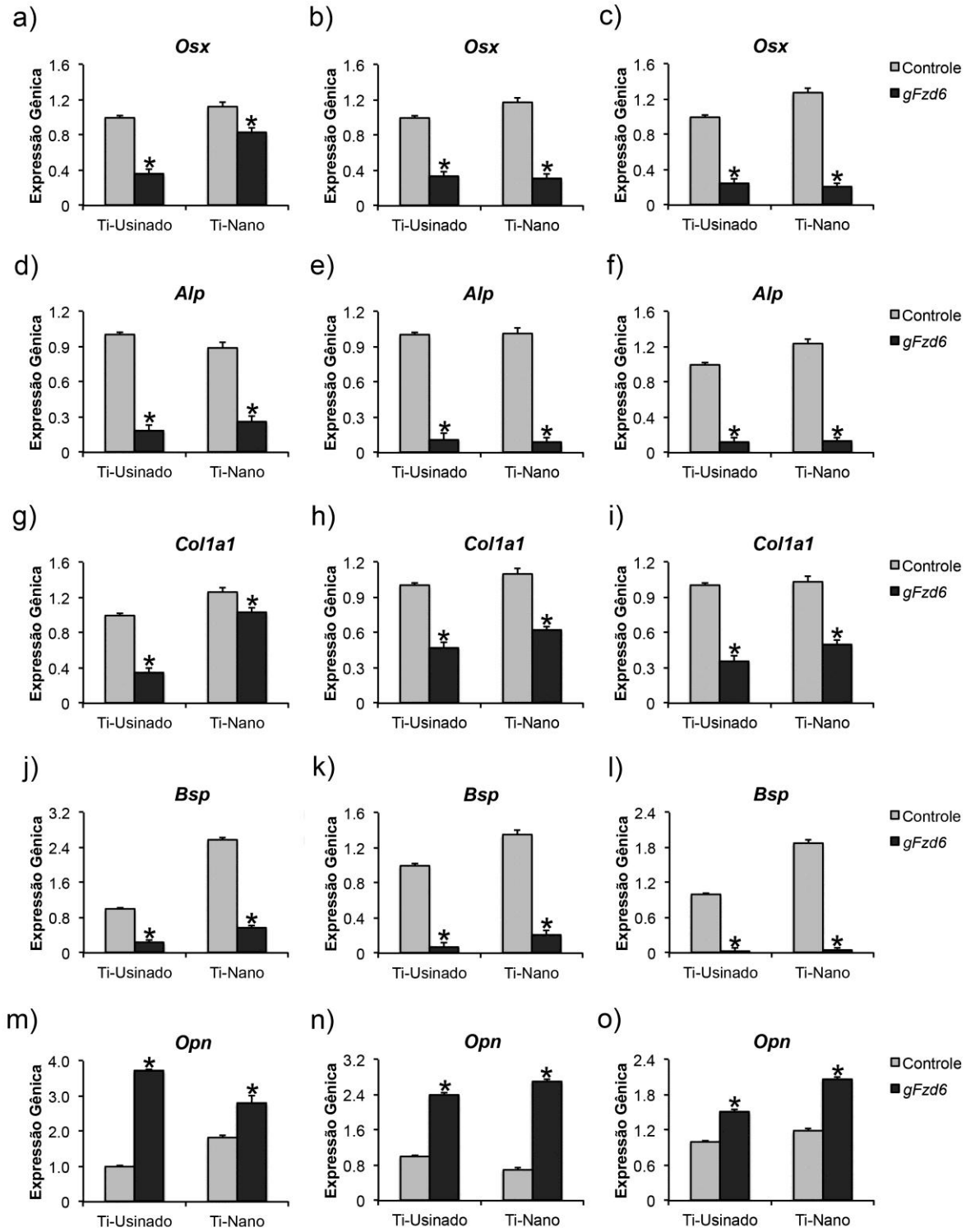

Figura 26. Efeito do silenciamento do *Fzd6*, sobre a expressão de marcadores osteoblásticos em células crescidas sobre superfície de Ti-Nano comparadas ao Ti-Usinado. Expressão gênica de osterix (*Osx*), fosfatase alcalina (*Alp*), colágeno (*Col1a1*), sialoproteína óssea (*Bsp*) e osteopontina (*Opn*) de células mutadas *gFzd6* e células controle aos 3 dias (a, d, g, j, m), 5 dias (b, e, h, k, n) e 7 dias (c, f, i, l e o) de cultura em meio osteogênico. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significante ($p \leq 0,05$).

3.3.6 Efeito do silenciamento de *Fzd6* sobre a expressão gênica e proteica de Runx2

Aos 3 dias de diferenciação osteoblástica a expressão gênica de *Runx2* em células *gFzd6* foi maior sobre Ti-Usinado e menor sobre Ti-Nano (Figura 27a, p=0.0001 e p=0.0307) respectivamente, aos 5 dias a expressão de *Runx2* em células *gFzd6* foi menor, tanto para o Ti-Usinado como para o Ti-Nano (Figura 27b, p=0.02113 e p=0.00075) e, aos 7 dias (Figura 27c, p=0.0001 e p=0.0002) respectivamente. A expressão proteica de RUNX2 foi menor em células *gFzd4* comparadas ás células Controle crescidas sobre Ti-Usinado e Ti-Nano em 3, 5 e 7 dias, com exceção do Ti-Usinado em 3 dias (Figura 27d e 27e). A repressão da transcrição do Fzd6 da via Wnt tem impacto na expressão de RUNX2 em 3, 5 e 7 dias, sendo particularmente importane em 3 dias sobre a superfície Ti-Nano.

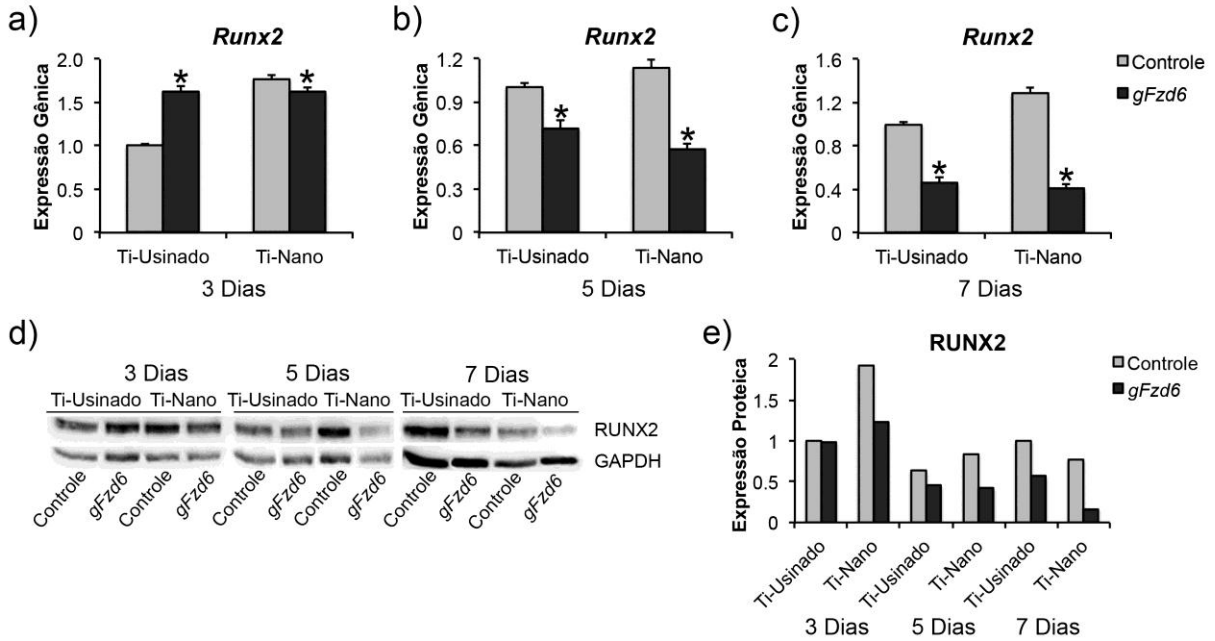

Figura 27. Efeito do silenciamento do *Fzd6,* sobre a expressão gênica aos 3 dias (a), 5 dias (b) e 7 dias (c) e expressão proteica nos mesmos periódos (d-e) de RUNX2 em células crescidas sobre superfície de Ti-Nano comparadas ao Ti-Usinado aos 3, 5 e 7 dias de cultura em meio osteogênico. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05).

3.3.7 Avaliação do efeito do silenciamento do gene *Fzd6* sobre o fenótipo osteoblástico: Atividade de ALP *in situ* e mineralização

O efeito do silenciamento de *Fzd6* sobre o fenótipo osteoblástico foi avaliado por meio da análise da proteína ALP aos 10 dias e acumulação de matriz extracelular mineralizada aos 14 dias.

Aos 10 dias, após o silenciamento de *Fzd6* a expressão proteica de ALP *in situ* foi menor em células *gFzd6* crescidas sobre Ti-Usinado (48%, p=0.00088) e Ti-Nano (45%, p=0.00162) (Figura 28a-28b).

Aos 14 dias, após o silenciamento de *Fzd6* a formação de matriz mineralizada foi significativamente diminuída sobre o Ti-Nano (78%, p=0.00014) e Ti-Usinado (75%, p=0.00039) (Figura 28c-28d).

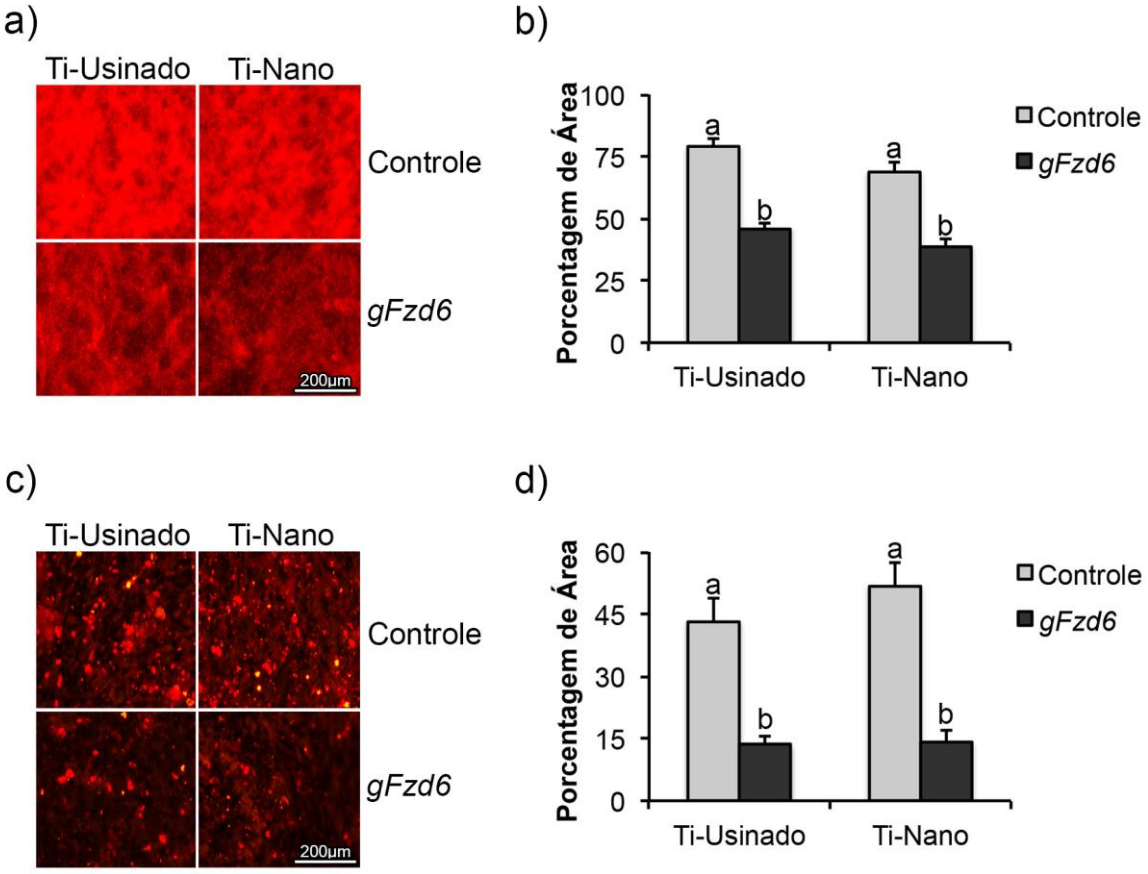

Figura 28. Efeito do silenciamento do *Fzd6,* sobre a expressão do fenótipo osteoblástico em células crescidas sobre superfície de Ti-Nano comparadas ao Ti-Usinado. Mineralização aos 14 dias de cultura de células MC3T3_E1 com o vetor vazio e células MC3T3-E1 com o *gFzd6* em meio osteogênico. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=5) (p≤0,05). Letras diferentes em minúscula indicam diferença estatisticamente significante. Barra de escala = 200 µm.

3.3.8 Efeito do silenciamento de *Fzd6* sobre a expressão gênica e proteica da calmodulina dependente de Ca^{2+} proteína quinase II fosforilada (CAMKII-p)

Aos 3 dias a expressão gênica *Camk2d* foi maior em células *gFzd6* crescidas sobre Ti-Nano e Ti-Usinado (Figura 27a, p=0.0004 e p=0.00194) e menor aos 5 e 7 dias para ambas superfícies (Figura 27b, p=0.00032 e p=0.217) e (Figura 27c, p=0.0001 e p=0.00293). A expressão proteica de CAMKII-p foi decrescente de 3 a 7 dias, com maior expressão nas células *gFzd6* comparado a células Controle (Figura 28c e 28d), A repressão da transcrição do *Fzd6* da via Wnt não tem impacto negativo sobre a expressão de CAMKII fosforilada, indicando que a via Wnt/Ca^{2+} é importante no períodos iniciais, porém não depende da ativação pelo receptor FZD6.

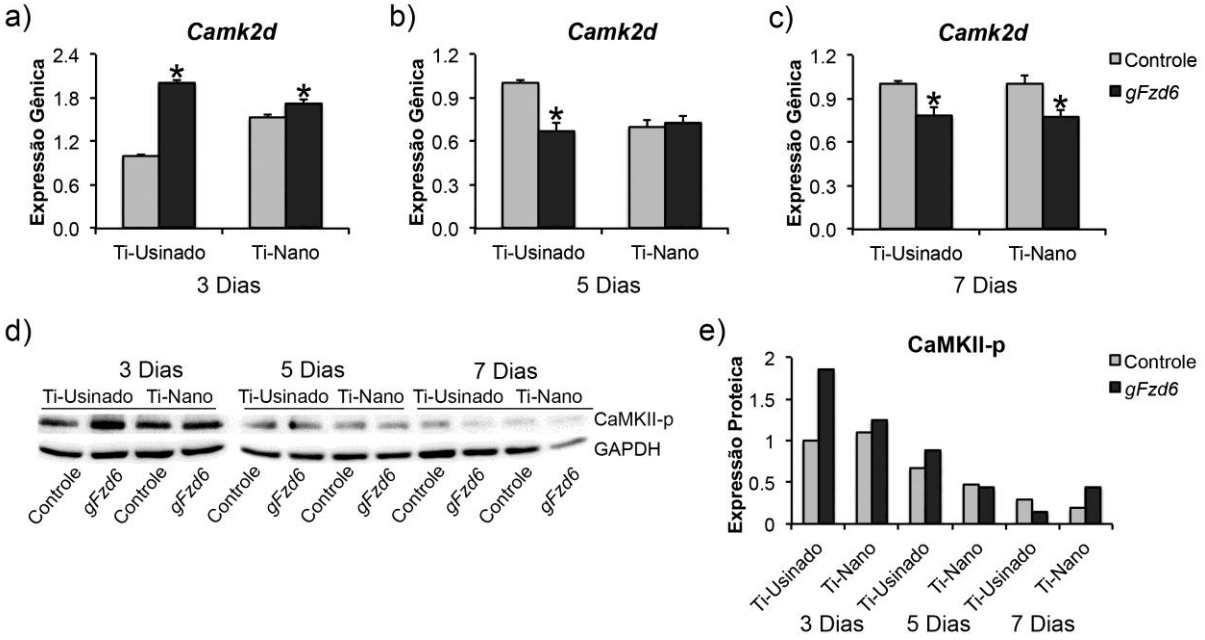

Figura 29. Efeito do silenciamento do *Fzd6*, sobre a expressão gênica aos 3 dias (A), 5 dias (B) e 7 dias (C) e expressão proteica nos mesmos periodos (D e E) de calmodulina dependente de Ca^{2+} proteína quinase II (*Camk2d*) e para o western blot a a calmodulina dependente de Ca^{2+} proteína quinase II fosforilada (CAMKII-p) em células crescidas sobre superfície de Ti-nano comparadas ao Ti-Usinado aos 3, 5 e 7 dias de cultura em meio osteogênico. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05).

3.3.9 Efeito do silenciamento de *Fzd6* sobre a expressão gênica do fator nuclear de células T ativadas (*Nfatc1*)

Aos 3, 5 e 7 dias de diferenciação osteoblástica a expressão gênica de *Nfatc1* em células gFzd6 foi maior que o controle tanto sobre Ti-Usinado como sobre Ti-Nano (Figura 30a, p=0.00092 e p=0.00173), (Figura 30b, p=0.00052 e p=0.676) e (Figura 30c, p=0.0008 e p=0.00210) respectivamente.

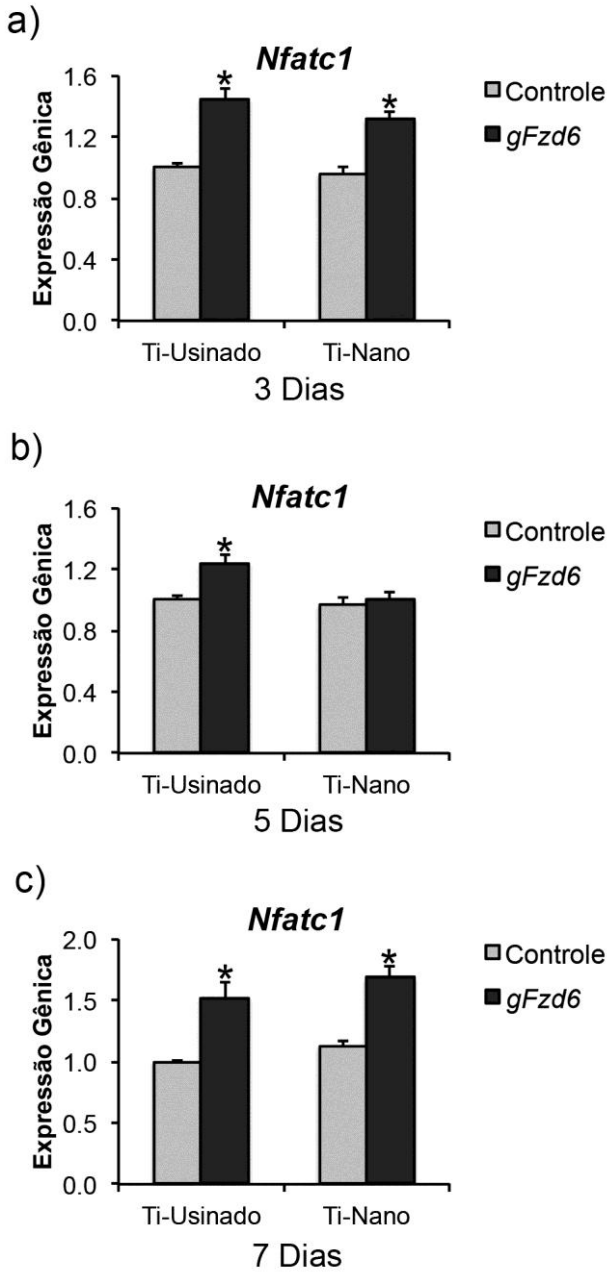

Figura 30. Efeito do silenciamento do *Fzd6*, sobre a expressão gênica de *Nfatc1* aos 3 dias (a), 5 dias (b) e 7 dias (c) em em células crescidas sobre superfície de Ti-nano comparadas ao Ti-Usinado. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05)

3.3.10 Efeito do silenciamento de *Fzd6* sobre a expressão gênica e proteica de β-Catenina

Aos 3 dias a expressão gênica *Ctnnb1* foi maior em células *gFzd6* crescidas sobre Ti-Nano e não houve diferença sobre Ti-Usinado (Figura 31a, p=0.0601 e p=0.0210), aos 5 dias foi maior sobre Ti-Usinado e igual sobre Ti-Nano (Figura 31b, p=0.00182 e p=0.0126) e aos 7 dias foi menor sobre ambas superfícies (Figura 31c, p=0.000107 e p=0.00313). A expressão proteica de β-Catenina foi muito mais significativa em 3 dias, apresentando uma diminuição em células *gFzd6* comparado a células Controle crescidas sobre Ti-Nano (Figura 31c e 31d), O silenciamento de *Fzd6* tem um impacto maior na expressão de β-Catenina, principalmente em 3 dias sobre o Ti-Nano.

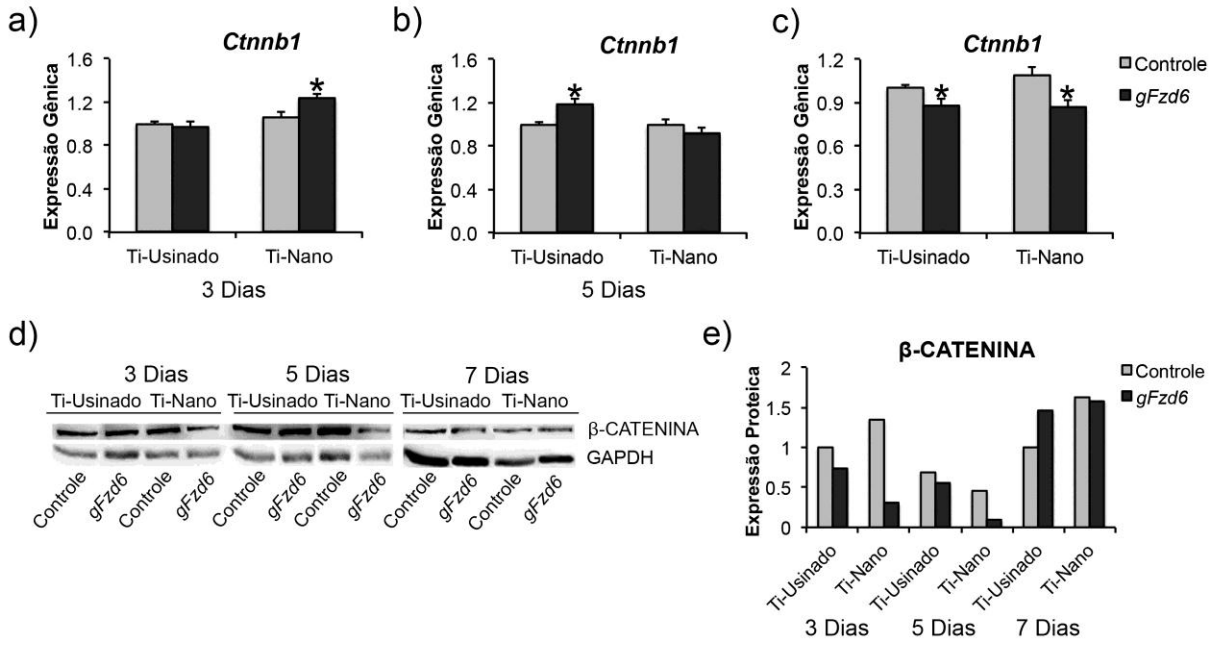

Figura 31. Efeito do silenciamento do *Fzd6*, sobre a expressão gênica de *Ctnnb1* aos 3 dias (a), 5 dias (b) e 7 dias (c) e expressão proteica (d-e) de β-Catenina em células MC3T3-E1 crescidas sobre superfície de Ti-nano comparadas ao Ti-Usinado aos 3, 5 e 7 dias de cultura em meio osteogênico. Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05).

3.3.11 Efeito do silenciamento de *Fzd6* sobre a expressão gênica da quinase nemo-like (*Nlk*)

Aos 3 dias de diferenciação osteoblástica a expressão gênica de Nlk em células *gFzd6* foi maior que o controle tanto sobre Ti-Usinado e menor sobre Ti-Nano (Figura 32a, p=0.0177 e p=0.00715), aos 5 dias não houve diferença,(Figura 32b, p=0.245 para ambos) e aos 7 dias foi menor sobre o Ti-Usinado e igual sobre o Ti-Nano (Figura 32c, p=0.00446 e p=0.252) respectivamente.

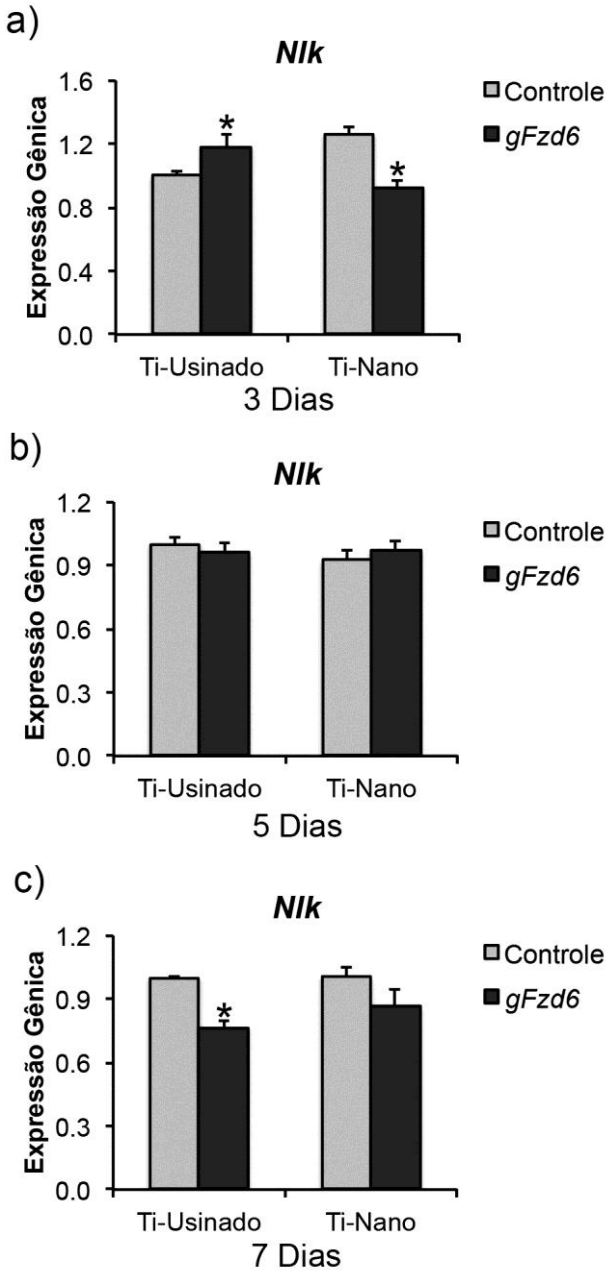

Figura 32. Efeito do silenciamento do *Fzd6*, sobre a expressão gênica de *Nlk* aos 3 dias (a), 5 dias (b) e 7 dias (c) em em células MC3T3-E1 crescidas sobre superfície de Ti-nano comparadas ao Ti-Usinado Os dados são apresentados com média ± desvio padrão (n=3). * indica diferença estatisticamente significante (p≤0,05)

3.4 DISCUSSÃO

As superfícies com nanotopografia produzem efeitos fundamentais na regulação da adsorção de proteínas e adesões focais celulares, alterando as vias de sinalização intracelulares e, consequentemente, influenciando o fenótipo e resposta biológica aos implantes (SCHARTWZ et al., 2001; De OLIVEIRA et al., 2007; OLIVARES-NAVARRETE et al., 2015). Esta resposta biológica está intimamente relacionada à capacidade de regulação das vias de sinalização da osteogênese, como a via das BMPs (KATO et al., 2014; CASTRO-RAUCCI et al., 2016), integrinas (LOPES et al., 2019) e como demonstrado no capítulo 2 deste trabalho, a via Wnt/β-catenina.

Para o estudo da via não canônica Wnt usando a técnica CRISPR-Cas9, realizamos o silenciamento do gene *Fzd6,* descrito como um gene altamente modulado pela superfície de Ti-Nano (Capítulo 1; Figura 3). O sistema CRISPR-Cas9 utiliza a endonuclease Cas9 guiada por meio do gRNA para produzir uma modificação gênica de interesse (RAN et al., 2013). Assim, foi desenhado o plasmídeo no sistema *all in one* CRISPR-Cas9-GFP (Figura 19) específico para a geração da mutação no exon 3 do gene *Fzd6* (GRCm38:15:39,006,034-39,038,188).

Em nosso estudo, um total de 310 células GFP positivas para os clones transfectados com *gFzd6* e 390 células para os clones transfectadas com o vetor não específico (Controle) foram recuperados e mantidas para amplificação (Figura 22). Ao processo todo sobreviveram 45 células *gFzd6* e 52 células controle.

No sistema CRISPR-Cas9, a geração de uma linhagem knockout depende de uma pequena deleção aleatória produzida por NHEJ no local de reparo após a clivagem da dupla fita de DNA. Estas deleções idealmente estão direcionadas às matrizes de leitura (ORF, do inglês: open reading frames*)* resultando em mutações de matriz de leitura (frame-shifts*)*, geralmente no começo do RNAm, produzindo a formação de um códon de parada prematuro e a consequente perda da função da proteína. Por outro lado, a mutação, por ser aleatória, pode não alterar a fase de leitura do RNAm (deleção in-frame), mantendo a função da proteína. Sendo o objetivo final a geração de um knockout FZD6, realizar a triagem direta da produção de proteína assegura que o knockout foi bem sucedido, evitando o estudo desnecessário de deleções ou mutações in-frame (ESTEP et al., 2016). Portanto, a validação da inibição

de FZD6 foi realizada por meio da expressão proteica em todos os clones sobreviventes, tanto para os clones transfectados com o plasmídeo CRISPR-Cas9 não específico, como com o plasmídeo CRISPR-Cas9 contendo o *gFzd6* (Figura 23). Conseguimos evidenciar que a inibição completa da proteína aconteceu apenas em um clone, e seguidamente, evidenciou-se uma diminuição drástica da expressão gênica de *Fzd6* e do gene *Lef* (Figura 24). Tendo verificado o efeito deletério sobre a proteína FZD6, realizamos a avaliação do efeito da inibição dessa proteína sobre a expressão de marcadores osteoblásticos e evidenciamos uma maior diminuição da expressão gênica em relação ao tempo. Observou-se também que o efeito do silenciamento de *Fzd6* produz diferenças mais perceptíveis entre superfícies de Ti-Nano e Ti-Usinado aos 3 dias de cultura (Figura 25).

O FZD6 está envolvido principalmente na via Wnt/PCP onde desempenha um papel importante na orientação dos folículos pilosos, nas células sensoriais auditivas e no fechamento do tubo neural (WANG et al., 2006). A mutação (R511C) do FZD6 altera a distribuição subcelular do receptor produzindo disfunção da sinalização WNT-FZD. Em fibroblastos induzidos com WNT3a e FZD6 mutado, a estabilidade da β-Catenina é inibida, assim como é inibido o aumento de WNT5a quando regulado pelo inibidor DKK1 (FROJMARK et al., 2011; NAZ et al., 2012). A maioria dos estudos demonstram que o FZD6 está associado com a sinalização independente de β-Catenina. De fato, Golan e colaboradores, em 2004, demostraram que o FZD6 atua como regulador negativo da cascata de sinalização dependente de β-Catenina. A combinação do *Fzd6* com o repórter Luciferase *Tcf/Lef* e *Wnt1, Wnt3, Wnt3a, Wnt4 ou Wnt5a* em células HEK293T não induziu aumento da atividade do repórter com qualquer um dos WNTs escolhidos. Pelo contrário, o *Fzd6* inibiu a atividade do repórter induzido pelo *Fzd1 e Wnt3a*. Esse efeito inibitório de FZD6 resulta da ativação de vias alternas, por exemplo, a via da quinase nemo-like, que leva à fosforilação de TCF/LEF reduzindo sua ligação ao DNA alvo (GOLAN et al., 2004). Heinonen e colaboradores identificaram o FZD6 como receptor para o WNT4 em células progenitoras hematopoiéticas imaturas, após comprovar a diminuição da proliferação celular quando mediada pelo WNT4 em ausência do FZD6 (HEINONEN et al., 2011). Porém, apesar de estar comprovada a associação entre FZD6 e a transdução de sinal independente de β-Catenina, o FZD6 também pode estar associado à via canônica. Kolben e colaboradores, em 2012, relataram uma associação positiva em células-

tronco mesenquimais humanas entre FZD6 e WNT3a levando à ativação da β-Catenina. Assim, a proteína FZD6 está mais envolvida com a via Wnt/Ca^{2+} e de polaridade celular planar, porém não seria infrequente encontrar sua participação na via Wnt/β-catenina.

Entendendo que o FZD6 está envolvido principalmente na ativação da via não canônica de Wnt, nós avaliamos a quinase calmodulina dependente de Ca^{2+} (CAMKII-p), alvo na via Wnt/Ca^{2+}, e observamos que a CAMKII-p estava mais expressa em períodos iniciais de diferenciação; no entanto, sua expressão foi maior em células com o *Fzd6* silenciado (Figura 29d-29e). Inicialmente, este resultado foi inesperado, pois acreditávamos que o silenciamento do FZD6 produziria a diminuição da expressão proteica de CAMKII-p, validando a hipótese de que a via Wnt/Ca^{2+} participa do potencial osteogênico da nanotopografia.

A ativação da via Wnt/Ca^{2+} ocorre após a ligação de uma proteína Wnt (WNT5a/WNT11) ao receptor FZD, que interage com a proteína DSH, ativando efetores PLC, IP3 e DAG. A IP3 induz no retículo endoplasmático a liberação de cálcio ao citosol, ativando enzimas sensíveis ao Ca^{2+}, como a CAMKII e a calcineurina que, finalmente, ativam o fator nuclear de células T ativado (NFATc) (LERNER e OHLSSON, 2015). O NFATc é um fator de transcrição altamente fosforilado que permanece no citoplasma quando não estimulado. Qualquer aumento no nível de cálcio intracelular leva à ativação da calceneurina (HOGAN et al., 2003). A calceneurina ativada induz a desfosforilação do NFATc, produzindo sua translocação para o núcleo e a regulação de seus genes-alvo (HOGAN et al., 2003; CRABTREE et al, 2002). No tecido ósseo, a sinalização calceneurina-NFATc surgiu como um importante ativador da reabsorção óssea (ALIPRANTIS et al., 2008; UEKI et al., 2008). Porém, o NFATc1 e o NFATc2 podem regular positivamente a formação óssea aumentando a replicação dos osteoblastos e formando um complexo que favorece a atividade transcricional de Osx (TAKAYANAGI et al., 2002; KOGA et al., 2005), regulando a osteoblastogênese *in vitro* (SMERDEL-RAMOYA et al., 2008) e *in vivo* (WINSLOW et al., 2006). Assim, decidimos analisar a expressão gênica de NFAT em células *Fzd6* silenciadas. O resultado confirmou que a via Wnt/Ca^{2+} não está envolvida diretamente no potencial osteogênico da superfície com nanotopografia (Figura 30), porém a sobre-regulação de *Nfatc1* em células *gFzd6* sugere que existe uma regulação negativa do FZD6 sobre a expressão de *Nfatc1.* Considerando que o FZD6

pode também estar envolvido na ativação de Wnt/β-catenina (KOLBEN et al., 2012), analisamos a expressão de β-Catenina em células *Fzd6* silenciadas.

Nossos resultados revelaram que o silenciamento de *Fzd6* sobre Ti-Nano afeta a via Wnt/β-catenina principalmente aos 3 e 5 dias (Figura 31d-31e), sendo que, aos 3 dias seu impacto é bastante evidente. A via canônica atua através da estabilização de β-Catenina no citoplasma e sua posterior translocação até o núcleo (DIHLMANN e DOEBERITZ, 2005). Na ausência de sinalização WNT, o pool citosólico de β-Catenina é continuamente degradado como resultado da sua fosforilação pela proteína GSK3β e subsequente degradação através da via ubiquitina-proteosomo (DAKENG et al., 2012). Além da GSK3β, outras proteínas fazem parte do complexo citoplasmático de destruição da β-Catenina, como o AXIN, a CKI e a proteína APC (DAKENG, et al., 2012). O AXIN e APC formam uma estrutura (scaffold) que permite a GSK3β fosforilar especificamente β-Catenina. Quando a via de sinalização WNT é ativada, o complexo de destruição APC-AXIN-GSK3β é inativado, permitindo que a β-Catenina seja translocada do citoplasma para o núcleo, mediado pela Gal-3, onde se liga aos fatores de transcrição TCF/LEF para promover a ativação da transcrição de genes alvos *Runx2* e *Osx*.

No núcleo, a β-Catenina atua em conjunto com outros fatores de transcrição, além do TCF/LEF, como FOXOs e receptores nucleares como SOX e SMAD (KAHN 2014). Com relação ao fator de transcrição TCF, principal ligante da β-Catenina, existem mais de 8 isoformas de *Tcf* que se ligam diferentemente à β-Catenina. Essas isoformas são formadas por splicing alternativo e em geral as isoformas longas se ligam à β-Catenina, mas as isoformas pequenas não podem fazê-lo e funcionam como repressores da via Wnt/β-catenina (STAAL et al., 2008). Outra forma de afetar a via Wnt/β-catenina é por meio da fosforilação de *Tcf* pela quinase nemo-like (NLK). A NLK fosforila especificamente o complexo LEF1/TCF4 impedindo sua ligação ao DNA (ISHITANI et al., 2003a), a NLK age também suprimindo a transactivação de BMP/SMAD sobre o TCF. Ishitani e colaboradores, em 2003, demostraram que a CAMKII, quando ativada pela WNT5a, induz uma proteína quinase mitôgeno ativada (MAPK) TAK capaz de ativar a NLK e, dessa forma, regular a via Wnt por inibição de TCF (ISHITANI et a., 2003b).

Procurando entender o maior efeito deletério do silenciamento de *Fzd6* sobre a expressão de RUNX2 aos 3 dias em células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti-Nano,

analisamos a expressão gênica de *Nlk*. O silenciamento de *Fzd6* diminuiu a expressão gênica de *Nlk* (Figura 32a) e, considerando que os efeitos do NLK não afetam a β-Catenina citosólica (ZANOTTI et al., 2012), podemos sugerir que o FZD6 ativa a via Wnt/β-catenina, principalmente aos 3 dias, e também é capaz de regular a expressão proteica de RUNX2 muito provavelmente via ativação de CAMKII-p (Figura 29f) e ativação de *Nlk* (Figura 32a).

Usando a técnica CRISPR-Cas9 para silenciar o *Fzd6*, evidenciamos o efeito deletério sobre a expressão do genótipo e fenótipo osteoblástico nas células *gFzd6*, demonstrando a importância da participação da via Wnt sobre a diferenciação osteoblástica induzida por Ti-Nano (Figura 26, 27, 28). Assim, podemos sugerir que a via Wnt/β-catenina promove o maior potencial osteogênico da superfície de Ti-Nano, aos 3 dias, por meio do receptor FZD6.

.

3.5 CONCLUSÃO

- Nossos resultados indicam que o maior potencial osteogênico da nanotopografia deve-se, ao menos em parte, à ativação da via de sinalização Wnt/β-catenina, uma vez que o silenciamente do *Fdz6* reduziu mais intensamente a diferenciação osteoblástica de células MC3T3-E1 crescidas sobre Ti-Nano comparado ao Ti-Usinado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants: requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-toimplant anchorage in man. Acta Orthop Scand. 1981;52(2):155-70.

Albrektsson T, Chrcanovic B, Jacobsson M, Wennerberg A. Osseointegration of implants—a biological and clinical overview. JSM Dent Surg. 2017;2:1-6.

Aliprantis AO, Ueki Y, Sulyanto R, Park A, Sigrist KS, Sharma SM, et al. NFATc1 in mice represses osteoprotegerin during osteoclastogenesis and dissociates systemic osteopenia from inflammation in cherubism. J Clin Invest. 2008;118: 3775–3789.

Auerbach C, Robson JM, Carr JG. The chemical production of mutations. Science. 1947;105(2723):243–247.

Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science. 2007;315(5819):1709–1712.

Barrangou R, Marraffini LA. CRISPR-Cas systems: prokaryotes upgrade to adaptive immunity. Mol Cell. 2014;54:234-244.

Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, et al. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. Science. 1998;280:596-599.

Behrens J, Von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, et al. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. Nature. 1996;382,638-642.

Bennett C, Longo K, Wright W, Suva L, Lane T, Hankenson K, et al. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:3324–3329.

Beratik O, Ganji RS, Dijksterhuis JP, Konik P, Cervenka I, Polonio T, et al. Sequential activation and inactivation of Dishevelled in the Wnt/beta-catenin pathway by casein kinases. J Biol Chem. 2011;286:10396-10410.

Bilic J, Huang YL, Davidson G, Zimmermann T, Cruciat CM, Bienz M, et al. Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. Science. 2007;316:1619-1622.

Bittner JJ. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. Science. 1936;84:162.

Carroll D. Genome Editing: Past, Present, and Future. Yale J Bio Med. 2017;90(4): 653–659.

Castro-Raucci L, Francischini MS, Teixeira LN, Ferraz EP, Lopes HB, de Oliveira PT, et al. Titanium with nanotopography induces osteoblast differentiation by regulating endogenous bone morphogenetic protein expression and signaling pathway. J Cell Biochem. 2016;117:1718-1726.

Cawthorn WP, Bre AJ, Yao Y, Du B, Hemati N, Martinez-Santibañez G, et al. Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a beta-catenin-dependent mechanism. Bone**.** 2012;50(2):477-489.

Chehroudi B, Gould TR, Brunette DM. Effects of a grooved titanium-coated implant surface on epithelial cell behavior in vitro and in vivo. J. Biomed. Mater. Res. 1989;23:1067–1085.

Chehroudi B, McDonnell D, Brunette DM. The effects of micromachined surfaces on formation of bonelike tissue on subcutaneous implants as assessed by radiography and computer image processing. J Biomed Mater Res. 1997;34:279–290.

Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. Cell. 2012;149(6): 1192–1205.

Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/VCas Systems. Science. 2013;339:819–823.

Crabtree GR, Olson EN. NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. Cell. 2002;109:S67–S79 20.

Curtis AS, Casey B, Gallagher JO, Pasqui D, Wood MA, Wilkinson CD. Substratum nanotopography and the adhesion of biological cells. Are symmetry or regularity of nanotopography important?. Biophysical Chemistry. 2001;94(3):275-83.

Curtis AS, Varde M. Control of cell behavior: Topological factors. J. Natl Cancer Inst. 1964;33:15–26.

Dakeng S, Duangmano S, Jiratchariyakul W, Pratya Y, Bo O, Gler P. Inhibition of WNT signaling by cucurbitacin B in breast cancer cells: reduction of WNT associated proteins and reduced translocation of galectin-3-mediated β-catenin to the nucleus. J Cell Biochem. 2012;113:49–60.

Dalby MJ, Yarwood SJ, Riehle MO, Johnstone HJ, Affrossman S, Curtis AS. Increasing fibroblast response to materials using nanotopography: morphological and genetic measurements of cell response to 13-nm-high polymer demixed islands. Experimental Cell Research. 2002;276(1):1-9.

De Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. Biomaterials. 2004;25:403–413.

De Oliveira PT, Zalzal SF, Beloti MM, Rosa AL, Nanci A. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. J Biomed Mater Res A. 2007;80:554-564.

DeBruine Z, Ke J, Harikumar KG, Gu X, Borowsky P, Williams BO, et al. Wnt5a promotes Frizzled-4 signalosome assembly by stabilizing cysteine-rich domain dimerization. Genes & Dev. 2017;31:916-926.

Dejaeger M, Böhm AM, Dirckx N, Devriese J, Nefyodova E, Cardoen R, et al. Integrin-linked kinase regulates bone formation by controlling cytoskeletal organization and modulating BMP and Wnt signaling in osteoprogenitors. J Bone Miner Res. 2017;32:2087-2102.

Dihlmann S, Doeberitz M.K. Wnt/β-catenin pathway as a molecular target for future anti-cancer therapeutics. Int J Cancer. 2005;113:515-524.

Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science. 2014;346:1258096.

Dunn GA, Brown AF. Alignment of fibroblasts on grooved surfaces described by a

simple geometric transformation. J Cell Sci. 1986;83:313–340.

El-Hoss J, Arabian A, Dedhar S, St-Arnaud R. Inactivation of the integrin-linked kinase (ILK) in osteoblasts increases mineralization. Gene. 2014;533(1):246-52.

Estep J, Sternburg EL, Sanchez GA, Karginov FV. Immunoblot screening of CRISPR/ Cas9-mediated gene knockouts without selection. BMC Molecular Biol. 2016;17:9.

Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. Mol Aspects Med. 2006;27:126-139.

Flemming RG, Murphy CJ, Abrams GA, Goodman SL, Nealey PF. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. Biomaterials. 1999;20:573–588.

Fontana J, Dong C, Ham JY, Zalatan JG, Carothers JM. Regulated expression of sgRNAs tunes CRISPRi in E. coli. Biotechnol. J. 2018;13:1800069.

Frojmark AS, Schuster J, Sobol M, Entesarian M, Kilander MBC, Gabrikova D, et al. Mutations in Frizzled 6 cause isolated autosomal-recessive nail dysplasia. American journal of human genetics. 2011;88(6):852-60.

Galli C, Macaluso GM, Piemontese M, Passeri G. Titanium topography controls FoxO/beta-catenin signaling. J Dent Res. 2011;90:360e4.

Galli C, Piemontese M, Lumetti S, Manfredi E, Macaluso GM, Passeri G. The importance of WNT pathways for bone metabolism and their regulation by implant topography. Eur Cell Mater. 2012;24:46-59.

Gammons MV, Renko M, Johnson CM, Rutherford TJ, Bienz M. Wnt signalosome assembly by DEP domain swapping of dishevelled. Mol Cell. 2016;64:92-104.

Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Kmm BS, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. J Biol Chem. 2005; 280:33132e40.

Gerlach JP, Jordens I, Tauriello DVF, van‘t Land-Kuper I, Bugter JM, Noordstra I, et al. TMEM59 potentiates Wnt signaling by promoting signalosome formation. Proc Natl Acad Sci USA. 2018;115: E3996-E4005.

Gilbert LA, Larson MH, Morsut L, Liu Z, Brar GA, Torres SE, et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. Cell. 2013;154(2):442-451.

Golan T, Yaniv A, Bafico A, Liu G, Gazit A. The human Frizzled 6 (HFz6) acts as a negative regulator of the canonical Wnt. beta-catenin signaling cascade. J Biol Chem. 2004;279:14879–14888.

Goodrich LV, Strutt D. Principles of planar polarity in animal development. Development. 2011;138(10):1877–1892.

Gregory C, Gunn W, Reyes E, Smolarz A, Munoz J, Spees J, et al. How wnt signaling affects bone repair by mesenchymal stem cells from the bone marrow. Ann N Y Acad Sci. 2005;1049:97–106.

Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. Anal Biochem. 2004;329:77-84.

Grigoryan T, Wend P, Klaus A, Birchmeier W. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. Genes Dev. 2008;22:2308-2341.

Gubb D, Garcia-Bellido A. A genetic analysis of the determination of cuticular polarity during development in Drosophila melanogaster. J Embryol Exp Morphol. 1982;68:37–57.

Guo N, Hawkins C, Nathans J. Frizzled6 controls hair patterning in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004;101(25):9277-81.

Guoli Y, Wen F, Tie L, Fuming H, Xuepeng C, Yi Z, et al. Gene expression profiling of bone marrow-derived stromal cells seeded onto a sandblasted, large-grit, acid-etched-treated titanium implant surface: The role of the Wnt pathway. Arch Ora Biol. 2016;61:71–78.

Hanahan D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. Journal of molecular biology. 1983;166(4):557-80.

Heinonen KM, Vanegas JR, Lew D, Krosl J, Perreault C. Wnt4 enhances murine hematopoietic progenitor cell expansion through a planar cell polarity-like pathway. PLoS One. 2011;26-6(4):19279.

Hoeppner LH, Secreto F, Jensen ED, Li X, Kahler RA, Westendorf JJ. Runx2 and bone morphogenic protein 2 regulate the expression of an alternative Lef1 transcript during osteoblast maturation. J Cell Physiol. 2009;221:480-9.

Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. Genes Dev. 2003;17:2205–2232.

Ishitani T, Kishida S, Hyodo-Miura J, Ueno N, Yasuda J, Waterman M, et al. The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. Molecular and cellular biology. 2003;23(1):131-139.

Ishitani T, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K. Regulation of lymphoid enhancer factor 1/T-cell factor by mitogen-activated protein kinase-related Nemo-like kinase-dependent phosphorylation in Wnt/beta-catenin signaling. Molecular and cellular biology. 2003;23(4):1379-1389.

Ivanovski S, Hamlet S, Retzepi M, Wall I, Donos N. Transcriptional profiling of "guided bone regeneration" in a critical-size calvarial defect. Clin Oral Implants Res. 2011;22:382-389.

Ivanovski S, Hamlet S, Salvi GE, Huynh-Ba G, Bosshardt DD, Lang NP, et al. Transcriptional profiling of osseointegration in humans. Clin Oral Implants Res. 2011;22:373-381.

Janda CY, Waghray D, Levin AM, Thomas C, Garcia KC. Structural basis of Wnt recognition by frizzled. Science. 2012;337:59-64.

Jenny A. Planar cell polarity signaling in the Drosophila eye. Curr Top Dev Biol. 2010;93:189–227.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier EA. Programmable Dual-RNA–Guided DNA endonuclease in adaptice bacterial immunity. Science. 2012;337:816–822.

Kasemo B, Lausmaa K. Biomaterial and implant surfaces: On the role of cleanliness, contamination, and preparation procedures. J Abiomed Matter Res. 1988;22:145.

Kato RB, Roy B, De Oliveira FS, Ferraz EP, De Oliveira PT, Kemper AG, et al. Nanotopography directs mesenchymal stem cells to osteoblast lineage through regulation of microRNA-SMAD-BMP-2 circuit. J Cell Physiol. 2014;229:1690-1696.

Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. Prod Natl Acad Sci. 1996;93(3):1156–1160.

Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, de Crombrugghe B, Na-kashima K, et al. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. Nat Med. 2005;11:880–885.

Kolben T, Perobner I, Fernsebner K, Lechner F, Geissler C, Ruiz-Heinrich L, et al. Dissecting the impact of Frizzled receptors in Wnt/beta-catenin signaling of human mesenchymal stem cells. Biological chemistry. 2012;393(12):1433-47.

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of Cbfa-1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. Cell. 1997:89;755–764.

Komori T. Roles of Runx2 in Skeletal Development. Advances in experimental medicine and biology. 2017;962:83-93.

Komori T. Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. J Cell Biochem. 2011;112:750-5.

Korteweg R. On the manner in which the disposition to carcinoma of the mammary gland is inherited in mice. Genetics. 1936;18:350–71.

Krishnan V, Bryant HU, Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. J Clin Invest. 2006;116:1202-1209.

Kummitha C, Mayle K, Christman M, Deosarkar S, Schwartz A, McCall K. A sandwich ELISA for the detection of Wnt5a. J Immunol Methods. 2010;352:38–44.

Lerner UH, Ohlsson C. The WNT system: background and its role in bone. J Intern Med. 2015;277:630-649.

Li T, Huang S, Zhao X, Wright DA, Carpenter S, Spalding MH, et al. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. Nucleic Acids Research. 2011;39(14):6315-25.

Li Z, Xu Z, Duan C, Liu W, Sun J, Han B. Role of TCF/LEF. transcription factors in bone development and osteogenesis. Int J Med Sci. 2018;15(12):1415-1422.

Lian JB, Stein GS. Runx2/Cbfa1: a multifunctional regulator of bone formation. Curr Pharm Des. 2003;9(32) 2677-85.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25:402-408.

Long H, Sun B, Cheng L, Zhao S, Zhu Y, Zhao R, et al. miR-139-5p Represses BMSC osteogenesis via targeting Wnt/b-catenin signaling pathway. DNA Cell Biol. 2017;36(8):715-724.

Lyons MJ, Moore DH. Purification of mouse mammary tumour virus. Nature. 1962;194:1141.

MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. Dev Cell. 2009;17:9–26.

Majors AK, Boehm CA, Nitto H, Midura RJ, Muschler GF. Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. J Orthop Res. 1997;15:546-557.

Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. Nat Methods. 2013;10:957–963.

Marie PJ, Hay E, Saidak Z. Integrin and cadherin signaling in bone: role and potential therapeutic targets. Trends in endocrinology and metabolism: TEM. 2014;25(11):567-75.

Mendonça G, Mendonça DB, Aragão FJ, Coope LF. Advaning dental implant surfasse technology – from micron to nantopography. Biomaterials. 2008;28:3822-3835.

Mikasa M, Rokutanda S, Komori H, Ito K, Tsang YS, Date Y. et al. Regulation of Tcf7 by Runx2 in chondrocyte maturation and proliferation. J Bone Miner Metab. 2011;29:291-9.

Mikels A, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. PLoS Biol. 2006;4:e115.

Moreb EA, Hoover B, Yaseen A, Valyasevi N, Roecker Z, Menacho-Melgar R, et al. Managing the SOS Response for enhanced CRISPR-Cas-based recombineering in E. Coli through transient inhibition of host RecA activity. Acs Synth Biol. 2017;6:2209-2218.

Nanci A, Wuest JD, Peru L, Brunet P, Sharma V, Zalzal S, et al. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. J Biomed Mater Res. 1998;4(2)324-35.

Nusse R, Varmus HE. Wnt genes. Cell. 1992;69:1073–87.

Nusse, R. and H.E. Varmus. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. Cell. 1982;31(1):99-109.

Nusslein-Volhard, C. Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. Nature. 1980;287(5785):795-801.

Ohara PT, Buck RC. Contact guidance in vitro. A light, transmission, and scanning electron microscopic study. Exp Cell Res. 1979;121:235–249.

Olivares-Navarrete R, Hyzy S, Wieland M, Boyan BD, Schwartz Z. The roles of Wnt signaling modulators Dickkopf-1 (Dkk1) and Dickkopf-2 (Dkk2) and cell maturation state in osteogenesis on microstructured titanium surfaces. Biomaterials. 2010;31:2015-2024.

Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Hutton DL, Dunn GR, Appert C, Boyan BD, et al. Role of non-canonical Wnt signaling in osteoblast maturation on microstructured titanium surfaces. Acta Biomater. 2011;7:2740-2750.

Olivares-Navarrete R, Hyzy SL, Pan Q, Dunn G, Williams JK, Schwartz Z, et al. Osteoblast maturation on microtextured titanium involves paracrine regulation of bone morphogenetic protein signaling. J Biomed Mater Res A. 2015;103:1721-1731.

Peters JM, Colavin A, Shi HD, Czarny TL, Larson MH, Wong S, et al. A comprehensive, CRISPR-based functional analysis of essential genes in bacteria. Cell. 2016;165:1493-1506.

Qingguo G, Haijun T, Kai Z, Deyu C, Dechun C, Xinwei W, et al. Wnt5a/FZD4 Mediates the mechanical stretch-induced osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells. Cell Physiol Biochem. 2018;48:215-226.

Rasouli R, Barhoum A, Uludag H. A review of nanostructured surfaces and materials for dental implants: surface coating, patterning and functionalization for improved performance. Biomater Sci. 2018;6(6):1312-1338.

Reichsman F, Smith L, Cumberledge S. Glycosaminoglycans can modulate extracellular localization of the wingless protein and promote signal transduction. J Cell Biol. 1996;135:819– 27.

Richter C, Chang JT, Fineran PC. Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR associated (Cas) systems. Viruses. 2012;4:2291–2311.

Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. Cell. 1987;50:649–57.

Robitaille J, MacDonald ML, Kaykas A, Sheldahl LC, Zeisler J, Dube MP, et al. Mutant frizzled-4 disrupts retinal angiogenesis in familial exudative vitreoretinopathy. Nat Genet. 2002;32:326–330.

Rosa AL, Kato RB, Castro Raucci LM, Teixeira LN, de Oliveira FS, Bellesini LS, et al. Nanotopography drives stem cell fate toward osteoblast differentiation through α1β1 integrin signaling pathway. J Cell Biochem. 2014;115:540-548.

Rovensky YA, Slavnaja IL, Vasiliev JM. Behaviour of fibroblast-like cells on grooved surfaces. Exp Cell Res. 1971;65:193–201.

Rudin N, Sugarman E, Haber JE. Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in Saccharomyces cerevisiae. Genetics. 1989;122(3):519–534.

Sander JD, Joung JK. CRISPR Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Nat Biotechnol. 2014;4:347-355.

Schaefer K, Peifer M. Wnt/Beta-catenin signaling regulation and a role for biomolecular condensates. Dev Cell. 2019;48(4):429–444.

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. BMC Mol Biol. 2006;7:3.

Sharma RP, Chopra VL. Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in Drosophila melanogaster. Dev Biol. 1976;48:461–5.

Shi C, Huang P, Kang H, Hu B, Qi J, Jiang M, et al. Glucocorticoid inhibits cell proliferation in differentiating osteoblasts by microRNA-199a targeting of WNT signaling. Journal of molecular endocrinology. 2015;54(3):325-37.

Shimizu H, Julius MA, Giarre M, Zheng Z, Brown AM, Kitajewski J. Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin. Cell Growth Differ.

Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res. 1997;8:1349–1358.

Smerdel-Ramoya A, Zanotti S, Deregowski V, Canalis E. Connective tissue growth factor enhances osteoblastogenesis in vitro. J Biol Chem. 2008;283:22690–22699.

Staal FJ, Luis TC, Tiemessen MM. WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. Nature reviews Immunology. 2008;8(8):581-93.

Sternberg SH, Doudna JA. Expanding the biologist's toolkit with CRISPR-Cas9. Mol Cell. 2015;58:568-574.

Souza ATP, Bezerra BLS, Oliveira FS, Freitas GP, Bighetti Trevisan RL, Oliveira PT, et al. Effect of bone morphogenetic protein 9 on osteoblast differentiation of cells grown on titanium with nanotopography. Journal of cellular biochemistry. 2018;119(10):8441-9.

Stamos JL, Weis WI. The beta-catenin destruction complex. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2013;5(1):a007898.

Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. Dev Cell. 2002;3:889–901 27.

Tamura M, Nemoto E, Sato MM, Nakashima A, Shimauchi H. Role of the Wnt signaling pathway in bone and tooth. Front Biosci (Elite Ed). 2010;2:1405-1413.

Thakore P, D'Ippolito AM, Song L, Safi A, Shivakumar NK, Kabadi AM, et al. Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements. Nat Methods. 2015;12(12):1143-9.

Thomas KR, Folger KR, Capecchi MR. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. Cell. 1986;44(3):419-28.

Tsukamoto Y, Ikeda H. Double-strand break repair mediated by DNA end-joining. Genes Cells. 1998;3(3)135-44.

Ueki Y, Sulyanto R, Park A, Sigrist KS, Sharma SM, Ostrowski MC, et al. NFATc1 in mice represses osteoprotegerin during osteoclastogenesis and dissociates systemic osteopenia from inflammation in cherubism. J Clin Invest. 2008;118: 3775–3789.

Wall I, Donos N, Carlqvist K, Jones F, Brett P. Modified titanium surfaces promote accelerated osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in vitro. Bone. 2009;45:17-26.

Wang H, Malbon C. Wnt signaling, Ca2+, and cyclic GMP: Visualizing frizzled functions. Science. 2003;300(5625):1529–1530.

Wang W, Zhao L, Ma Q, Wang Q, Chu PK, Zhang Y. The role of the Wnt/β-catenin pathway in the effect of implant topography on MG63 differentiation. Biomaterials. 2012;33:7993-8002.

Wang Y, Guo N, Nathans J. The role of Frizzled3 and Frizzled6 in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells. The Journal of neuroscience, the official journal of the Society for Neuroscience. 2006;26(8):2147-56.

Wang Y, Huso D, Cahill H, Ryugo D, Nathans J. Progressive cerebellar, auditory, and esophageal dysfunction caused by targeted disruption of the frizzled-4 gene. J Neurosci. 2001;21(13):4761–4771.

Wang Y, Rattner A, Zhou Y, Williams J, Smallwood PM, Nathans J. Norrin/Frizzled4 signaling in retinal vascular development and blood brain barrier plasticity. Cell. 2012;151(6):1332–1344.

Wang Y, Li YP, Paulson C, Shao JZ, Zhang X, Wu M, et al. Wnt and the Wnt signaling pathway in bone development and disease. Frontiers in bioscience. 2014;19:379-407.

Weiss P. Experiments on cell and axon orientation in vitro—The role of colloidal exudates in tissue organization. J Exp Zool. 1945;100:353–386.

Winslow MM, Pan M, Starbuck M, Gallo EM, Deng L, Karsenty G, et al. Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. Dev Cell. 2006;10:771–782.

Yamaguchi TP, Bradley A, McMahon AP, Jones S. A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. Development. 1999;126:1211-1223.

Yi JH, Bernard C, Variola F, Zalzal SF, Wuest JD, Rosei F, et al. Characterization of a bioactive nanotextured surface created by controlled chemical oxidation of titanium. Surface Science. 2006;600(19):4613–4621.

Yoshida CA, Komori H, Maruyama Z, Miyazaki T, Kawasaki K, Furuichi T, et al. SP7 inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice. PloS One, 2012;7(3):e32364.

Yoshikawa Y, Fujimori T, McMahon AP, Takada S. Evidence that absence of Wnt-3a signaling promotes neuralization instead of paraxial mesoderm development in the mouse. Dev Biol. 1997;183:234-242.

Zanotti S, Canalis E. Nemo-like kinase inhibits osteoblastogenesis by suppressing bone morphogenetic protein and WNT canonical signaling. Journal of cellular biochemistry. 2012;113(2):449-56.

Zhong Z, Ethen NJ, Williams BO. WNT signaling in bone development and homeostasis. Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology. 2014;3(6):489-500.

Zhukova Y, Hiepen C, Knaus P, Osterland M, Prohaska S, Dunlop JWC, Skorb EV. The role of titanium surface nanostructuring on preosteoblast morphology, adhesion, and migration. Adv Healthcare Mater. 2017;6:1(601244)1–13.