



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ORAL



BONE RESEARCH LAB
FORP - USP

**PARTICIPAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO *HEDGEHOG* E *NOTCH* NA
DIFERENCIAÇÃO OSTEoblástica INDUZIDA POR SUPERFÍCIE DE TITÂNIO
COM NANOTOPOGRAFIA**

Doutoranda: Paola Gomes Souza

Orientador: Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti

Coorientador: Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa

Ribeirão Preto

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ORAL

PAOLA GOMES SOUZA

**PARTICIPAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO *HEDGEHOG* E *NOTCH* NA
DIFERENCIAÇÃO OSTEoblástica INDUZIDA POR SUPERFÍCIE DE TITÂNIO
COM NANOTOPOGRAFIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como um dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti

Coorientador: Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa

Ribeirão Preto

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ORAL

Trabalho realizado nos Laboratórios de Cultura de Células e Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), na modalidade Bolsa de Doutorado (Processo nº 2019/15531-8).

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho,

à Deus, pela força espiritual e bençãos nessa caminhada, que contribuíram na concretização deste trabalho e permitiram mais um passo na carreira acadêmica.

à minha família, Eurípedes Souza, Marilene Gomes, Rhaila Gomes, Edmundo Otávio, Célia Regina e Gabriela Moraes, meus queridos pais, irmã, sogros e cunhada, pela fonte inesgotável de afeto, dedicação e confiança a mim dadas.

ao meu companheiro de vida, Felipe Otávio, meu parceiro nos caminhos pessoais e profissionais, pelo suporte, compreensão e solidariedade indescritíveis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

ao órgão de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela incomparável confiança na pesquisa brasileira, amparo social e financeiro que permitiram a efetivação desse projeto.

aos prezados Professores Doutores, Orientador e Coorientador, Márcio Mateus Beloti e Adalberto Luiz Rosa pelas valiosas contribuições em meu crescimento pessoal e profissional como doutoranda e oportunidades a mim concedidas.

a todo o Grupo de Pesquisa Bone Research Lab, professores, técnicos e alunos aos quais a parceria e experiências vividas marcaram sobremaneira esses anos e serão sempre lembradas.

aos coautores desse trabalho, pelos conhecimentos compartilhados e valiosa contribuição nesse trabalho.

a todo o Programa de Pós-graduação em Biologia Oral, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto e Universidade de São Paulo, professores, funcionários e alunos, os quais os ensinamentos e admiração me motivam a continuar.

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1 – Esquemática da via de sinalização <i>Hedgehog</i> ativada e inativada	13
Figura 2 – Esquemática da via de sinalização <i>Notch</i> ativada e inativada	14
Tabela 1 – Sequências de primers para PCR-TR	18
Figura 3 – Seleção da melhor concentração do agonista da via <i>Hedgehog</i> , Purmorfamina, com base em seus efeitos na diferenciação de osteoblastos	23
Figura 4 – Seleção da melhor concentração do antagonista da via <i>Hedgehog</i> , Ciclopamina, com base em seus efeitos na diferenciação de osteoblastos	24
Figura 5 – Seleção da melhor concentração do antagonista da via <i>Notch</i> , DAPT, com base em seus efeitos na diferenciação de osteoblastos	25
Figura 6 – Seleção da melhor concentração do agonista da via <i>Notch</i> , Bexaroteno, com base em seus efeitos na diferenciação de osteoblastos	25
Figura 7 – Topografia da superfície dos discos de titânio	26
Figura 8 – Efeito do agonista da via <i>Hedgehog</i> , Purmorfamina, na expressão gênica dos marcadores osteoblásticos e expressão da proteína RUNX2 em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano	27
Figura 9 – Efeito do agonista da via <i>Hedgehog</i> , Purmorfamina, na atividade de fosfatase alcalina e mineralização da matriz extracelular em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano	28
Figura 10 – Efeito do agonista da via <i>Hedgehog</i> , Purmorfamina, na expressão gênica de receptores <i>Hedgehog</i> e expressão da proteína GLI1 em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano	29
Figura 11 – Efeito do antagonista da via <i>Hedgehog</i> , Ciclopamina, na expressão gênica dos marcadores osteoblásticos e expressão da proteína RUNX2 em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano	30

Figura 12 – Efeito do antagonista da via <i>Hedgehog</i> , Ciclopamina, na atividade de fosfatase alcalina e mineralização da matriz extracelular em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano	30
Figura 13 – Efeito do antagonista da via <i>Hedgehog</i> , Ciclopamina, na expressão gênica de receptores <i>Hedgehog</i> e expressão da proteína GLI1 em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano	31
Figura 14 – Efeito do antagonista da via <i>Notch</i> , DAPT, na expressão gênica dos marcadores osteoblásticos e expressão da proteína RUNX2 em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano	32
Figura 15 – Efeito do antagonista da via <i>Notch</i> , DAPT, na atividade de fosfatase alcalina e mineralização da matriz extracelular em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano	33
Figura 16 – Efeito do antagonista da via <i>Notch</i> , DAPT, na expressão gênica de receptores <i>Notch</i> e expressão da proteína HES1 em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano	34
Figura 17 – Efeito do agonista da via <i>Notch</i> , Bexaroteno, na expressão gênica dos marcadores osteoblásticos e expressão da proteína RUNX2 em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano	35
Figura 18 – Efeito do agonista da via <i>Notch</i> , Bexaroteno, na atividade de fosfatase alcalina e mineralização da matriz extracelular em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano...36	36
Figura 19 – Efeito do agonista da via <i>Notch</i> , Bexaroteno, na expressão gênica de receptores <i>Notch</i> e expressão da proteína HES1 em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano	37
Figura 20 – Efeito da combinação do agonista de <i>Hedgehog</i> Purmorfamina com o antagonista de <i>Notch</i> DAPT (A) e o antagonista de <i>Hedgehog</i> Ciclopamina com o agonista de <i>Notch</i> Bexaroteno (B), na expressão gênica de marcadores ósseos em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano	38

RESUMO

As vias sinalização Hedgehog e Notch afetam a osteogênese e podem regular as interações osteoblasto/titânio (Ti). Investigamos o efeito da modulação destas sinalizações na diferenciação osteoblástica induzida pelo Ti nanoestruturado (Ti-Nano) gerado por tratamento com H_2SO_4/H_2O_2 . Osteoblastos de calvárias de ratos recém-nascidos foram cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano na presença do agonista purmorfamina ou antagonista ciclopamina da via Hedgehog e do antagonista DAPT ou agonista bexaroteno da via Notch. A diferenciação de osteoblastos foi avaliada pela expressão de marcadores ósseos, atividade de fosfatase alcalina, mineralização e a expressão de receptores das vias. Em geral, purmorfamina e DAPT aumentaram enquanto ciclopamina e bexaroteno diminuíram a diferenciação osteoblástica e regularam a expressão dos receptores em ambas superfícies de Ti, com efeitos mais pronunciados sobre Ti-Nano. A combinação purmorfamina e DAPT exibiu efeito sinérgico na diferenciação osteoblástica que foi mais intenso no Ti-Nano. Nossos resultados mostraram que as vias de sinalização Hedgehog e Notch modulam interações osteoblastos/Ti, com efeitos mais pronunciados na nanotopografia. Também demonstramos que a combinação de ativação de Hedgehog com inibição de Notch exibe efeito sinérgico na diferenciação de osteoblastos, especialmente em Ti-Nano. A descoberta desses mecanismos celulares contribui na criação de estratégias de controle do processo de osseointegração a partir do desenvolvimento de superfícies nanoestruturadas.

Palavras-chave: osteoblasto; hedgehog; nanotopografia; notch; titânio.

ABSTRACT

The Hedgehog and Notch signaling pathways affect osteogenesis and can drive the osteoblast/titanium (Ti) interactions. We investigated the effect of the modulation of these signaling on osteoblast differentiation induced by the nanostructured Ti (Ti-Nano) generated by H₂SO₄/H₂O₂. Osteoblasts from newborn rat calvariae were cultured on Ti-Control and Ti-Nano in the presence of agonist purmorphamine or antagonist cyclopamine of the Hedgehog pathway and antagonist DAPT or agonist bexarotene of the Notch pathway. Osteoblast differentiation was evaluated by the expression of bone markers, alkaline phosphatase activity and mineralization and the expression of Hedgehog and Notch receptors. In general, purmorphamine and DAPT increased while cyclopamine and bexarotene decreased osteoblast differentiation and regulated the receptor expression on both Ti surfaces, with more pronounced effects on Ti-Nano. The purmorphamine and DAPT combination exhibited synergistic effect on osteoblast differentiation that was more intense on Ti-Nano. Our results indicate that the Hedgehog and Notch signaling pathways drive osteoblast/Ti interactions, with more pronounced effects on nanotopography. We also demonstrated that the combination of Hedgehog activation with Notch inhibition exhibits synergistic effect on osteoblast differentiation, especially on Ti-Nano. The uncover of these cellular mechanisms contributes to create strategies to control the process of osseointegration based on the development of nanostructured surfaces.

Key words: osteoblast; hedgehog; nanotopography; notch, titanium.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. PROPOSIÇÃO	16
2.1 Objetivos específicos.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1. Seleção das concentrações de purmorfamina, ciclopamina, bexaroteno e DAPT com maiores efeitos sobre a diferenciação osteoblástica.....	17
3.1.1. Preparação dos agonistas e antagonistas das vias Hedgehog e Notch	17
3.1.2. Isolamento e cultura de osteoblastos	17
3.1.3. Análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-TR)	18
3.1.4. Análise da atividade de ALP por coloração Fast Red	19
3.1.5. Análise da mineralização da matriz extracelular por coloração com vermelho de alizarina	19
3.2. Efeito da modulação da sinalização Hedgehog na diferenciação de osteoblastos e na expressão de receptores Hedgehog em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano	20
3.2.1. Modificação e caracterização da superfície de Ti.....	20
3.2.2. Isolamento, cultura de osteoblastos, análise da expressão gênica, atividade de ALP e mineralização da matriz extracelular	20
3.2.3. Análise da expressão da proteína por western blot.....	21
3.3. Efeito da modulação da sinalização Notch na diferenciação osteoblástica e na expressão de receptores Notch em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano	21
3.3.1. Isolamento, cultura de osteoblastos, análise da expressão gênica, atividade de ALP, mineralização da matriz extracelular e expressão proteica	21
3.4. Efeito da combinação da modulação de sinalização Hedgehog e Notch na expressão gênica de marcadores ósseos em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano	22
3.5. Análise estatística	22
4. RESULTADOS	23
4.1. Seleção das concentrações de purmorfamina, ciclopamina, bexaroteno e DAPT com maiores efeitos sobre a diferenciação osteoblástica.....	23

4.2. Efeito da modulação da sinalização Hedgehog na diferenciação de osteoblastos e na expressão de receptores Hedgehog em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano	26
4.2.1. Modificação e caracterização da superfície de Ti.....	26
4.2.2. Efeito do agonista de Hedgehog purmorfamina na diferenciação osteoblástica e na expressão de receptores Hedgehog em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano	27
4.2.3. Efeito do antagonista de Hedgehog ciclopamina na diferenciação osteoblástica e na expressão de receptores Hedgehog em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano	29
4.3. Efeito da modulação da sinalização Notch na diferenciação de osteoblastos e na expressão de receptores Notch em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano	32
4.3.1. Efeito do antagonista de Notch DAPT na diferenciação osteoblástica e na expressão de receptores Notch em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano	32
4.3.2. Efeito do agonista de Notch bexaroteno na diferenciação osteoblástica e na expressão de receptores Notch em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano	34
4.4. Efeito da combinação da modulação da sinalização Hedgehog e Notch na expressão gênica de marcadores ósseos em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano	37
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÕES	43
7. BIBLIOGRAFIA	44

1. INTRODUÇÃO

A odontologia regenerativa baseia-se no desenvolvimento de estratégias para a indução e manutenção das funções celulares que promovem o restabelecimento estrutural e funcional dos tecidos orais (Adolpho et al., 2022; Souza et al., 2021; Chen et al., 2013). Nesse contexto, a osteogênese é caracterizada por etapas sequenciais de adesão, proliferação e diferenciação celular, aposição e mineralização da matriz extracelular que são dependentes de vias de sinalização celular (Yang et al., 2015). Dentre essas vias, a Hedgehog e a Notch atuam em diversos processos celulares, inclusive na diferenciação de osteoblastos (Yan et al., 2015; Levi et al., 2011).

A via de sinalização Hedgehog (Hh) atua na proliferação celular durante o desenvolvimento embrionário, manutenção de células-tronco e reparo e regeneração de tecidos (Roberge et al., 2013; Wang et al., 2010). Esse mecanismo intracelular está relacionado à secreção de um trio de proteínas homólogas, *Sonic Hedgehog* (SHH), *Desert Hedgehog* (DHH) e *Indian Hedgehog* (IHH), que se tornam biologicamente ativas após alterações pós-transdução tanto em sua região N-terminal quanto na C-terminal (Heretsch et al., 2010a) e interagem com os receptores transmembranais *Patched-1* (PTCH1) e *Smoothed* (SMO). Quando uma proteína precursora *Hedgehog* se liga ao receptor PTCH1, a proteína SMO fica constitutivamente ativa e induz a cascata de sinalização, levando à estabilização do fator de transcrição *family zinc finger 2* (GLI2) (Evangelista et al., 2006). O GLI2 é translocado para o núcleo e induz a transcrição de genes alvos como o *Ptch1*, *Gli1*, *Gli2* e tradução de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), além de outros fatores de crescimento e antiapoptóticos (Ingham et al., 2001). Na ausência de ligação HH-PTCH1, a proteína SMO permanece inativa e ocorre ativação da proteína *supressor of fused* (SuFu), que regula negativamente a via e leva à produção de GLI3, um marcador importante dessa inibição (Plaisant et al., 2011; Peukert et al., 2010). A sinalização Hedgehog pode ser modulada por agonistas ou antagonistas.

A purmorfamina, agonista desta via, aumenta a expressão do fator de transcrição 2 relacionado ao runt (*Runx2*) em células osteoprogenitoras, favorecendo a diferenciação osteoblástica e a formação de matriz extracelular mineralizada (Oliveira et al., 2012; Beloti et al., 2005a; Beloti et al., 2005b; Wu et al., 2002). O efeito da purmorfamina é devido à estimulação da cascata de sinal, aumentando a expressão dos genes *Gli1*, *Gli2*, *Ptch1* e *Ptch2* (Sinha et al., 2006; Wu et al., 2004). A

ciclopamina, antagonista da via Hedgehog, liga-se à proteína SMO e inibe sua atividade induzindo uma mudança na conformação da proteína, inibindo *Gli1* e *Gli2* (Heretsch et al., 2010b; Katoh et al., 2009). A ciclopamina reduz a expressão de PTCH1 e altera o padrão de expressão de BMP-2 em osteoblastos (Suh et al., 2006; Quint et al., 2002). A modulação da via de sinalização Hh pela purmorfamina e ciclopamina é simplificada esquematizada na Figura 1.

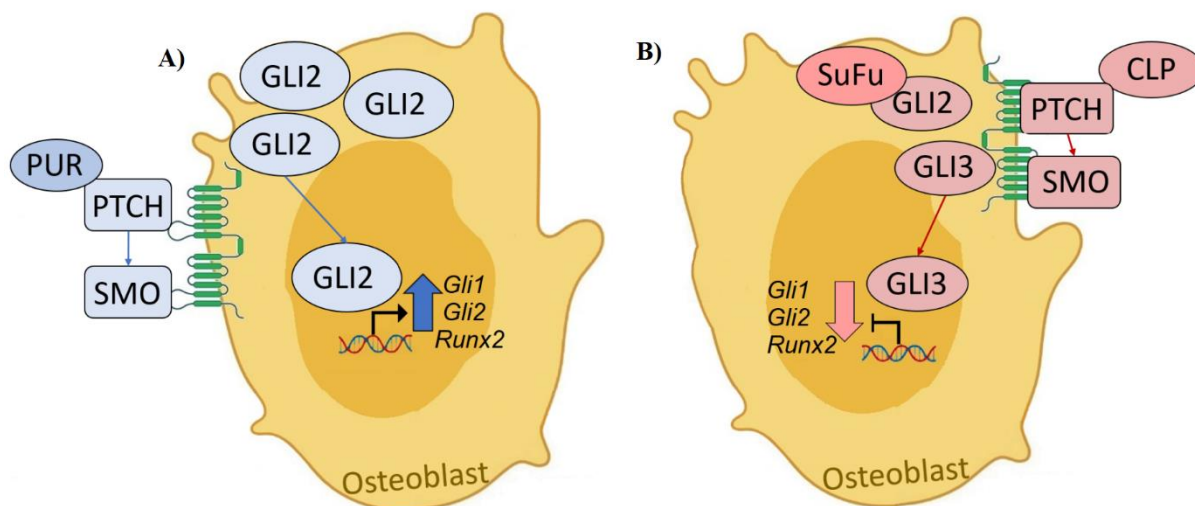


Figura 1. Via de sinalização Hedgehog (Hh). (A) Via Hh ativada (presença de agonista mimetizando ligante endógeno). (B) Via Hh inativada (presença de antagonista).

A via de sinalização Notch também está envolvida nos processos de proliferação e diferenciação celular, principalmente durante o desenvolvimento embrionário (Panepucci et al., 2010). A ativação desse mecanismo celular depende do contato entre células, visto que ligantes e receptores são proteínas transmembranais. Nos mamíferos, foram identificados até o presente momento quatro receptores, *Notch* 1-4, e cinco ligantes, Jagged 1 e 2, Delta 1, 3 e 4 (Radtke et al., 2005). A interação do ligante com o receptor leva a dois processos de clivagem proteolítica, o primeiro ocasionado pela metaloprotease, *tumour necrosis factor converting enzyme* (TACE), e o segundo pelo complexo enzimático gama-secretase, constituído por presenilina, nicastrina, *presenilin enhancer* (PEN2) e *anterior pharynx-defective 1* (APH1). Esse segundo processo libera o domínio intracelular do receptor *Notch* (NICD), o qual é translocado da membrana para o núcleo, agindo como coativador transcrricional. Esse domínio se heterodimeriza com o complexo de proteínas contendo a proteína ligante ao DNA, denominada *recombination signal sequence-binding protein Jk* (RBPjk ou CSL). Essa interação resulta na remoção de co-repressores e recrutamento de co-ativadores (proteínas da família *Mastermind*-

like) e, conseqüentemente, na transcrição de genes alvos da família *Hairy/Enhancer-of-Split (Hes)* e *Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein (Hey)* (High et al., 2007). Enquanto o subtipo *Hes1* favorece, os subtipos *Hey1* e *Hey2* inibem fortemente a atividade de *Runx2* (Fischer et al., 2007; Garg et al., 2005; Shen et al., 2005; Zamurovic et al., 2004; McLarren et al., 2000).

Assim como a via Hedgehog, a via de sinalização Notch pode ser regulada por agonistas e antagonistas. O bexaroteno é um agonista que exerce sua ação biológica pela ativação de isoformas e ligação seletiva aos receptores nucleares retinóides. Sua ligação ao complexo proteico gama-secretase induz a ativação da via, tendo como efeito a inibição do crescimento e diferenciação celular (Chitranshi et al., 2019). Em contraste, o antagonista de Notch *N-[N-(3, 5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine-butyl ester (DAPT)*, um inibidor do complexo de proteína gama-secretase, promove a osteogênese (Jing et al., 2010). Além disso, a inibição da sinalização Notch em linhagens mesenquimais resulta em aumento da quantidade de células osteoprogenitoras e formação precoce de osso endocondral (Dishowitz et al., 2012). A modulação da via de sinalização Notch pelo DAPT e bexaroteno é simplificada esquematizada na Figura 2.

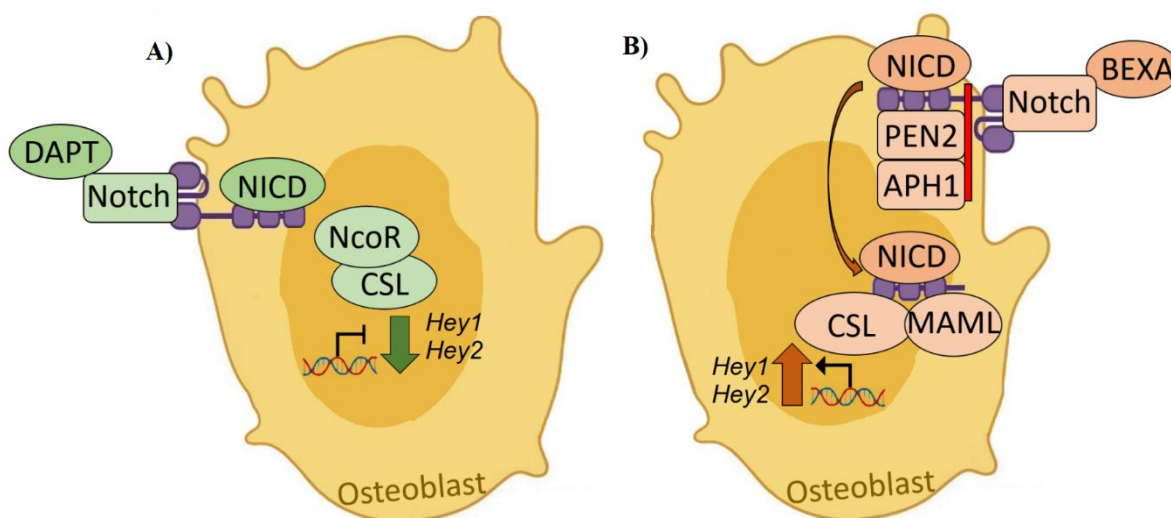


Figura 2. Via de sinalização Notch. (A) Via Notch inativada (presença de agonista). (B) Via Notch ativada (presença de antagonista mimetizando ligante endógeno).

A modulação desses mecanismos celulares por meio de agonistas e antagonistas pode afetar a interação entre tecido ósseo e implantes de titânio (Ti), que também é dependente das características da superfície. Os mecanismos de favorecimento ou indução da diferenciação osteoblástica por características topográficas e químicas das superfícies de Ti têm sido amplamente discutidos na

literatura (Costa et al., 2017; Silverwood et al., 2016; Mendonça et al., 2010; Martin et al., 1995). A investigação das interações entre os osteoblastos e o Ti com a nanotopografia (Ti-Nano), obtida através do condicionamento químico com H₂SO₄/H₂O₂, mostrou que a nanotopografia é capaz de induzir a diferenciação osteoblástica tanto em condições osteogênicas quanto não-osteogênicas (Bighetti-Trevisan et al., 2022; Rosa et al., 2014; de Oliveira et al., 2007).

Investigações do nosso grupo demonstraram a participação de pelo menos três mecanismos celulares envolvidos no potencial osteogênico da nanotopografia: (1) a modulação da via de sinalização de integrinas por atuar sobre as integrinas $\alpha 1$, αv , $\beta 1$ e $\beta 3$ (Lopes et al., 2019; Rosa et al., 2014), (2) a modulação da via de sinalização de BMPs pela combinação de aumento da produção endógena de BMP-2 e de redução da expressão de alguns microRNAs, responsáveis pela inibição das proteínas intracelulares *mothers against decapentaplegic homolog 1 e 4* (SMAD1 e SMAD4), ambas transdutoras do sinal osteogênico da BMP-2 (Castro-Raucci et al., 2016; Kato et al., 2014), e (3) a modulação da via de sinalização de Wnt canônica por atuar sobre receptores Frizzled 4 e 6 (Abuna et al., 2020).

Como as vias Hedgehog e Notch regulam a osteogênese e seus possíveis envolvimento com o potencial osteogênico do Ti-Nano ainda não foi investigado, levantamos a hipótese de que estas vias participam da diferenciação osteoblástica induzida pela nanotopografia. O entendimento dos mecanismos intracelulares envolvidos nas respostas de osteoblastos às superfícies de Ti poderá contribuir para o estabelecimento de novas abordagens terapêuticas, usando estratégias de modulação de vias de sinalização celular para favorecer a interação entre o tecido ósseo e biomateriais.

2. PROPOSIÇÃO

Investigar o efeito de agonistas e antagonistas das vias de sinalização Hedgehog e Notch na diferenciação osteoblástica de células cultivadas sobre Ti com nanotopografia.

2.1 Objetivos específicos

- Selecionar as concentrações de purmorfamina, ciclopamina, bexaroteno e DAPT com efeitos mais eficazes sobre a diferenciação osteoblástica;
- Avaliar os efeitos da modulação da via de sinalização Hedgehog na diferenciação de osteoblastos e na expressão de receptores Hedgehog em células cultivadas sobre Ti-Control e Ti-Nano;
- Avaliar os efeitos da modulação da via de sinalização Notch na diferenciação de osteoblastos e na expressão de receptores Notch em células cultivadas em Ti-Control e Ti-Nano;
- Avaliar os efeitos da combinação da modulação das vias de sinalização Hedgehog e Notch na expressão gênica de marcadores ósseos em células cultivadas em Ti-Control e Ti-Nano.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Seleção das concentrações de purmorfamina, ciclopamina, bexaroteno e DAPT com maiores efeitos sobre a diferenciação osteoblástica

3.1.1. Preparação dos agonistas e antagonistas das vias Hedgehog e Notch

O agonista da via Hedgehog purmorfamina [2-(1-Naphthoxy)-6-(4-morpholinoanilino)-9-cyclohexylpurin] (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) foi preparado em concentrações de 0,5, 1 e 2 μM e o antagonista ciclopamina-KAAD [3-ceto-N-aminoetil-N'-aminocaproildi-hidrocinamoil ciclopamina] (Calbiochem, Gibbstown, NJ, EUA) em concentrações de 10, 100 e 1000 nM. O antagonista da via Notch DAPT [GSI-IX, LY-374973, N-[N-(3, 5-Difluorofenacetil)-L-alanil]-S-fenilglicinat-butyl éster] (Sigma-Aldrich) foi preparado em concentrações de 10, 15 e 20 μM e o antagonista bexaroteno [4-[1-(5,6,7,8-Tetrahydro-3,5,5,8,8-pentametil-2-naftalenil)etenil]ácido benzóico] (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) foi preparado em concentrações de 0,1, 0,5 e 1 μM . Todos os agonistas e antagonistas foram dissolvidos no veículo dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) e diluídos em meio de cultura e as concentrações foram selecionadas com base na literatura (Chitranshi et al., 2019; Jing et al., 2010; Sinha et al., 2006; Wu et al., 2004).

3.1.2. Isolamento e cultura de osteoblastos

Após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (Protocolo nº 2019.5.309.58.0), os osteoblastos foram obtidos de calvárias de ratos *Sprague-Dawley* machos recém-nascidos de 2 a 4 dias de idade (de Oliveira et al., 2004; de Oliveira et al., 2003). As células foram isoladas por digestão enzimática sequencial com solução de tripsina 0,25% e colagenase tipo II 10 mg/mL (Gibco-Life Technologies, Waltham, MA, EUA) a 37°C por 5, 15 e 25 minutos. Os sobrenadantes dos dois últimos processos digestivos foram reunidos e centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos. Os osteoblastos foram cultivados em meio mínimo essencial, modificação alfa (α -MEM) (Gibco-Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco-Life Technologies), 5 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico (Gibco-Life Technologies), 7 mM β -glicerofosfato (Sigma-

Aldrich) e 50 µg/mL de gentamicina em placas de cultura de poliestireno de 24 poços (Corning Life Sciences, Corning, NY, EUA) à densidade de 2×10^4 células por poço. As culturas foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico na presença do veículo (DMSO), com os agonistas e antagonistas das vias Hedgehog ou Notch por até 17 dias.

3.1.3. Análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-TR)

A expressão gênica do marcador osteoblástico osteopontina (*Opn*) foi avaliada no dia 10 por PCR-TR. O reagente trizol foi adicionado às culturas (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e o RNA total foi extraído usando o kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Fitchburg, WI, EUA). O RNA total foi quantificado usando o dispositivo NanoVue (GE Healthcare, Chicago, IL, EUA) e uma reação de transcrição reversa foi realizada para sintetizar o DNA complementar (cDNA) usando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para o PCR-TR, o sistema SYBR Green e os primers (Tabela 1) foram usados no dispositivo QuantStudio™ 7 Flex System (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA). As reações foram realizadas (n=4) e os dados foram analisados com base no valor limiar do ciclo (Ct). Como controle endógeno, foi avaliada a expressão do gene constitutivo eucariótico fator de iniciação da tradução 2B, subunidade 1 alfa (*Eif2b1*) e o método 2-ddCt foi usado para comparar a expressão gênica dos grupos experimentais (Abuna et al., 2018; Livak et al., 2001).

Tabela 1. Sequências de primers para PCR-TR

Gene	Forward	Reverse
<i>Opn</i>	GAAGCCTGACCCATCTCAGAA	GTTGCTTGGAAGAGTTTCTTGCTT
<i>Runx2</i>	CGTATTTTCAGATGATGACACTGCC	AAATGCCTGGGAAGTGCCTG
<i>Alp</i>	TACTGCTGATCACTCCCACG	ACCGTCCACCACCTTGTAAC
<i>Gli1</i>	ACCTGCAAACCGTAATCCGT	TCCTAAAGAAGGGCTCATGGTG
<i>Gli2</i>	CCAACCAGAATAAGCAGAACAGC	TGAGATCAGCCAGTTGCTCC
<i>Gli3</i>	AGTCAGCCCTGCGGAATACT	GGGAAATCTGGTGCTGTCCAT
<i>Hes1</i>	ACGACACCGGACAAACCAA	CGGGAGCTATCTTTCTTAAGTGCAT

<i>Hey1</i>	GCCGACGAGACCGAATCAAT	ATAGTCCATAGCCAGGGCGT
<i>Hey2</i>	CGTGGGGAGCGAGAACAATTA	ATTTATTTCGATCCCGACGCCT
<i>Eif2β</i>	ACCTCCCTGGAATACTCTGACT	TCGCCCGTCTTTGATGAAT

3.1.4. Análise da atividade de ALP por coloração Fast Red

A atividade da ALP foi avaliada no dia 7 usando a coloração Fast Red. As culturas foram incubadas com 1 mL de solução contendo 1,8 mM de Fast Red-TR (Sigma-Aldrich), 0,9 mM de Naftol AS-MX fosfato (Sigma-Aldrich) e 4 mg/mL de dimetilformamida (Sigma-Aldrich) por 30 minutos a 37°C em incubadora com umidade contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Em seguida, os poços foram secos à temperatura ambiente e imagens das culturas coradas foram obtidas com câmera de alta resolução (Canon EOS Digital Rebel Camera, Canon, Lake Success, NY, EUA). As áreas coradas dos poços foram quantificadas por contagem de pixels usando o software ImageJ 1.52 (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, EUA) e os dados (n=5) foram expressos em porcentagem de área.

3.1.5. Análise da mineralização da matriz extracelular por coloração com vermelho de alizarina

A formação de matriz extracelular mineralizada foi avaliada no dia 17 por coloração com vermelho de alizarina. As culturas foram fixadas com formol 10% à 4°C por 24 horas, desidratadas com álcool, secas à temperatura ambiente e coradas com vermelho de alizarina 2% (Sigma-Aldrich). A quantificação foi feita de acordo com o método previamente descrito (Gregory et al., 2004). As culturas foram incubadas com 280 μ L de ácido acético a 10% sob agitação suave por 30 minutos. Em seguida, essa solução foi agitada em vórtex por 30 segundos, aquecida à 85°C por 10 minutos, transferida para gelo por 5 minutos, centrifugada a 13.000 g por 20 minutos e 100 μ L do sobrenadante foram transferidos para placas de 96 poços (Corning Life Sciences) contendo 40 μ L de hidróxido de amônio 10%. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, EUA) usando o comprimento de onda de 405 nm e os dados (n=5) foram expressos como absorbância.

3.2. Efeito da modulação da sinalização Hedgehog na diferenciação de osteoblastos e na expressão de receptores Hedgehog em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano

3.2.1. Modificação e caracterização da superfície de Ti

Discos de Ti tipo 2 comercialmente puros (13 x 2 mm, Realum, São Paulo, SP, Brasil) foram polidos com carboneto de silício (granulação de 180, 320 e 600), limpos em etanol 70% (Merck Millipore, Darmstadt, HE, Alemanha) e lavado por sonicação em água destilada. Os discos foram condicionados com solução de H₂SO₄ 10N (Merck Millipore) e H₂O₂ 30% (Merck Millipore) por 4 horas em temperatura ambiente, sob agitação constante para gerar a nanotopografia (Ti-Nano). Discos de Ti não condicionados foram usados como controle (Ti-Controle). Todos os discos foram lavados em água destilada sob sonicação, autoclavados e secos ao ar. Para caracterizar a topografia da superfície, os discos de Ti foram examinados sob microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo (MEV) operada a 5kV (Inspect S50) (FEI Company, Hillsboro, OR, EUA).

3.2.2. Isolamento, cultura de osteoblastos, análise da expressão gênica, atividade de ALP e mineralização da matriz extracelular

Os osteoblastos foram cultivados em discos Ti-Controle e Ti-Nano em placas de cultura de poliestireno de 24 poços (Corning Life Sciences) à densidade de 2x10⁴ células por disco, na presença do veículo, do agonista purmorfamina (Sigma-Aldrich), ou do antagonista ciclopamina (Calbiochem) nas concentrações previamente selecionadas. As análises da expressão gênica de *Runx2*, *Opn*, *Alp*, *Gli1*, *Gli2* e *Gli3* usando os primers apresentados na Tabela 1, atividade de ALP e mineralização da matriz extracelular foram feitas conforme já detalhado, nos mesmos períodos. Além disso, a expressão das proteínas RUNX2 e GLI1 foi avaliada por western blot no dia 10.

3.2.3. Análise da expressão da proteína por western blot

As expressões das proteínas RUNX2 e GLI1 foram detectadas no dia 10 por western blot. As células foram lisadas com 300 µL de tampão de lise contendo 1x mistura de inibidor de protease (Roche Applied Science, Penzberg, BY, Alemanha), fluoreto de fenilmetanossulfonil 1 mM (Sigma-Aldrich) e inibidor de proteassoma MG132 25 µM (Roche Applied Science). Em seguida, 25 µg da proteína total foram desnaturados, separados em gel de eletroforese de poliacrilamida SDS e transferidos para uma membrana de PVDF (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) em um Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA, EUA). A membrana foi submetida a três incubações de 1 hora cada à temperatura ambiente com: (1) solução salina tamponada com Tris com 0,1% de Tween® 20 (Sigma-Aldrich) contendo 5% de leite em pó desnatado (Bio-Rad Laboratories), (2) anticorpo primário anti-RUNX2 (8486, 1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA), anti-GLI1 (ab273018-1:1000; Abcam, Trumpington, CB, Reino Unido) ou anti-GAPDH (sc-25778, 1 :1000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) e (3) anticorpo secundário IgG anti-coelho produzido em cabra (7074, 1:3000, Cell Signaling Technology). As proteínas foram detectadas usando Clarity™ Western ECL Substrate (PerkinElmer Life Sciences, Waltham, MA, EUA) e imagens foram adquiridas com o dispositivo G:BOX (Syngene, Cambridge, CB, Reino Unido). As expressões RUNX2 e GLI1 foram quantificadas (n=3) usando o software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA) e normalizadas para a expressão da proteína GAPDH.

3.3. Efeito da modulação da sinalização Notch na diferenciação osteoblástica e na expressão de receptores Notch em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano

3.3.1. Isolamento, cultura de osteoblastos, análise da expressão gênica, atividade de ALP, mineralização da matriz extracelular e expressão proteica

Os osteoblastos foram cultivados em discos Ti-Controle e Ti-Nano em placas de cultura de poliestireno de 24 poços (Corning Life Sciences) à densidade de 2×10^4 células por disco, na presença do veículo, do antagonista DAPT (Sigma-Aldrich) ou do agonista bexaroteno (Santa Cruz Biotechnology) nas concentrações previamente

selecionadas. As análises da expressão gênica de *Runx2*, *Opn*, *Alp*, *Hes1*, *Hey2* e *Hey3* utilizando os primers apresentados na Tabela 1, expressão proteica de RUNX2 e HES1, atividade de ALP e mineralização da matriz extracelular foram feitas conforme já detalhado, nos mesmos períodos. O anticorpo usado para detectar HES1 por Western blot foi anti-HES1 (11988, 1:1000; Cell Signaling Technology) e o anticorpo secundário foi IgG anti-coelho produzido em cabra (7074, 1:3000, Cell Signaling Technology).

3.4. Efeito da combinação da modulação de sinalização Hedgehog e Notch na expressão gênica de marcadores ósseos em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano

Para avaliar o efeito da combinação da modulação das vias de sinalização Hedgehog e Notch, os osteoblastos foram cultivados em discos Ti-Controle e Ti-Nano em placas de cultura de poliestireno de 24 poços (Corning Life Sciences) à densidade de 2×10^4 células por disco, na presença do veículo, da associação do agonista de Hedgehog purmorfamina (Sigma-Aldrich) com o antagonista de Notch DAPT (Sigma-Aldrich) ou da associação do antagonista de Hedgehog ciclopamina (Calbiochem) com o agonista de Notch bexaroteno (Santa Cruz Biotechnology) nas concentrações previamente selecionadas. A análise da expressão gênica de *Runx2*, *Opn* e *Alp* utilizando os primers apresentados na Tabela 1 foi feita conforme já detalhado, no mesmo período.

3.5. Análise estatística

Os dados da seleção das concentrações dos agonistas e antagonistas de Hedgehog e Notch foram analisados por ANOVA One-Way, seguido do pós-teste de Tukey. Os dados dos efeitos das modulações das vias de sinalização Hedgehog e Notch na diferenciação osteoblástica e na expressão dos receptores Hedgehog e Notch em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano foram analisados usando ANOVA Two-Way, seguido do pós-teste de Tukey. Os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão e o nível de significância foi estabelecido em $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Seleção das concentrações de purmorfamina, ciclopamina, bexaroteno e DAPT com maiores efeitos sobre a diferenciação osteoblástica

A seleção das concentrações dos agonistas e antagonistas de Hedgehog e Notch foi baseada na expressão do gene *Opn*, atividade de ALP e mineralização da matriz extracelular de células cultivadas em poliestireno. Uma maior diferenciação de osteoblastos induzida por purmorfamina foi observada na concentração de 2 μM (Figura 3). A expressão do gene *Opn* foi maior na concentração de 2 μM em comparação com 1 μM ($p < 0,001$), que foi maior que 0,5 μM ($p < 0,001$) e veículo ($p < 0,001$) e não houve diferença estatisticamente significativa entre 0,5 μM e veículo ($p = 0,992$, Figura 3A). A atividade da ALP foi maior na concentração de 2 μM em comparação com 1 μM ($p < 0,001$), 0,5 μM ($p < 0,001$) e veículo ($p < 0,001$), que foi menor no veículo em comparação com 0,5 μM ($p < 0,001$) e 1 μM ($p < 0,001$), sem diferença estatisticamente significativa entre eles ($p = 0,520$, Figura 3B). A mineralização da matriz extracelular foi maior na concentração de 2 μM em comparação com 1 μM ($p < 0,001$), que foi superior a 0,5 μM ($p < 0,001$) e veículo ($p < 0,001$) e não houve diferença estatisticamente significativa entre veículo e 0,5 μM ($p = 1,000$, Figura 3C).

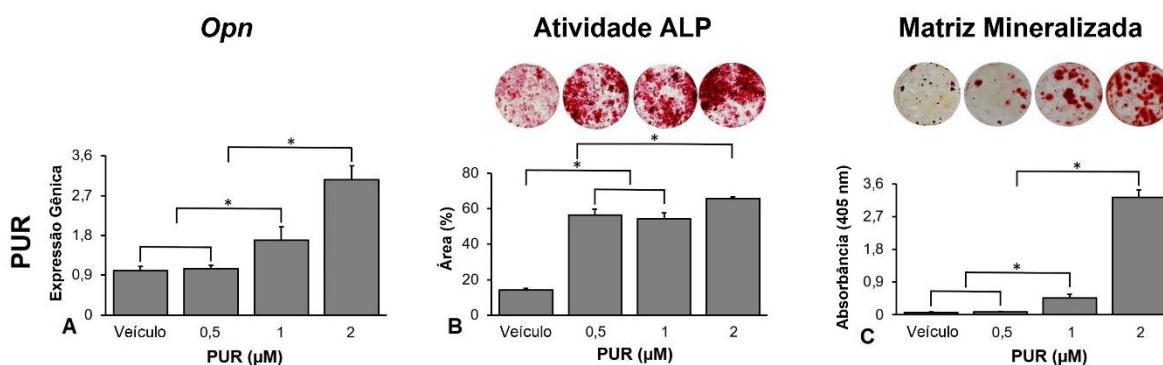


Figura 3. Expressão do gene osteopontina (*Opn*) no dia 10 (A), atividade da fosfatase alcalina (ALP) no dia 7 (B) e mineralização da matriz extracelular no dia 17 (C) em osteoblastos cultivados em poliestireno com veículo ou o agonista Hedgehog purmorfamina (PUR) nas concentrações de 0,5, 1 e 2 μM de PUR. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão e os asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

O melhor efeito da ciclopamina na diminuição da diferenciação osteoblástica foi observado na concentração de 1000 nM (Figura 4); no entanto, como

a ciclopamina 1000 nM exibiu algum efeito citotóxico, selecionamos a 10 nM para os experimentos posteriores. A expressão do gene *Opn* foi menor na concentração de 1000 nM em comparação com 10 nM ($p < 0,001$), que foi menor que 100 nM ($p < 0,001$) e veículo ($p < 0,001$) e não houve diferença estatisticamente significativa entre eles ($p = 0,549$, Figura 4A). A atividade de ALP foi menor na concentração de 1000 nM em comparação com 10 nM ($p = 0,001$), que foi menor que 100 nM ($p < 0,001$) que foi menor que o veículo ($p < 0,001$, Figura 4B). A mineralização da matriz extracelular foi menor nas concentrações de 1000 e 10 nM em comparação com 100 nM ($p = 0,002$ e $p = 0,009$) e veículo ($p = 0,001$ e $p = 0,004$), sem diferenças estatisticamente significantes entre 1000 e 10 nM ($p = 0,553$) e 100 nM e veículo ($p = 0,937$, Figura 4C).

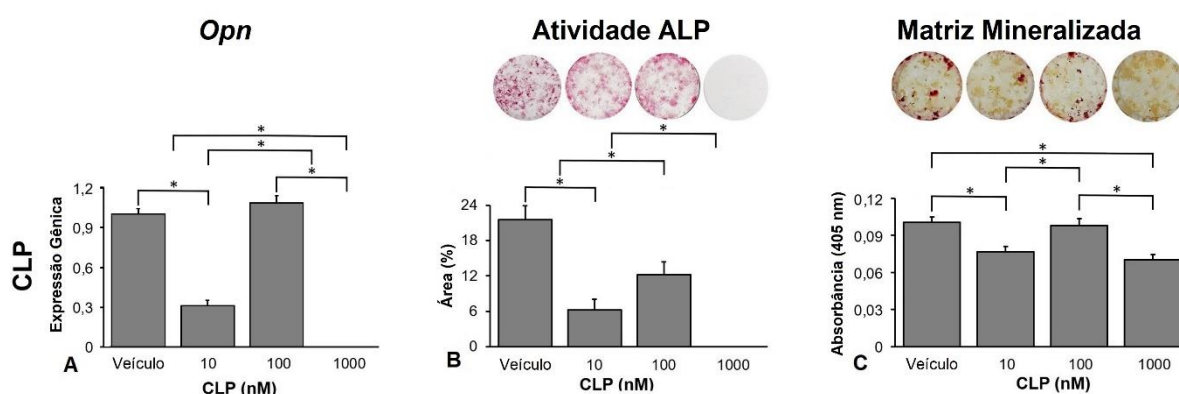


Figura 4. Expressão do gene osteopontina (*Opn*) no dia 10 (A), atividade da fosfatase alcalina (ALP) no dia 7 (B) e mineralização da matriz extracelular no dia 17 (C), em osteoblastos cultivados em poliestireno com veículo ou o agonista Hedgehog ciclopamina (CLP) nas concentrações de 10, 100 e 1000 nM de CLP. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão e os asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

O melhor efeito de DAPT no aumento da diferenciação de osteoblastos foi observado na concentração de 20 μ M (Figura 5). A expressão do gene *Opn* foi maior na concentração de 20 μ M em comparação com 15 μ M ($p = 0,028$), 10 μ M ($p = 0,005$) e veículo ($p = 0,002$) e não houve diferenças estatisticamente significantes entre veículo, 10 e 15 μ M ($p = 0,384$, $p = 0,775$ e $p = 0,894$, Figura 5A). A atividade de ALP foi maior nas concentrações de 20 e 15 μ M em comparação com 10 μ M ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) e veículo ($p < 0,001$ e $p < 0,001$), sem diferenças estatisticamente significantes entre 20 e 15 μ M ($p = 0,831$) e 10 μ M e veículo ($p = 0,871$, Figura 5B). A mineralização da matriz extracelular foi maior na concentração de 20 μ M em comparação com 15 μ M ($p = 0,041$), 10 μ M ($p = 0,027$) e veículo ($p = 0,014$) e não houve diferenças

estatisticamente significantes entre veículo, 10 e 15 μM ($p=0,866$, $p=0,990$ e $p=0,964$, Figura 5C).

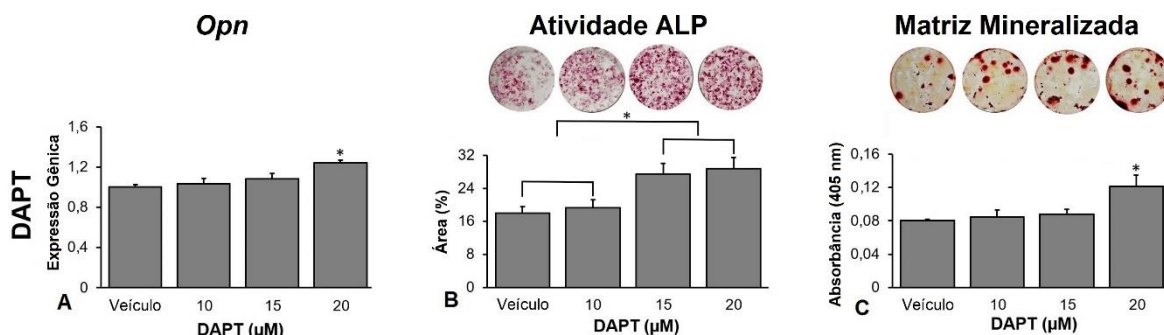


Figura 5. Expressão do gene osteopontina (*Opn*) no dia 10 (A), atividade da fosfatase alcalina (ALP) no dia 7 (B) e mineralização da matriz extracelular no dia 17 (C), em osteoblastos cultivados em poliestireno com veículo ou o antagonista Notch DAPT nas concentrações de 10, 15 e 20 μM de DAPT. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão e os asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

O melhor efeito do bexaroteno na diminuição da diferenciação osteoblástica foi observado na concentração de 0,1 μM (Figura 6). A expressão do gene *Opn* foi menor na concentração de 0,1 μM em comparação com 0,5 μM ($p=0,013$) e 1 μM ($p=0,003$), que foram menores que o veículo ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) e não houve diferença estatisticamente significativa entre 0,5 e 1 μM ($p=0,809$, Figura 6A). A atividade da ALP foi menor nas concentrações de 0,1 e 0,5 μM em comparação com 1 μM ($p < 0,001$, $p < 0,001$), que foi menor que o veículo ($p=0,007$) e não houve diferença estatisticamente significativa entre 0,1 e 0,5 μM ($p=0,918$, Figura 6B). A mineralização da matriz extracelular foi menor nas concentrações de 0,1 e 1 μM em comparação com 0,5 μM ($p=0,024$ e $p=0,034$) e veículo ($p=0,012$ e $p=0,016$), sem diferenças estatisticamente significantes entre 0,1 e 1 μM ($p=0,994$) e 0,5 μM e veículo ($p=0,948$, Figura 6C).

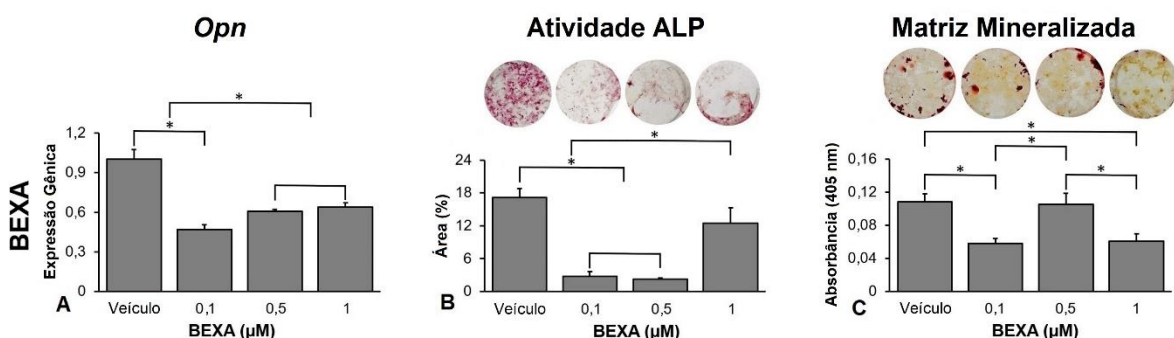


Figura 6. Expressão do gene osteopontina (*Opn*) no dia 10 (A), atividade da fosfatase alcalina (ALP) no dia 7 (B) e mineralização da matriz extracelular no dia 17 (C), em osteoblastos cultivados em poliestireno com veículo ou o agonista Notch bexaroteno (BEXA) nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1 μM de BEXA. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão e os asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significante ($p \leq 0,05$).

Com base nesses resultados, selecionamos as seguintes concentrações para os experimentos posteriores deste estudo: Purmorfamina 2 μM , Ciclopamina 10 nM, DAPT 20 μM e Bexaroteno 0,1 μM .

4.2. Efeito da modulação da sinalização Hedgehog na diferenciação de osteoblastos e na expressão de receptores Hedgehog em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano

4.2.1. Modificação e caracterização da superfície de Ti

A microscopia eletrônica de varredura mostrou que enquanto o Ti-Controle apresenta uma superfície polida (Figura 7A), o Ti-Nano produzido pelo tratamento com $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ exibiu nanoporos em toda a superfície (Figura 7B).

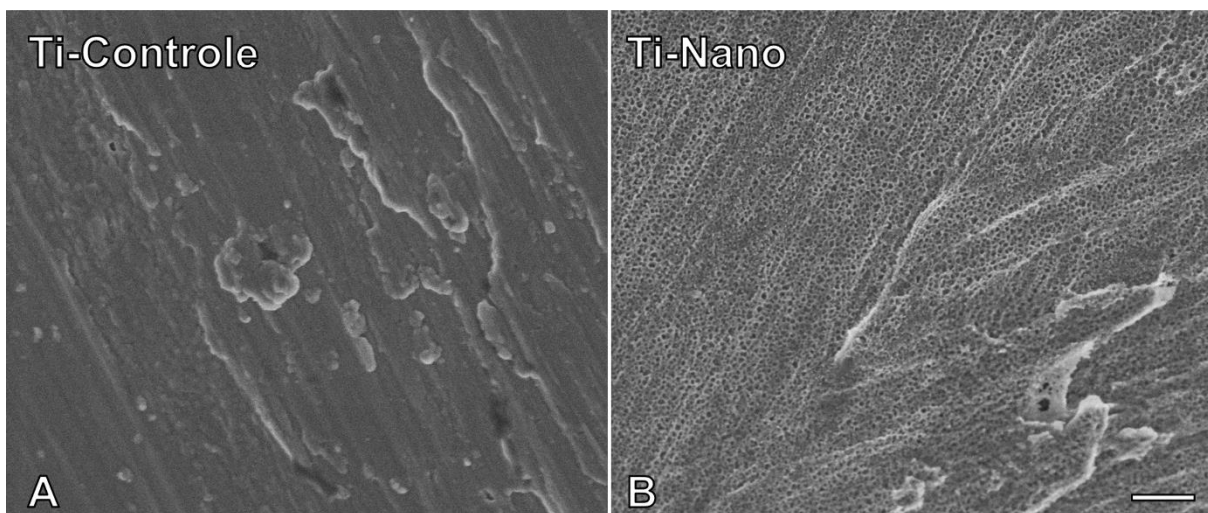


Figura 7. Topografia da superfície dos discos de titânio (Ti). Imagens geradas por micrografia eletrônica de varredura de Ti-Controle (A) e Ti-Nano (B). Barra de escala (A e B): 200 nm.

4.2.2. Efeito do agonista de Hedgehog purmorfamina na diferenciação osteoblástica e na expressão de receptores Hedgehog em osteoblastos cultivados em Ti-Control e Ti-Nano

A interação entre as superfícies de Ti e o tratamento com purmorfamina afetou a expressão gênica de *Runx2* ($p \leq 0,001$), *Alp* ($p \leq 0,001$) e *Opn* ($p = 0,043$, Figura 8). A purmorfamina aumentou a expressão gênica de *Runx2* ($p < 0,001$ e $p < 0,001$), *Alp* ($p = 0,001$ e $p = 0,004$) e *Opn* ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) em células cultivadas em Ti-Control e Ti-Nano. Na presença do veículo, a expressão gênica de *Runx2* ($p < 0,001$) foi menor, enquanto *Alp* ($p < 0,001$) e *Opn* ($p = 0,008$) foi maior em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Control. Na presença de purmorfamina, a expressão gênica de *Runx2* ($p < 0,001$), *Alp* ($p < 0,001$) e *Opn* ($p < 0,001$) foi maior em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Control (Figura 8A). A interação entre as superfícies de Ti e o tratamento com purmorfamina também afetou a expressão da proteína RUNX2 ($p \leq 0,001$, Figura 8B). A purmorfamina aumentou a expressão da proteína RUNX2 ($p = 0,003$ e $p = 0,016$) em células cultivadas em Ti-Control e Ti-Nano. Na presença do veículo ou purmorfamina, a expressão da proteína RUNX2 ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) foi maior em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Control (Figura 8B).

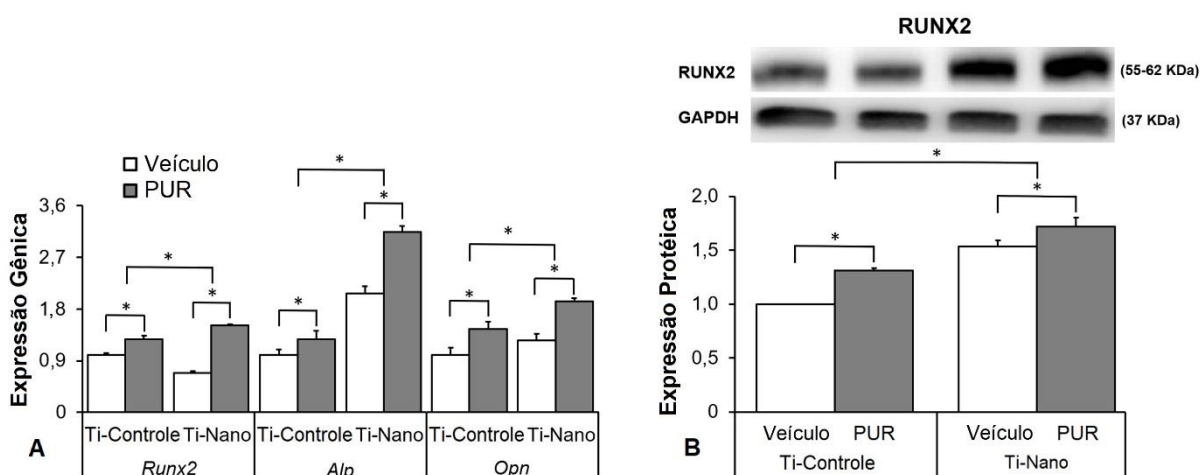


Figura 8. Expressão gênica dos marcadores osteoblásticos fator de transcrição relacionado a runt 2 (*Runx2*), osteopontina (*Opn*) e fosfatase alcalina (*Alp*) no dia 10 (A) e a expressão da proteína RUNX2 no dia 10 (B), em osteoblastos cultivados em Ti-Control e Ti-Nano com veículo ou PUR 2 μ M. Dados de expressão gênica ($n=4$) e expressão proteica ($n=3$) são apresentados como média \pm desvio padrão e * indica diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

A interação entre as superfícies de Ti e o tratamento com purmorfamina não afetou a expressão da atividade de ALP ($p = 0,270$, Figura 9). A purmorfamina

aumentou a atividade de ALP ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano. Na presença de veículo, a atividade da ALP ($p = 0,431$) não foi afetada pelas superfícies de Ti. Na presença de purmorfamina, a atividade ALP ($p = 0,028$) foi maior em Ti-Nano em comparação com Ti-Controle (Figura 9A). A interação entre as superfícies de Ti e o tratamento com purmorfamina não afetou a mineralização da matriz extracelular ($p = 0,111$). A purmorfamina aumentou a mineralização da matriz extracelular ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano. Na presença do veículo ou purmorfamina a mineralização da matriz extracelular ($p = 0,284$ e $p = 0,221$) não foi afetada pelas superfícies de Ti (Figura 9B).

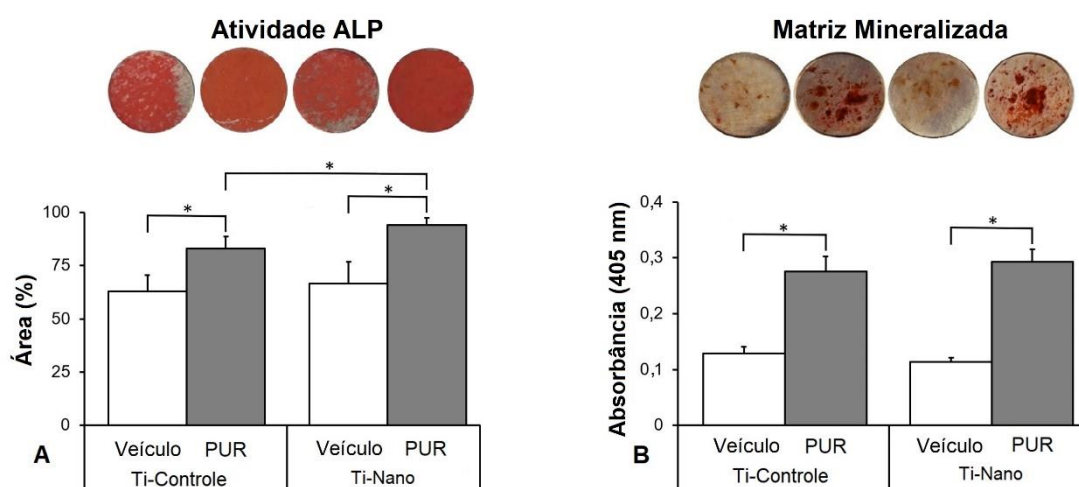


Figura 9. Atividade de ALP no dia 7 (A) e mineralização da matriz extracelular no dia 17 (B), em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano com veículo ou PUR 2 μ M. Dados de atividade de ALP ($n = 5$) e mineralização da matriz extracelular ($n = 5$) são apresentados como média \pm desvio padrão e * indica diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

A interação entre as superfícies de Ti e o tratamento com purmorfamina afetou a expressão de *Gli1* ($p \leq 0,001$), *Gli2* ($p \leq 0,001$) e *Gli3* ($p \leq 0,001$, Figura 10). A purmorfamina regulou positivamente a expressão gênica de *Gli1* ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) e *Gli2* ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) e negativamente *Gli3* ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) em células cultivadas tanto em Ti-Controle quanto em Ti-Nano. Na presença do veículo, a expressão gênica de *Gli1* ($p = 0,018$) foi maior, enquanto *Gli2* ($p < 0,001$) e *Gli3* ($p < 0,001$) foram menores em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle. Na presença de purmorfamina, a expressão gênica de *Gli1* ($p = 0,001$) e *Gli2* ($p < 0,001$) foi maior, enquanto *Gli3* ($p < 0,001$) foi menor em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle (Figura 10A). A interação entre as superfícies de Ti e o tratamento com purmorfamina também afetou a expressão da proteína GLI1 ($p < 0,001$). A

purmorfamina aumentou a expressão da proteína GLI1 ($p=0,003$ e $p=0,016$) em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano. Na presença do veículo ou purmorfamina, a expressão da proteína GLI1 ($p<0,001$ e $p<0,001$) foi maior em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle (Figura 10B).

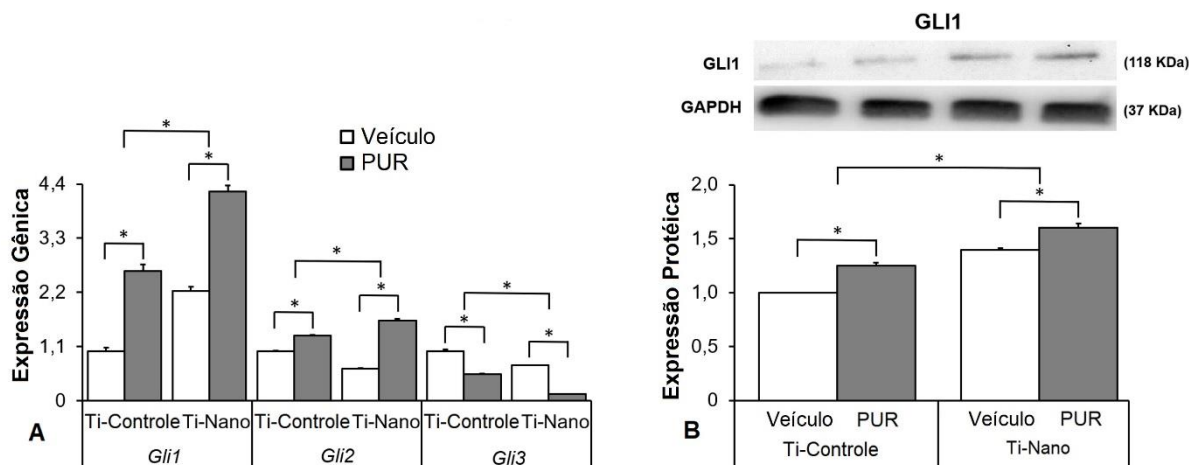


Figura 10. Expressão gênica dos receptores Hedgehog e fatores de transcrição zinc finger 1, 2 e 3 (*Gli1*, *Gli2* e *Gli3*) no dia 10 (A) e expressão da proteína GLI1 no dia 10 (B), em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano com veículo ou PUR 2 μ M. Dados de expressão gênica ($n=4$) e expressão proteica ($n=3$) são apresentados como média \pm desvio padrão e * indica diferenças estatisticamente significantes ($p\leq 0,05$).

4.2.3. Efeito do antagonista de Hedgehog ciclopamina na diferenciação osteoblástica e na expressão de receptores Hedgehog em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano

A interação entre as superfícies de Ti e o tratamento com ciclopamina afetou a expressão gênica de *Runx2* ($p\leq 0,001$), *Alp* ($p=0,001$) e *Opn* ($p\leq 0,001$, Figura 11). A ciclopamina regulou negativamente a expressão gênica de *Runx2* ($p<0,001$ e $p<0,001$), *Alp* ($p<0,001$ e $p<0,001$) e *Opn* ($p<0,001$ e $p<0,001$) em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano. Na presença do veículo, a expressão gênica de *Runx2* ($p<0,001$) foi menor, enquanto *Alp* ($p=0,020$) e *Opn* ($p<0,001$) foram maiores em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle. Na presença de ciclopamina, a expressão gênica de *Runx2* ($p=0,038$), *Alp* ($p=0,009$) e *Opn* ($p<0,001$) foi menor em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle (Figura 11A). A interação entre as superfícies de Ti e o tratamento com ciclopamina também afetou a expressão da proteína RUNX2 ($p\leq 0,001$). A ciclopamina diminuiu a expressão da proteína RUNX2 ($p<0,001$ e $p<0,001$) em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano. Na presença de veículo, a expressão da proteína RUNX2 ($p<0,001$ e $p<0,001$) foi maior, enquanto na

presença de ciclopamina foi menor, em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle (Figura 11B).

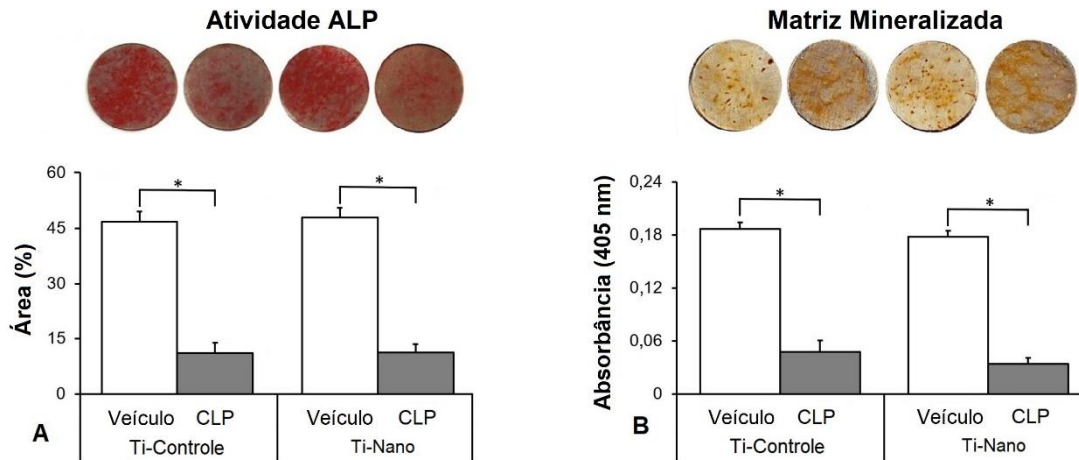


Figura 11. Expressão gênica dos marcadores osteoblásticos fator de transcrição relacionado a runt 2 (*Runx2*), osteopontina (*Opn*) e fosfatase alcalina (*Alp*) no dia 10 (A) e expressão da proteína RUNX2 no dia 10 (B), em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano com veículo ou CLP 10 nM. Dados de expressão gênica (n=4) e expressão proteica (n=3) são apresentados como média \pm desvio padrão e * indica diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

A interação entre superfícies de Ti e o tratamento com ciclopamina não afetou a atividade de ALP ($p=0,647$) e a mineralização da matriz extracelular ($p=0,653$, Figura 12). A ciclopamina diminuiu a atividade da ALP ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) e a mineralização da matriz extracelular ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano. Na presença do veículo ou da ciclopamina, a atividade de ALP ($p=0,513$ e $p=0,993$, Figura 12A) e a mineralização da matriz extracelular ($p=0,185$ e $p=0,059$, Figura 12B) não foram afetadas pelas superfícies de Ti.

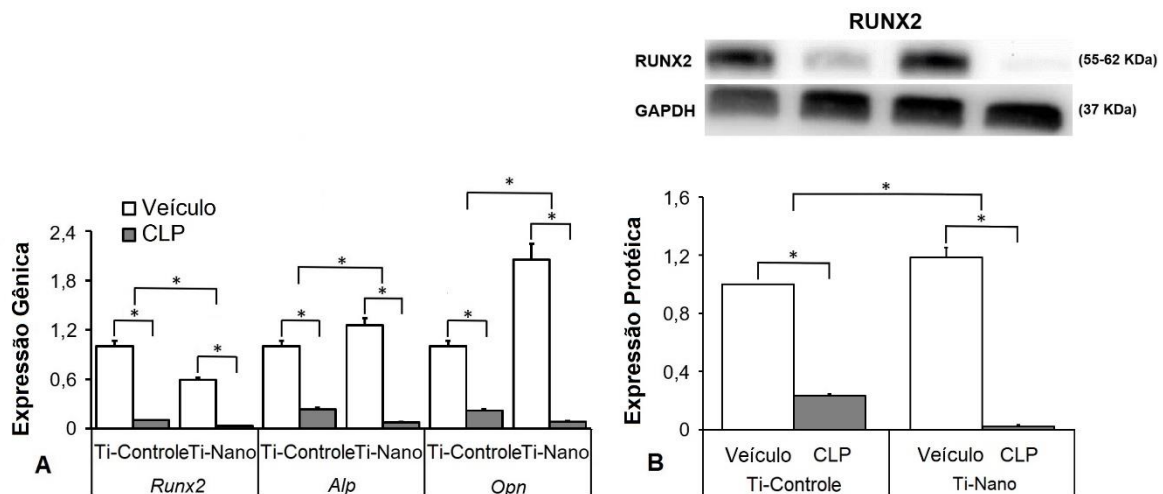


Figura 12. Atividade de ALP no dia 7 (A) e mineralização da matriz extracelular no dia 17 (B), em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano com veículo ou CLP 10 nM. Dados de expressão gênica (n=4) e expressão proteica (n=3) são apresentados como média \pm desvio padrão e * indica diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

de atividade de ALP (n=5) e mineralização da matriz extracelular (n=5) são apresentados como média \pm desvio padrão e * indica diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

A interação entre as superfícies de Ti e o tratamento com ciclopamina afetou a expressão de *Gli1* ($p \leq 0,001$), *Gli2* ($p \leq 0,001$) e *Gli3* ($p = 0,001$, Figura 13). A ciclopamina regulou negativamente a expressão gênica de *Gli1* ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) e *Gli2* ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) e regulou positivamente *Gli3* ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) em células cultivadas tanto em Ti-Controle quanto em Ti-Nano. Na presença do veículo, a expressão gênica de *Gli1* ($p = 0,346$) não foi afetada, enquanto *Gli2* ($p < 0,001$) foi maior e *Gli3* ($p < 0,001$) foi menor em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle. Na presença de ciclopamina, a expressão gênica de *Gli1* ($p = 0,006$) e *Gli2* ($p < 0,001$) foi menor, enquanto *Gli3* ($p < 0,001$) foi maior em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle (Figura 13A). A interação entre as superfícies de Ti e o tratamento com ciclopamina também afetou a expressão da proteína GLI1 ($p \leq 0,001$). A ciclopamina diminuiu a expressão da proteína GLI1 ($p < 0,001$, $p < 0,001$) em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano. Na presença do veículo ou ciclopamina, a expressão da proteína GLI1 ($p = 0,006$ e $p < 0,001$) foi maior em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle (Figura 13B).

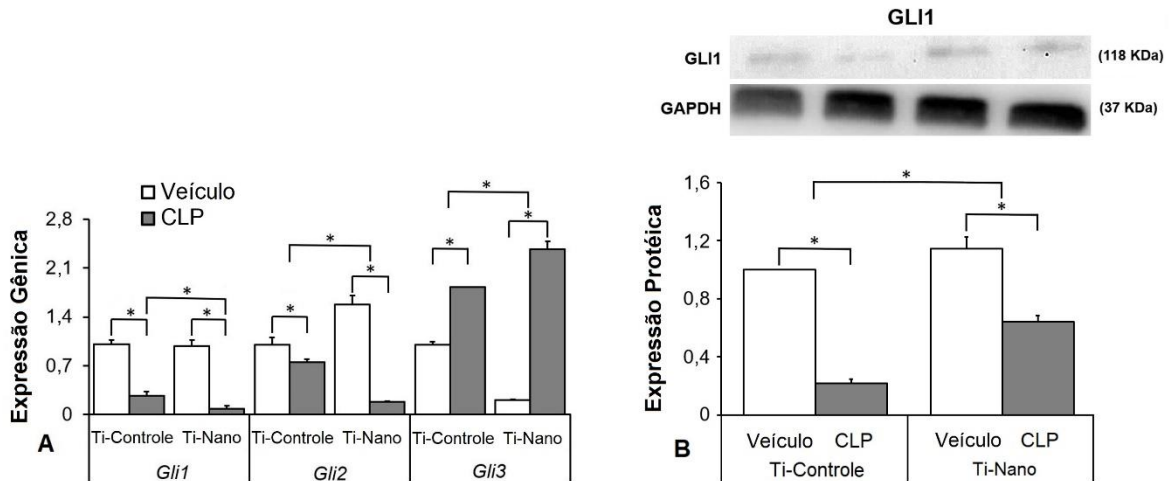


Figura 13. Expressão gênica dos receptores Hedgehog e fatores de transcrição zinc finger 1, 2 e 3 (*Gli1*, *Gli2* e *Gli3*) no dia 10 (A) e expressão da proteína GLI1 no dia 10 (B), em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano com veículo ou CLP 10 nM. Dados de expressão gênica (n=4) e expressão proteica (n=3) são apresentados como média \pm desvio padrão e * indica diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

4.3. Efeito da modulação da sinalização Notch na diferenciação de osteoblastos e na expressão de receptores Notch em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano

4.3.1. Efeito do antagonista de Notch DAPT na diferenciação osteoblástica e na expressão de receptores Notch em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano

A interação entre as superfícies de Ti e o tratamento com DAPT não afetou a expressão gênica de *Runx2* ($p=0,757$), mas afetou *Alp* ($p=0,043$) e *Opn* ($p=0,026$, Figura 14). O DAPT regulou positivamente a expressão gênica de *Runx2* ($p<0,001$ e $p<0,001$), *Alp* ($p<0,001$ e $p=0,008$) e *Opn* ($p<0,001$ e $p<0,001$) em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano. Na presença do veículo, a expressão gênica de *Runx2* ($p=0,114$), *Alp* ($p=0,863$) e *Opn* ($p=0,938$) não foi afetada pelas superfícies de Ti. Na presença de DAPT, a expressão gênica de *Runx2* ($p=0,233$) não foi afetada, enquanto *Alp* ($p=0,011$) e *Opn* ($p=0,005$) foram maiores em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle (Figura 14A). A interação entre as superfícies de Ti e o tratamento com DAPT também afetou a expressão da proteína RUNX2 ($p\leq 0,001$). DAPT aumentou a expressão da proteína RUNX2 ($p<0,001$ e $p<0,001$) em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano. Na presença do veículo, a expressão da proteína RUNX2 não foi afetada ($p=0,571$), enquanto na presença de DAPT foi maior ($p=0,016$), em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle (Figura 14B).

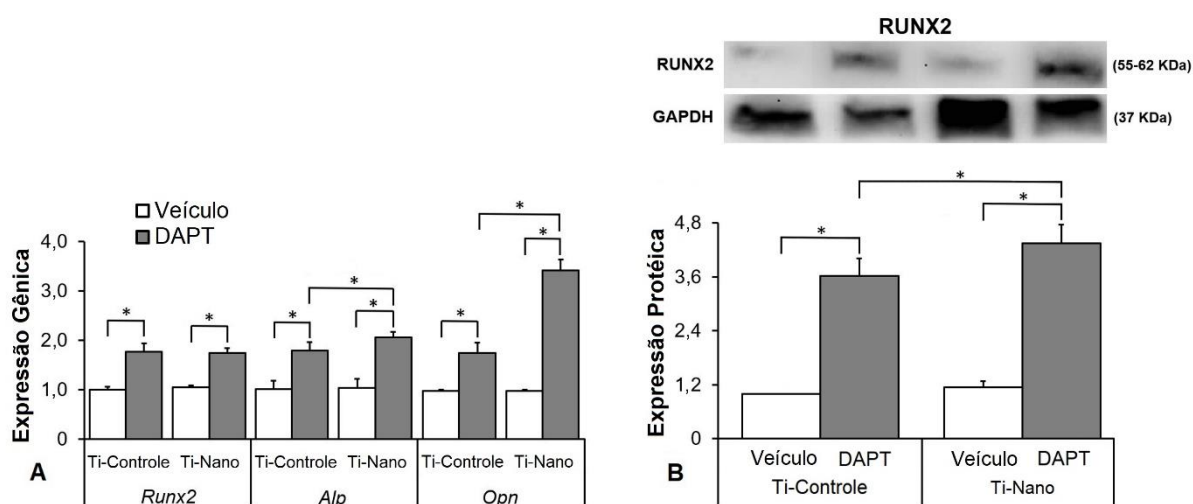


Figura 14. Expressão gênica dos marcadores osteoblásticos fator de transcrição relacionado a runt 2 (*Runx2*), osteopontina (*Opn*) e fosfatase alcalina (*Alp*) no dia 10 (A) e expressão da proteína RUNX2 no dia 10 (B), em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e

Ti-Nano com veículo ou DAPT 20 μ M. Dados de expressão gênica (n=4) e expressão proteica (n=3) são apresentados como média \pm desvio padrão e * indica diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

A interação entre as superfícies de Ti e o tratamento com DAPT afetou a atividade da ALP ($p \leq 0,001$) e a mineralização da matriz extracelular ($p = 0,014$, Figura 15). O DAPT aumentou a atividade de ALP ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) e mineralização da matriz extracelular ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano. Na presença do veículo ou DAPT, a atividade de ALP ($p = 0,007$ e $p = 0,023$) foi maior em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle (Figura 15A). Na presença do veículo, a mineralização da matriz extracelular não foi afetada ($p = 0,527$), enquanto na presença de DAPT foi maior ($p = 0,005$) nas células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle (Figura 15B).

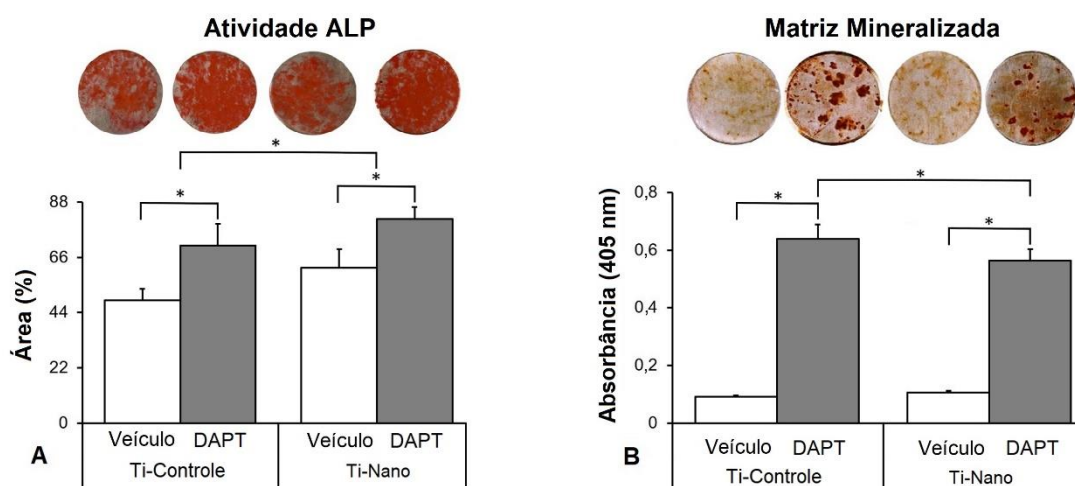


Figura 15. Atividade de ALP no dia 7 (A) e mineralização da matriz extracelular no dia 17 (B), em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano com veículo ou DAPT 20 μ M. Dados de atividade de ALP (n=5) e mineralização da matriz extracelular (n=5) são apresentados como média \pm desvio padrão e * indica diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

A interação entre as superfícies de Ti e o tratamento com DAPT afetou a expressão gênica de *Hes1* ($p = 0,002$), mas não de *Hey1* ($p = 0,869$) e *Hey2* ($p = 0,681$, Figura 16). O DAPT regulou positivamente a expressão gênica de *Hes1* ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) e regulou negativamente *Hey1* ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) e *Hey2* ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano. Na presença do veículo, a expressão gênica de *Hes1* ($p = 0,202$), *Hey1* ($p = 0,975$) e *Hey2* ($p = 0,771$) não foi afetada pelas superfícies de Ti. Na presença de DAPT, a expressão gênica de *Hes1* ($p = 0,001$) foi maior em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle, enquanto *Hey1* ($p = 0,840$) e *Hey2* ($p = 0,772$) não foram afetados por pela superfície Ti

(Figura 16A). A interação entre as superfícies de Ti e o tratamento com DAPT também afetou a expressão da proteína HES1 ($p \leq 0,001$). O DAPT aumentou a expressão da proteína HES1 ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano. Na presença do veículo, a expressão da proteína HES1 não foi afetada ($p = 0,274$), enquanto na presença de DAPT foi maior ($p = 0,003$) em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle (Figura 16B).

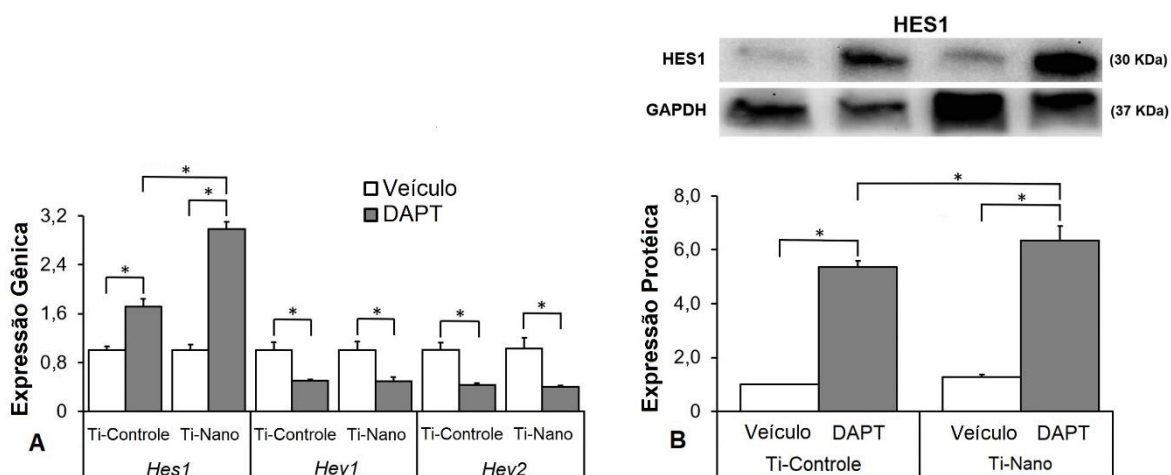


Figura 16. Expressão gênica Notch Hairy/enhancer-of-split-1 (Hes1) e fatores de transcrição relacionados a Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1 e 2 (Hey1 e Hey2) no dia 10 (A) e expressão da proteína HES1 no dia 10 (B), em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano com veículo ou DAPT 20 μ M. Dados de expressão gênica ($n=4$) e expressão proteica ($n=3$) são apresentados como média \pm desvio padrão e * indica diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

4.3.2. Efeito do agonista de Notch bexaroteno na diferenciação osteoblástica e na expressão de receptores Notch em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano

A interação entre as superfícies de Ti e o tratamento com bexaroteno não afetou a expressão gênica de *Runx2* ($p = 0,061$), mas afetou *Alp* ($p = 0,014$) e *Opn* ($p = 0,019$, Figura 17). Bexaroteno regulou negativamente a expressão gênica de *Runx2* ($p < 0,001$ e $p < 0,001$), *Alp* ($p = 0,004$ e $p < 0,001$) e *Opn* ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano. Na presença do veículo, a expressão gênica de *Runx2* ($p = 0,024$) e *Opn* ($p < 0,001$) foi menor, enquanto *Alp* ($p = 0,007$) foi maior nas células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle. Na presença de bexaroteno, a expressão gênica de *Runx2* ($p = 0,746$) e *Alp* ($p = 0,439$) não foram afetadas, enquanto *Opn* ($p = 0,041$) foi menor nas células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle.

(Figura 17A). A interação entre as superfícies de Ti e o tratamento com bexaroteno também afetou a expressão da proteína RUNX2 ($p \leq 0,001$). O bexaroteno diminuiu a expressão da proteína RUNX2 ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano. Na presença do veículo, a expressão da proteína RUNX2 foi maior ($p < 0,001$) em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle, enquanto na presença de bexaroteno não foi afetada ($p = 0,731$) pelas superfícies de Ti (Figura 17B).

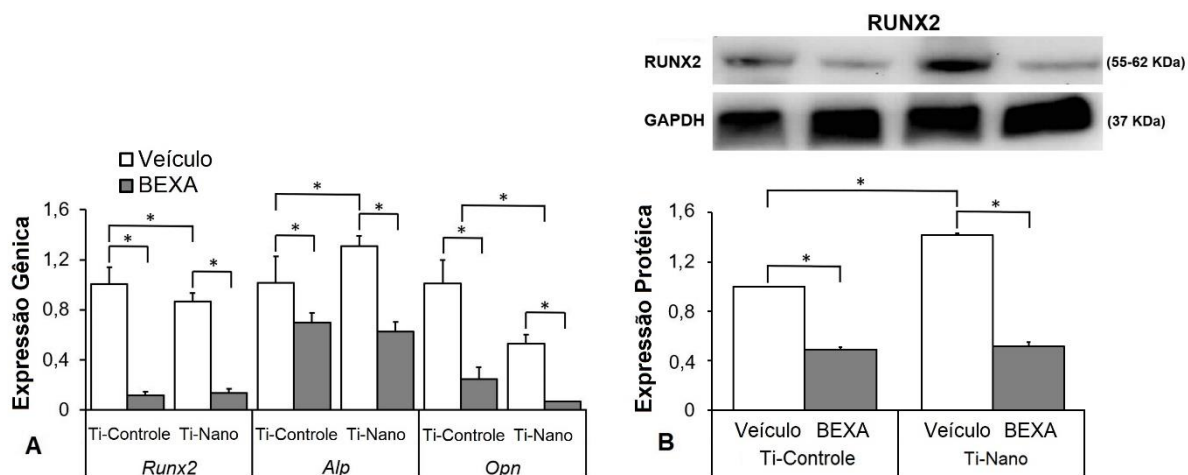


Figura 17. Expressão gênica dos marcadores osteoblásticos fator de transcrição relacionado a runt 2 (*Runx2*), osteopontina (*Opn*) e fosfatase alcalina (*Alp*) no dia 10 (A) e expressão da proteína RUNX2 no dia 10 (B), em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano com veículo ou BEXA 0,1 μ M. Dados de expressão gênica ($n=4$) e expressão proteica ($n=3$) são apresentados como média \pm desvio padrão e * indica diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

A interação entre as superfícies de Ti e o tratamento com bexaroteno afetou a atividade da ALP ($p \leq 0,001$) e a mineralização da matriz extracelular ($p \leq 0,001$, Figura 18). O bexaroteno diminuiu a atividade da ALP ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) e a mineralização da matriz extracelular ($p = 0,002$ e $p = 0,001$) em células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano. Na presença do veículo ou bexaroteno, a atividade de ALP ($p = 0,001$ e $p = 0,011$) foi maior em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle (Figura 18A). Na presença do veículo ou bexaroteno, a mineralização da matriz extracelular ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) foi menor em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle (Figura 18B).

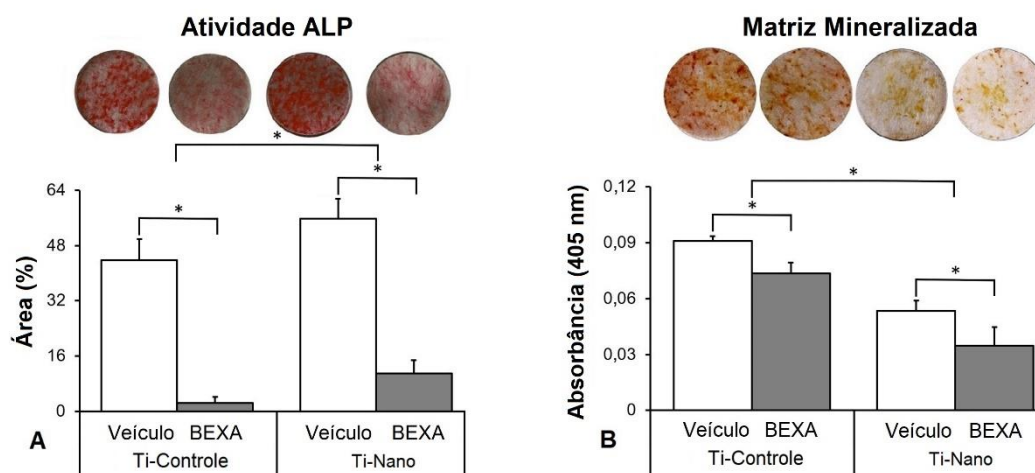


Figura 18. Atividade de ALP no dia 7 (A) e mineralização da matriz extracelular no dia 17 (B), em osteoblastos cultivados em Ti-Control e Ti-Nano com veículo ou BEXA 0,1 μ M. Dados de atividade de ALP (n=5) e mineralização da matriz extracelular (n=5) são apresentados como média \pm desvio padrão e * indica diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

A interação entre as superfícies de Ti e o tratamento com bexaroteno afetou a expressão gênica de *Hes1* ($p \leq 0,001$), *Hey1* ($p = 0,004$) e *Hey2* ($p = 0,003$, Figura 19). O bexaroteno regulou negativamente a expressão gênica de *Hes1* ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) e regulou positivamente *Hey1* ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) e *Hey2* ($p < 0,001$ e $p = 0,004$) em células cultivadas em Ti-Control e Ti-Nano. Na presença do veículo, a expressão gênica *Hey1* ($p = 0,740$) não foi afetada, enquanto *Hes1* ($p = 0,004$) e *Hey2* ($p = 0,002$) foi maior nas células cultivadas em Ti-Control do que em Ti-Nano. Na presença de bexaroteno, a expressão gênica de *Hes1* ($p < 0,001$), *Hey1* ($p < 0,001$) e *Hey2* ($p < 0,001$) foi menor em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Control (Figura 19A). A interação entre as superfícies de Ti e o tratamento com bexaroteno também afetou a expressão da proteína HES1 ($p = 0,001$). O bexaroteno diminuiu a expressão da proteína HES1 ($p < 0,001$ e $p < 0,001$) em células cultivadas em Ti-Control e Ti-Nano. Na presença do veículo, a expressão da proteína HES1 foi maior ($p = 0,021$), enquanto na presença de bexaroteno foi menor ($p = 0,005$) em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Control (Figura 19B).

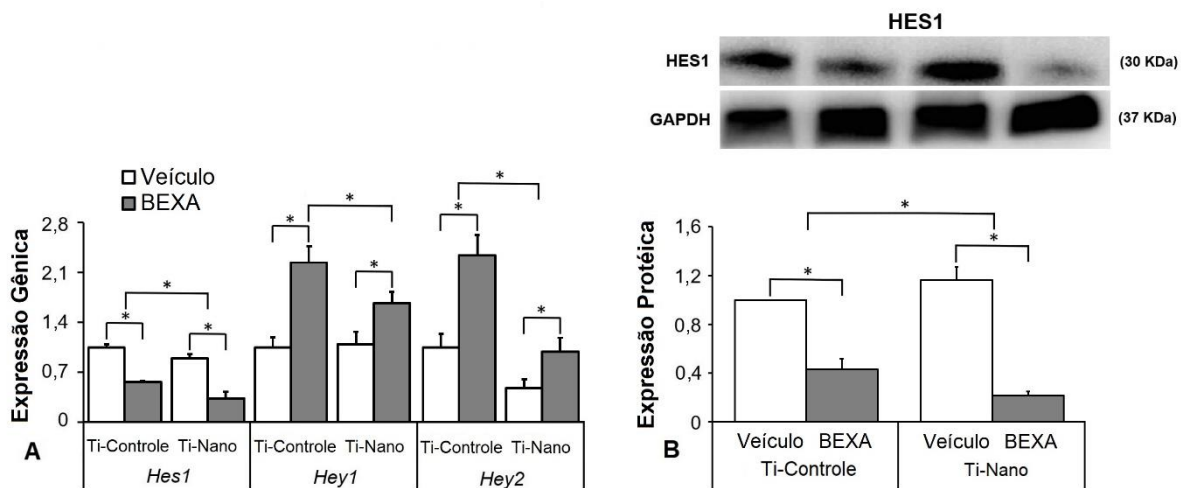


Figura 19. Expressão gênica Notch Hairy/enhancer-of-split-1 (Hes1) e fatores de transcrição relacionados a Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1 e 2 (Hey1 e Hey2) no dia 10 (A) e expressão da proteína HES1 no dia 10 (B), em osteoblastos cultivados em Ti-Control e Ti-Nano com veículo ou BEXA 0,1 μM. Dados de expressão gênica (n=4) e expressão proteica (n=3) são apresentados como média ± desvio padrão e * indica diferenças estatisticamente significantes (p≤0,05).

4.4. Efeito da combinação da modulação da sinalização Hedgehog e Notch na expressão gênica de marcadores ósseos em células cultivadas em Ti-Control e Ti-Nano

A interação entre as superfícies de Ti e o tratamento com a combinação de purmorfamina e DAPT afetou a expressão de *Runx2* (p≤0,001), *Alp* (p≤0,001) e *Opn* (p≤0,001, Figura 20). A combinação de purmorfamina e DAPT regulou positivamente a expressão gênica de *Runx2* (p<0,001 e p<0,001), *Alp* (p<0,001 e p<0,001) e *Opn* (p<0,001 e p<0,001) em células cultivadas tanto em Ti-Control e Ti-Nano. Na presença do veículo, a expressão gênica de *Runx2* (p=0,707), *Alp* (p=0,345) e *Opn* (p=0,969) não foi afetada pelas superfícies de Ti. Na presença da combinação de purmorfamina e DAPT, a expressão gênica de *Runx2* (p<0,001), *Alp* (p<0,001) e *Opn* (p<0,001) foi maior em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Control (Figura 20A). A interação entre as superfícies de Ti e o tratamento com a combinação de ciclopamina e bexaroteno afetou a expressão de *Runx2* (p≤0,001), *Alp* (p=0,010) e *Opn* (p≤0,001). A combinação de ciclopamina e bexaroteno regulou negativamente a expressão gênica de *Runx2* (p=0,001 e p<0,001), *Alp* (p=0,001 e p<0,001) e *Opn* (p=0,001 e p<0,001) em células cultivadas tanto em Ti-Control e Ti-Nano. Na presença do veículo, a expressão gênica de *Runx2* (p=0,248), *Alp* (p=0,416) e *Opn* (p=0,874) não foi afetada pelas superfícies de Ti. Na presença da combinação de

ciclopamina e bexaroteno, a expressão gênica de *Runx2* ($p < 0,001$), *Alp* ($p = 0,005$) e *Opn* ($p < 0,001$) foi menor nas células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle (Figura 20B).

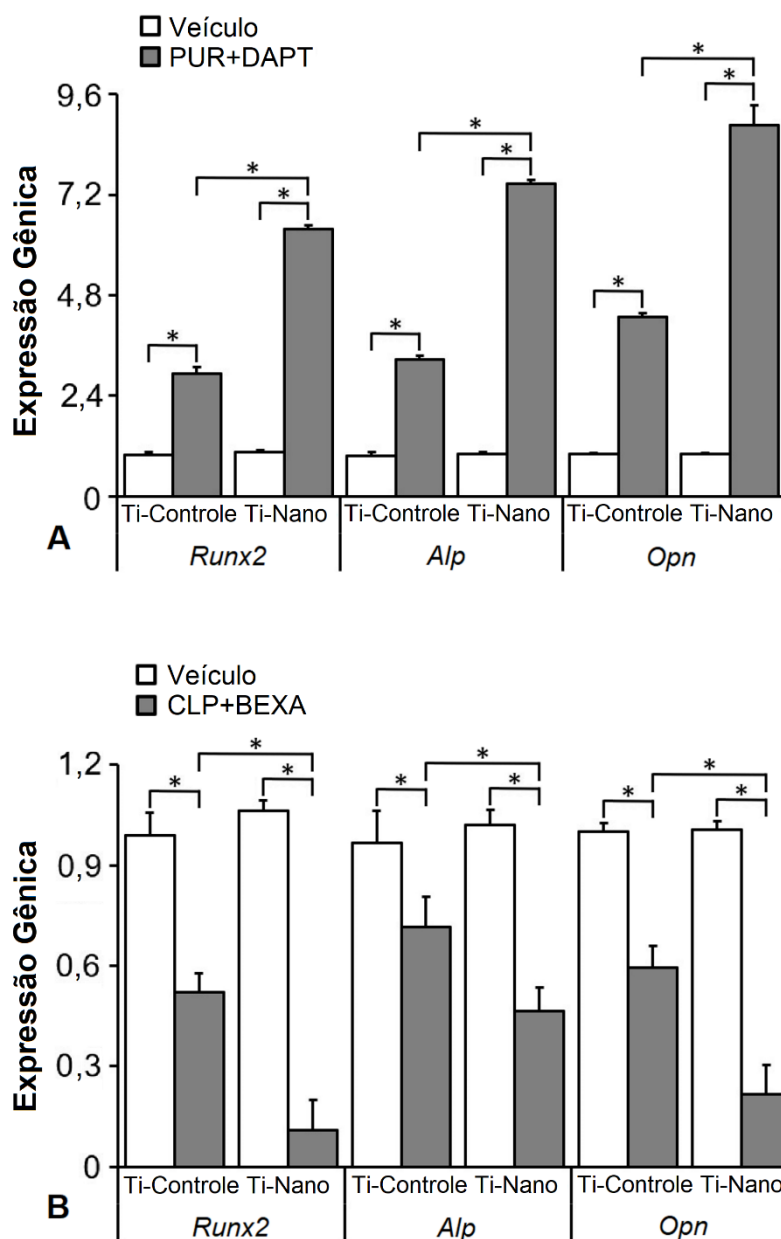


Figura 20. Expressão gênica do fator de transcrição 2 relacionado a runt 2 (*Runx2*), osteopontina (*Opn*) e atividade de fosfatase alcalina (*Alp*) no dia 10 em osteoblastos cultivados em Ti-Controle e Ti-Nano com veículo ou a combinação de purmorfamina 2 μM com DAPT 20 μM (PUR+DAPT, A), ou veículo ou a combinação de ciclopamina 10 nM com bexaroteno 0,1 μM (CLP+BEXA, B). Os dados ($n=4$) são apresentados como média \pm derivação padrão e * indica diferenças estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A modulação da sinalização celular envolvida na osteogênese impacta a interação entre osteoblastos e superfícies de Ti (Boyan et al., 2022; Bighetti-Trevisan et al., 2022; Zhao et al., 2022; Abuna et al., 2020; Lopes et al. al., 2020). Os resultados deste estudo mostraram que agonistas e antagonistas das vias de sinalização Hedgehog e Notch afetam a diferenciação dos osteoblastos de forma dose-dependente. O uso do agonista de Hedgehog, purmorfamina, ou do antagonista de Notch, DAPT, aumentou, enquanto o uso do antagonista de Hedgehog, ciclopamina, ou o agonista de Notch, bexaroteno, diminuiu a diferenciação de osteoblastos de células cultivadas em Ti-Control e Ti-Nano. Além disso, os resultados sugerem que a associação entre purmorfamina e DAPT tem efeito sinérgico na diferenciação osteoblástica de células cultivadas em ambas as superfícies de Ti.

Para selecionar as concentrações dos agonistas e antagonistas de Hedgehog e Notch, testamos três doses de cada, com base em dados da literatura, e avaliamos três parâmetros-chave de diferenciação de osteoblastos, expressão do gene *Opn*, atividade de ALP e mineralização da matriz extracelular (Chitranshi et al., 2019; Jing et al., 2010; Sinha et al., 2006; Wu et al., 2004). O agonista Hedgehog, purmorfamina, foi mais eficiente para induzir a diferenciação osteoblástica na concentração de 2 μM , o que está de acordo com outros estudos que mostram resultados semelhantes (Beloti et al., 2005a; Beloti et al., 2005b; van der Horst et al., 2003). O antagonista de Hedgehog, ciclopamina, inibiu a diferenciação de osteoblastos e, como a concentração de 1000 nM parece apresentar toxicidade especificamente baseada em seu efeito na expressão do gene *Opn* e atividade de ALP, selecionamos 10 nM por ser mais eficiente que 100 nM na inibição da diferenciação de osteoblastos (Yuan et al., 2020; Stanton et al., 2010; Chen et al., 2002). Concordando com estudos anteriores, o antagonista de Notch, DAPT, na concentração de 20 μM foi mais osteogênico (Dishowitz et al., 2012; Canalis et al., 2008; Androutsellis-Theotokis et al., 2006). O agonista de Notch, bexaroteno foi mais eficiente para reduzir a diferenciação osteoblástica na concentração de 0,1 μM , o que concorda com estudos anteriores (Ai et al., 2018; Kamp et al., 2018; Fantini et al., 2014).

O uso do agonista de Hedgehog, purmorfamina, para aumentar a diferenciação osteoblástica de células cultivadas em Ti já foi investigado (Lin et al.,

2017; Beloti et al., 2005b). Neste trabalho, mostramos que o efeito osteogênico de purmorfamina foi mais proeminente em Ti-Nano como evidenciado pelo aumento da expressão gênica de *Runx2*, *Opn* e *Alp*, bem como da expressão de proteína RUNX2 e atividade de ALP. Em consonância com nossos resultados, o antagonista de Hedgehog, ciclopamina, inibiu a diferenciação osteoblástica de forma mais pronunciada em células cultivadas em Ti-Nano em comparação com Ti-Controle como mostrado pela expressão gênica de *Runx2*, *Opn* e *Alp* e pela expressão da proteína RUNX2. Essa maior suscetibilidade ao agonista e antagonista Hedgehog das células cultivadas em Ti-Nano em termos de diferenciação osteoblástica pode estar relacionada ao fato de que a modulação da via de sinalização Hedgehog é mais intensa nas células cultivadas nessa superfície.

A expressão gênica dos receptores Hedgehog *Gli1*, *Gli2* e *Gli3* e a expressão da proteína GLI1 foram mais moduladas tanto por purmorfamina quanto por ciclopamina com exceção da expressão da proteína GLI1, com os esperados efeitos opostos do agonista e antagonista. Juntos, esses resultados sugerem que a via de sinalização Hedgehog é mais relevante para o potencial osteogênico do Ti-Nano do que do Ti-Controle e que essa nanotopografia pode regular esse mecanismo celular por si só. Corroborando com nossos resultados, o Ti com topografia micro/nanotexturizada com ou sem nanotubos de TiO₂ aumenta a diferenciação osteoblástica da linhagem celular MG63 ativando a sinalização Hedgehog-Gli1, que é inibida pela ciclopamina (Xie et al., 2021).

O envolvimento da via de sinalização Notch na interação osteoblasto-Ti é pouco explorado, apesar de sua conhecida participação na osteogênese (Delgado-Calle et al., 2022; Zanotti et al., 2008; Zamurovic et al., 2004). Observou-se que a hidrofiliabilidade da superfície do Ti favorece a formação óssea por atuar em diversas vias de sinalização envolvidas na proliferação e diferenciação de precursores de osteoblastos, incluindo a sinalização Notch (Calciolari et al., 2018). Além disso, a inibição da sinalização Notch aumenta a diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais cultivadas em substratos de Ti (Wang et al., 2017). Sendo assim, demonstramos que o antagonista de Notch, DAPT, aumentou a diferenciação osteoblástica de células cultivadas em Ti-Controle e Ti-Nano, com efeitos mais pronunciados em Ti-Nano, conforme observado pela expressão gênica de *Opn* e *Alp*, pela expressão da proteína RUNX2 e pela atividade da ALP. Concordando com esses dados, o agonista de Notch, bexaroteno, inibiu a diferenciação osteoblástica de forma

mais intensa em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle, reduzindo os mesmos parâmetros, bem como a mineralização da matriz extracelular. Quanto à sinalização de Hedgehog, a maior responsividade ao antagonista e agonista Notch das células cultivadas em Ti-Nano quanto à diferenciação osteoblástica pode ser atribuída à maior intensidade da regulação da sinalização Notch nas células cultivadas nesta superfície, especificamente através da regulação do receptor Notch Hes1.

A expressão gênica e proteica de Hes1 foi mais modulada por DAPT e bexaroteno em células cultivadas em Ti-Nano do que em Ti-Controle, enquanto a expressão gênica de *Hey1* e *Hey2* não foi afetada pela topografia da superfície. Em conjunto, esses dados sugerem que a via de sinalização Notch é mais importante para o potencial osteogênico do Ti-Nano em comparação com o Ti-Controle e que esta nanotopografia pode regular esse sinal. Apesar da participação da sinalização Notch na diferenciação osteoblástica de células cultivadas em superfícies de Ti já ter sido descrita, até onde sabemos, esta é a primeira evidência de que os efeitos distintos provocados por diferentes topografias de superfície de Ti na diferenciação osteoblástica envolvem a regulação desta via de sinalização (Calciolari et al., 2018; Wang et al., 2017).

Como nossos resultados mostraram efeitos mais pronunciados da modulação das vias de sinalização Hedgehog e Notch em osteoblastos cultivados em Ti-Nano, iniciamos a investigação sobre o possível efeito sinérgico da combinação da modulação de ambas vias. Apesar do efeito dessa combinação na diferenciação osteoblástica não ter sido avaliado anteriormente, foi demonstrado que a regulação concomitante das vias de sinalização Hedgehog e Notch potencializa os efeitos antileucêmicos da modulação Notch isoladamente (Okuhashi et al., 2011). Neste trabalho, a associação do agonista de Hedgehog, purmorfamina, com o antagonista de Notch, DAPT, aumentou a suprarregulação da expressão gênica de *Runx2*, *Opn* e *Alp* em comparação com o uso de purmorfamina ou DAPT sozinhos em osteoblastos cultivados em ambas as superfícies de Ti, com efeitos mais intensos sobre Ti-Nano do que no Ti-Controle.

Embora a combinação do antagonista de Hedgehog, ciclopamina, com o agonista de Notch, bexaroteno, tenha regulado negativamente essas expressões gênicas, o efeito sinérgico não foi tão evidente quanto observamos quando a purmorfamina e o DAPT foram combinados. Assim, apesar de mais estudos serem necessários para confirmar o sinergismo, é possível sugerir que a ativação de

Hedgehog juntamente com a inibição da sinalização Notch pode favorecer a diferenciação osteoblástica de células cultivadas em Ti, principalmente com superfícies nanoestruturadas.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que as vias de sinalização Hedgehog e Notch estão envolvidas na interação entre osteoblastos e superfícies de Ti, com efeitos mais relevantes na diferenciação osteoblástica de células cultivadas na superfície nanoestruturada, o que pode regular esses sinais por si só. Também demonstramos que a ativação de Hedgehog concomitantemente à inibição de Notch pode ter efeito sinérgico na diferenciação de osteoblastos, especialmente em células cultivadas em nanotopografia. Esses mecanismos celulares podem explicar, pelo menos em parte, o maior potencial osteogênico dessa superfície nanoestruturada de Ti, gerando novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias de regulação do processo de osseointegração.

7. BIBLIOGRAFIA

Abuna RPF, Oliveira FS, Adolpho LF, Fernandes RR, Rosa AL, Beloti MM. Frizzled 6 disruption suppresses osteoblast differentiation induced by nano topography through the canonical Wnt signaling pathway. **J Cell Physiol**. 2020 Nov;235(11):8293-8303. doi: 10.1002/jcp.29674.

Abuna RPF, Oliveira FS, Ramos JIR, Lopes HB, Freitas GP, Souza ATP, Beloti MM, Rosa AL. Selection of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction studies in rat osteoblasts. **J Cell Physiol**. 2018 Jan;234(1):749-756. doi: 10.1002/jcp.26886.

Adolpho LF, Lopes HB, Freitas GP, Weffort D, Campos Totoli GG, Loyola Barbosa AC, Freire Assis RI, Silverio Ruiz KG, Andia DC, Rosa AL, Beloti MM. Human periodontal ligament stem cells with distinct osteogenic potential induce bone formation in rat calvaria defects. **Regen Med**. 2022 Jun;17(6):341-353. doi: 10.2217/rme-2021-0178.

Ai X, Mao F, Shen S, Shentu Y, Wang J, Lu S. Bexarotene inhibits the viability of non-small cell lung cancer cells via slc10a2/PPAR γ /PTEN/mTOR signaling pathway. **BMC Cancer**. 2018 Apr 11;18(1):407. doi: 10.1186/s12885-018-4224-x.

Androutsellis-Theotokis A, Leker RR, Soldner F, Hoepfner DJ, Ravin R, Poser SW, Rueger MA, Bae SK, Kittappa R, McKay RD. Notch signaling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. **Nature**. 2006 Aug 17;442(7104):823-6. doi: 10.1038/nature04940.

Beloti MM, Bellesini LS, Rosa AL. Purmorphamine enhances osteogenic activity of human osteoblasts derived from bone marrow mesenchymal cells. **Cell Biol Int**. 2005a Jul;29(7):537-41. doi: 10.1016/j.cellbi.2005.02.007.

Beloti MM, Bellesini LS, Rosa AL. The effect of purmorphamine on osteoblast phenotype expression of human bone marrow mesenchymal cells cultured on titanium. **Biomaterials**. 2005b Jul;26(20):4245-8. doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.039.

Bighetti-Trevisan RL, Almeida LO, Castro-Raucci LMS, Gordon JAR, Tye CE, Stein GS, Lian JB, Stein JL, Rosa AL, Beloti MM. Titanium with nanotopography attenuates the osteoclast-induced disruption of osteoblast differentiation by regulating histone methylation. **Biomaterials Advances**. 2022;134,112548. doi: 10.1016/j.msec.2021.112548.

Boyan BD, Berger MB, Nelson FR, Donahue HJ, Schwartz Z. The Biological Basis for Surface-dependent Regulation of Osteogenesis and Implant Osseointegration. **J Am Acad Orthop Surg**. 2022 Jul 1;30(13):e894-e898. Epub 2022 Apr 5. doi: 10.5435/JAAOS-D-21-00523.

Calciolari E, Hamlet S, Ivanovski S, Donos N. Pro-osteogenic properties of hydrophilic and hydrophobic titanium surfaces: Crosstalk between signaling

- pathways in in vivo models. **J Periodontal Res.** 2018 Aug;53(4):598-609. doi: 10.1111/jre.12550.
- Canalis E. Notch signaling in osteoblasts. **Sci Signal.** 2008 Apr 29;1(17):pe17. doi: 10.1126/stke.117pe17.
- Castro-Raucci LMS, Francischini MS, Teixeira LN, Ferraz EP, Lopes HB, de Oliveira PT, Hassan MQ, Losa AL, Beloti MM. Titanium With Nanotopography Induces Osteoblast Differentiation by Regulating Endogenous Bone Morphogenetic Protein Expression and Signaling Pathway. **J Cell Biochem.** 2016 Jul;117(7):1718-26. doi: 10.1002/jcb.25469.
- Chen JK, Taipale J, Cooper MK, Beachy PA. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. **Genes Dev.** 2002 Nov 1;16(21):2743-8. doi: 10.1101/gad.1025302.
- Chen Q, Liu W, Sinha KM, Yasuda H, de Crombrughe B. Identification and characterization of microRNAs controlled by the osteoblast-specific transcription factor Osterix. **PLoS One.** 2013;8(3):e58104. doi: 10.1371/journal.pone.0058104.
- Chitranshi N, Dheer Y, Kumar S, Graham SL, Gupta V. Molecular docking, dynamics, and pharmacology studies on bexarotene as an agonist of ligand-activated transcription factors, retinoid X receptors. **J Cell Biochem.** 2019 Feb 11. doi: 10.1002/jcb.28455.
- Costa DG, Ferraz EP, Abuna RPF, de Oliveira PT, Morra M, Beloti MM, Rosa AL. The effect of collagen coating on titanium with nanotopography on in vitro osteogenesis. **J Biomed Mater Res A.** 2017 Oct;105(10):2783-2788. doi: 10.1002/jbm.a.36140.
- de Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. **Biomaterials.** 2004 Feb;25(3):403-13. doi: 10.1016/s0142-9612(03)00539-8.
- 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 Mar 1;80(3):554-64. doi: 10.1002/jbm.a.30955.
- de Oliveira PT, Zalzal SF, Irie K, Nanci A. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. **J Histochem Cytochem.** 2003 May;51(5):633-41. doi: 10.1177/002215540305100509.
- Delgado-Calle J, McAndrews K, Wu G, Orr AL, Ferrari A, Tu X, Srinivasan V, Roodman GD, Ebetino FH, Boeckman RK Jr, Bellido T. The Notch pathway regulates the bone gain induced by PTH anabolic signaling. **FASEB J.** 2022 Mar;36(3):e22196. doi: 10.1096/fj.202101807R.
- Dishowitz MI, Terkhorn SP, Bostic SA, Hankenson KD. Notch signaling components are upregulated during both endochondral and intramembranous bone regeneration. **J Orthop Res.** 2012 Feb;30(2):296-303. doi: 10.1002/jor.21518.

Evangelista M, Tian H, de Sauvage FJ. The hedgehog signaling pathway in cancer. **Clin Cancer Res**. 2006 Oct 15;12(20 Pt 1):5924-8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1736.

Fantini J, Di Scala C, Yahi N, Troadec JD, Sadelli K, Chahinian H, Garmy N. Bexarotene blocks calcium-permeable ion channels formed by neurotoxic Alzheimer's β -amyloid peptides. **ACS Chem Neurosci**. 2014 Mar 19;5(3):216-24. doi: 10.1021/cn400183w.

Fischer A, Gessler M. Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. **Nucleic Acids Res**. 2007;35(14):4583-96. doi: 10.1093/nar/gkm477.

Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, Grossfeld PD, Srivastava D. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. **Nature**. 2005 Sep 8;437(7056):270-4. doi: 10.1038/nature03940.

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 Jun 1;329(1):77-84. doi: 10.1016/j.ab.2004.02.002.

Heretsch P, Tzagkaroulaki L, Giannis A. Cyclopamine and hedgehog signaling: chemistry, biology, medical perspectives. **Angew Chem Int Ed Engl**. 2010a May 3;49(20):3418-27. doi: 10.1002/anie.200906967.

Heretsch P, Tzagkaroulaki L, Giannis A. Modulators of the hedgehog signaling pathway. **Bioorg Med Chem**. 2010b Sep 15;18(18):6613-24. doi: 10.1016/j.bmc.2010.07.038.

High F, Epstein JA. Signaling pathways regulating cardiac neural crest migration and differentiation. **Novartis Found Symp**. 2007;283:152-61; discussion 161-4, 238-41. doi: 10.1002/9780470319413.ch12.

Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. **Genes Dev**. 2001 Dec 1;15(23):3059-87. doi: 10.1101/gad.938601.

Jing W, Xiong Z, Cai X, Huang Y, Li X, Yang X, Liu L, Tang W, Lin Y, Tian W. Effects of gamma-secretase inhibition on the proliferation and vitamin D(3) induced osteogenesis in adipose derived stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**. 2010 Feb 12;392(3):442-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.01.043.

Kamp F, Scheidt HA, Winkler E, Basset G, Heinel H, Hutchison JM, LaPointe LM, Sanders CR, Steiner H, Huster D. Bexarotene Binds to the Amyloid Precursor Protein Transmembrane Domain, Alters Its α -Helical Conformation, and Inhibits γ -Secretase Nonselectively in Liposomes. **ACS Chem Neurosci**. 2018 Jul 18;9(7):1702-1713. doi: 10.1021/acscchemneuro.8b00068.

Kato RB, Roy B, De Oliveira FS, Ferraz EP, De Oliveira PT, Kemper AG, Hassan MQ, Rosa AL, Beloti MM. Nanotopography directs mesenchymal stem cells to

osteoblast lineage through regulation of microRNA-SMAD-BMP-2 circuit. **J Cell Physiol.** 2014 Nov;229(11):1690-6. doi: 10.1002/jcp.24614.

Katoh Y, Katoh M. Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. **Curr Mol Med.** 2009 Sep;9(7):873-86. doi: 10.2174/156652409789105570.

Levi B, James AW, Nelson ER, Li S, Peng M, Commons GW, Lee M, Wu B, Longaker MT. Human adipose-derived stromal cells stimulate autogenous skeletal repair via paracrine Hedgehog signaling with calvarial osteoblasts. **Stem Cells Dev.** 2011 Feb;20(2):243-57. doi: 10.1089/scd.2010.0250.

Lin Y, Huang Y, He J, Chen F, He Y, Zhang W. Role of Hedgehog-Gli1 signaling in the enhanced proliferation and differentiation of MG63 cells enabled by hierarchical micro-/nanotextured topography. **Int J Nanomedicine.** 2017 Apr 20;12:3267-3280. doi: 10.2147/IJN.S135045.

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 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Lopes HB, Freitas GP, Elias CN, Tye C, Stein JL, Stein GS, Lian JB, Rosa AL, Beloti MM. Participation of integrin β 3 in osteoblast differentiation induced by titanium with nano or microtopography. **J Biomed Mater Res A.** 2019 Jun;107(6):1303-1313. doi: 10.1002/jbm.a.36643.

Lopes, HB, Souza, ATP, Freitas, GP, Elias, CN, Rosa, AL, Beloti, MM. Effect of focal adhesion kinase inhibition on osteoblastic cells grown on titanium with different topographies. **Journal of Applied Oral Science.** 2020;28(9). doi: 10.1590/1678-7757-2019-0156.

Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J Jr, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). **J Biomed Mater Res.** 1995 Mar;29(3):389-401. doi: 10.1002/jbm.820290314.

McLarren KW, Lo R, Grbavec D, Thirunavukkarasu K, Karsenty G, Stifani S. The mammalian basic helix loop helix protein HES-1 binds to and modulates the transactivating function of the runt-related factor Cbfa1. **J Biol Chem.** 2000 Jan 7;275(1):530-8. doi: 10.1074/jbc.275.1.530.

Mendonça G, Mendonça DBS, Simões LGP, Araújo AL, Golin AL, Duarte WR, Cooper LF, Aragão FJL. Efeito de superfícies de implantes nano-estruturadas na expressão de genes de osteoblastos e no contato osso-implante in vivo. **Rev Odontol Bras Central.** 2010;19(50):196-204. doi: 10.36065/robrac.v19i50.465.

Okuhashi Y, Itoh M, Nara N, Tohda S. Effects of combination of notch inhibitor plus hedgehog inhibitor or Wnt inhibitor on growth of leukemia cells. **Anticancer Res.** 2011 Mar;31(3):893-6. PMID: 21498710.

- Oliveira FS, Bellesini LS, Defino HL, da Silva Herrero CF, Beloti MM, Rosa AL. Hedgehog signaling and osteoblast gene expression are regulated by purmorphamine in human mesenchymal stem cells. **J Cell Biochem.** 2012 Jan;113(1):204-8. doi: 10.1002/jcb.23345.
- Panepucci RA, Oliveira LHB, Zanette DL, Carrara RCV, Araujo AG, Orellana MD, De Palma PVB, Menezes CCBO, Covas DT, Zago MA. Increased levels of NOTCH1, NF-kB, and other interconnected transcription factors characterize primitive sets of hematopoietic stem cells. **Stem Cells Dev.** 2010; 19(3):321-332. doi: 10.1089/scd.2008.0397.
- Peukert S, Miller-Moslin Karen. Small-Molecule Inhibitors of the Hedgehog Signaling Pathway as Cancer Therapeutics. **ChemMedChem.** 2010; 5:500-512. doi: 10.1002/cmdc.201000011.
- Plaisant M, Giorgetti-Peraldi S, Gabrielson M, Loubat A, Dani C, Peraldi P. Inhibition of hedgehog signaling decreases proliferation and clonogenicity of human mesenchymal stem cells. **PLoS One.** 2011 Feb 3;6(2):e16798. doi: 10.1371/journal.pone.0016798.
- Quint E, Smith A, Avaron F, Laforest L, Miles J, Gaffield W, Akimenko MA. Bone patterning is altered in the regenerating zebrafish caudal fin after ectopic expression of sonic hedgehog and bmp2b or exposure to cyclopamine. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2002 Jun 25;99(13):8713-8. doi: 10.1073/pnas.122571799.
- Radtke F, Schweisguth F, Pear W. The Notch 'gospel'. **EMBO Rep.** 2005 Dec;6(12):1120-5. doi: 10.1038/sj.embor.7400585.
- Roberge L, Origa-Alves AC, Rebelatto CK, Dallagiovanna B, Shiguno P. Inhibition of Hedgehog signaling pathway affects the expression of miR-20a and miR-3. **J Biotech Biodivers.** 2013;4(4):322-332.
- Rosa AL, Kato RB, Castro Raucci LM, Teixeira LN, de Oliveira FS, Bellesini LS, de Oliveira PT, Hassan MQ, Beloti MM. Nanotopography drives stem cell fate toward osteoblast differentiation through $\alpha1\beta1$ integrin signaling pathway. **J Cell Biochem.** 2014 Mar;115(3):540-8. doi: 10.1002/jcb.24688.
- Shen Q, Christakos S. The vitamin D receptor, Runx2, and the Notch signaling pathway cooperate in the transcriptional regulation of osteopontin. **J Biol Chem.** 2005 Dec 9;280(49):40589-98. doi: 10.1074/jbc.M504166200.
- Silverwood RK, Fairhurst PG, Sjöström T, Welsh F, Sun Y, Li G, Yu B, Young PS, Su B, Meek RM, Dalby MJ, Tsimbouri PM. Analysis of Osteoclastogenesis/Osteoblastogenesis on Nanotopographical Titania Surfaces. **Adv Health Mater.** 2016 Apr 20;5(8):947-55. doi: 10.1002/adhm.201500664.
- Sinha S, Chen JK. Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothed. **Nat Chem Biol.** 2006 Jan;2(1):29-30. doi: 10.1038/nchembio753.

Souza ATP, Lopes HB, Oliveira FS, Weffort D, Freitas GP, Adolpho LF, Fernandes RR, Rosa AL, Beloti MM. The extracellular matrix protein Agrin is expressed by osteoblasts and contributes to their differentiation. **Cell Tissue Res.** 2021 Nov;386(2):335-347. doi: 10.1007/s00441-021-03494-9.

Stanton BZ, Peng LF. Small-molecule modulators of the Sonic Hedgehog signaling pathway. **Mol Biosyst.** 2010 Jan;6(1):44-54. doi: 10.1039/b910196a.

Suh JM, Gao X, McKay J, McKay R, Salo Z, Graff JM. Hedgehog signaling plays a conserved role in inhibiting fat formation. **Cell Metab.** 2006 Jan;3(1):25-34. doi: 10.1016/j.cmet.2005.11.012.

van der Horst G, Farih-Sips H, Löwik CW, Karperien M. Hedgehog stimulates only osteoblastic differentiation of undifferentiated KS483 cells. **Bone.** 2003 Dec;33(6):899-910. doi: 10.1016/j.bone.2003.07.004.

Wang H, Jiang Z, Zhang J, Xie Z, Wang Y, Yang G. Enhanced osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells on titanium substrates by inhibiting Notch3. **Arch Oral Biol.** 2017 Aug;80:34-40. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.03.012.

Wang Q, Huang C, Zeng F, Xue M, Zhang X. Activation of the Hh pathway in periosteum-derived mesenchymal stem cells induces bone formation in vivo: implication for postnatal bone repair. **Am J Pathol.** 2010 Dec;177(6):3100-11. doi: 10.2353/ajpath.2010.100060.

Wu X, Ding S, Ding Q, Gray NS, Schultz PG. A small molecule with osteogenesis-inducing activity in multipotent mesenchymal progenitor cells. **J Am Chem Soc.** 2002 Dec 11;124(49):14520-1. doi: 10.1021/ja0283908.

Wu X, Walker J, Zhang J, Ding S, Schultz PG. Purmorphamine induces osteogenesis by activation of the hedgehog signaling pathway. **Chem Biol.** 2004 Sep;11(9):1229-38. doi: 10.1016/j.chembiol.2004.06.010.

Xie Y, Chen X, Zheng X, Li L, Li J, Xu Y, He J, Lin Y. Beta1-integrin/Hedgehog-Gli1 signaling pathway fuels the diameter-dependent osteoblast differentiation on different TiO₂ nanotubes: The optimal-diameter nanotubes for osteoblast differentiation. **Int J Biochem Cell Biol.** 2021 Aug;137:106026. doi: 10.1016/j.biocel.2021.106026.

Yan X, Yang Z, Chen Y, Li N, Wang L, Dou G, Liu Y, Duan J, Feng L, Deng S, Han H, Zhang P. Endothelial cells-targeted soluble human Delta-like 4 suppresses both physiological and pathological ocular angiogenesis. **Sci China Life Sci.** 2015 May;58(5):425-31. doi: 10.1007/s11427-015-4834-3.

Yang J, Andre P, Ye L, Yang YZ. The Hedgehog signaling pathway in bone formation. **Int J Oral Sci.** 2015;7,73–79. doi: 10.1038/ijos.2015.14.

Yuan YF, Zhu WX, Liu T, He JQ, Zhou Q, Zhou X, Zhang X, Yang J. Cyclopamine functions as a suppressor of benign prostatic hyperplasia by inhibiting epithelial and

stromal cell proliferation via suppression of the Hedgehog signaling pathway. **Int J Mol Med**. 2020 Jul;46(1):311-319. doi: 10.3892/ijmm.2020.4569.

Zamurovic N, Cappellen D, Rohner D, Susa M. Coordinated activation of notch, Wnt, and transforming growth factor-beta signaling pathways in bone morphogenic protein 2-induced osteogenesis. Notch target gene Hey1 inhibits mineralization and Runx2 transcriptional activity. **J Biol Chem**. 2004 Sep 3;279(36):37704-15. doi: 10.1074/jbc.M403813200.

Zanotti S, Smerdel-Ramoya A, Stadmeier L, Durant D, Radtke F, Canalis E. Notch inhibits osteoblast differentiation and causes osteopenia. **Endocrinology**. 2008 Aug;149(8):3890-9. doi: 10.1210/en.2008-0140.

Zhao Y, Bai L, Zhang Y, Yao R, Sun Y, Hang R, Chen X, Wang H, Yao X, Xiao Y, Hang R. Type I collagen decorated nanoporous network on titanium implant surface promotes osseointegration through mediating immunomodulation, angiogenesis, and osteogenesis. **Biomaterials**. 2022 Sep;288:121684. doi: 10.1016/j.biomaterials.2022.121684.