

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

**INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA VIA WNT NO REPARO ÓSSEO EM
CAMUNDONGOS E A INFLUÊNCIA DA DIABETES MELLITUS TIPO I NO REPARO E
REMODELAÇÃO ÓSSEA.**

CAIO DE SANTIAGO DUTRA

FORTALEZA
2021

CAIO DE SANTIAGO DUTRA

**INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA VIA WNT NO REPARO ÓSSEO EM
CAMUNDONGOS E A INFLUÊNCIA DA DIABETES TIPO I NO REPARO E
REMODELAÇÃO ÓSSEA.**

Tese de Doutorado apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Morfofuncionais pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Morfofuncionais da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará.

Área de Concentração: Morfofisiologia Óssea e articular.

Orientadora: Profa. Dra. Renata Ferreira
Carvalho Leitão

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D974i Dutra, Caio de Santiago.

Investigação da participação da via Wnt no reparo ósseo em camundongose a influência da diabetes mellitus tipo i no reparo e remodelação óssea. / Caio de Santiago Dutra. – 2021. 63 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2021.

Orientação: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão.

1. Cicatrização. 2. Osso e Ossos. 3. Via de sinalização Wnt. 4. Diabetes mellitus tipo 1. 5. Crânio. I. Título.

CDD 611

INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA VIA WNT NO REPARO ÓSSEO EM
CAMUNDONGOS E A INFLUÊNCIA DA DIABETES TIPO I NO REPARO E
REMODELAÇÃO ÓSSEA.

Tese de Doutorado apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Morfofuncionais pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Morfofuncionais da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará. Área de concentração: Morfofisiologia Óssea e articular.

Aprovada em __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Raimundo Fernandes de Araújo Júnior
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Profa. Dra. Fátima Regina Nunes de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFPI)

Profa. Dra. Delane Viana Gondim
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, Marco Aurélio e Velma;
À minha esposa, Paula;
E às minhas filhas, Laura e Giovanna

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal do Ceará** por intermédio do seu Magnífico Reitor Prof Dr. Cândido Albuquerque; à **Faculdade de Medicina (FAMED)** por meio do seu diretor Prof. Dr. João Macedo; aos professores do **Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais** na pessoa da sua coordenadora Profa. Dra. Antoniella Gomes Duarte, pela oportunidade de integrar essa equipe que tanto orgulho e por todo ensinamento e empenho prestados.

À **Universidade Técnica de Dresden**, na figura dos Professores Martina Rauner e Lorenz Hofbauer, pela hospitalidade e acolhimento a mim destinados durante o período em que estive em Dresden na Alemanha e pela colaboração científica firmada.

A técnica administrativa do **Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais**, Laísa Albuquerque pela eficiência no serviço prestado e pela disponibilidade.

A **Prefeitura Municipal de Fortaleza e Governo do Estado do Ceará** pelo apoio a concretização deste trabalho e afastamento integral das minhas atividades como cirurgião-dentista para realizar atividade de estágio doutoral na Alemanha.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Desafio tão grande quanto escrever a Tese, foi utilizar apenas 2 páginas para agradecer as pessoas que fizeram parte de desta minha trajetória de 18 anos de formação acadêmica e profissional. O sentimento que predomina é o de Gratidão pois a realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração de muitas pessoas.

Agradeço primeiramente a **DEUS** por poder citar essas pessoas especiais neste momento tão importante. Obrigado por colocá-las tão caprichosamente em minha vida.

Agradeço a meus pais, que sempre primaram pela minha Educação. Obrigado Sr. **Marco Aurélio Dutra** e Sra. **Velma Dutra** por, além de me oferecer a oportunidade de estudar, sempre estarem presentes e com um amor e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Sou muito feliz e grato por isso. Obrigado Sra. **Velma Dutra** por seus ensinamentos e incentivo cabal para que eu concluísse esse trabalho.

Aos meus irmãos, **Felipe** que sempre foi extremamente prestativo e disponibilizou tecnologias ao meu alcance e **Virna** pelo pleno apoio e suporte durante minha estadia na Europa.

À minha sogra Sra **Valéria Goes** por toda assistência, cooperação e paciência. Obrigado por tudo que ensinamentos sobre disciplina e perseverança. Ao meu sogro Sr. **Geraldo Pinheiro** por colocar a música e alegria em nossos corações.

À minha orientadora Professora **Renata Leitão**, pela confiança que permitiu que eu desenvolvesse esse trabalho e que sempre me induziu a pensar criticamente. Desde o início do Doutorado me apoiou e me incentivou para que eu pudesse realizar meu doutorado sanduíche fora do País me proporcionando a oportunidade de realizar um trabalho a nível internacional e além de permitir o convívio e troca de experiências e ensinamentos com diversos pesquisadores estrangeiros.

Agradeço a minha admirável Co-orientadora Professora **Martina Rauner** que me acolheu, me incentivou e me ajudou muito e integralmente durante o período em que estive na Alemanha. Uma pessoa sensacional tanto no campo pessoal quanto

acadêmico. Obrigado pela paciência em ensinar e por tudo que aprendi dentro e fora do laboratório.

Ao meu chefe do Laboratório **Lorenz Houfbauer**, por todo apoio e confiança. À sua eficiente secretária e amiga **Thereza Reich**, alguém que fez de tudo para que pudéssemos solucionar nossos problemas durante o período que passamos em Dresden. Obrigado por todo aprendizado sobre a cultura alemã.

Aos meus colegas de laboratório: **Giulia Furesi**, **Juliane Colditz**, **Stefania**, **Juliane Salbach**, **Tina** e **Sylvi Thiele** por toda a ajuda, todas as risadas, todos os ensinamentos e trocas de experiências dentro e fora do BONE LAB.

Finalmente, meu agradecimento mais profundo só poderia ser dedicado a uma pessoa: minha Esposa. A pessoa mais fantástica da minha vida que permitiu a realização de um sonho estudar em uma Universidade fora do País. Professora **Paula**, obrigado por proporcionar uma experiência única durante o período que passamos na Alemanha. Aprendi tanto que não caberia em algumas folhas para descrever. Uma Professora sensacional, o tempo todo do meu lado, incondicionalmente nos momentos mais difíceis, sempre me fazendo acreditar que chegaria ao final desta difícil, porém gratificante etapa. Uma pessoa que me ensinou e me ensina a ser uma pessoa melhor todos os dias. Durante o período mágico que passamos juntos na Alemanha tivemos a feliz oportunidade de nos engrandecermos como pesquisadores, mas principalmente nos fortalecemos como Família. Este período consolidou ainda mais nosso relacionamento e será sempre lembrado como um momento inigualável em nossas vidas. Sou grato por cada gesto carinhoso, cada sorriso, com nossas filhas **Laura** e **Giovanna** pelo o resto da minha vida. Obrigado Paula, meu AMOR.

“Com as perdas, só há um jeito: perdê-las.
Com os ganhos, o proveito de saborear cada
um como uma fruta boa da estação” (Lya Luft)

Resumo

O tecido ósseo é um tecido dinâmico capaz de reparar espontaneamente após o estabelecimento de uma lesão ou defeito, devido à ação coordenada entre matriz e células ósseas, envolvendo a ativação de diversas vias de sinalização. Alguns fatores, como a diabetes, interferem nessa resposta biológica, o que resulta em um impacto negativo sobre o reparo e remodelação óssea. No entanto, os mecanismos envolvidos ainda não estão esclarecidos. O presente estudo tem como objetivo investigar a participação da via Wnt/ β -catenina no reparo ósseo em animais normais e diabéticos e estudar os efeitos da diabetes no processo de remodelação óssea. A primeira etapa do estudo objetivou avaliar o papel da via Wnt no reparo ósseo através da inibição da expressão de Dkk-1, uma proteína reguladora da via. Para isso foram utilizados camundongos C57BL/6 submetidos a dois tipos de deleção de Dkk-1: deleção global (Dkk-1^{fl/fl};Rosa26ERT2:Cre) ou deleção específica em osteócitos (Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre). Animais sem deleção foram usados como controles (Cre-negativos). Todos os animais foram submetidos ao defeito subcrítico de calvária de 1,8 mm de diâmetro. Os animais foram acompanhados por 4 semanas após o procedimento cirúrgico e então eutanasiados. As calvárias foram removidas para as análises microtomográfica, histológica e histométrica e para investigação da expressão de genes envolvidos com o metabolismo ósseo (Dkk-1; Runx2; OCN; OPG e RANKL). Amostras de sangue foram coletadas pouco antes da eutanásia para determinação dos níveis séricos de P1NP e CTx, marcadores bioquímicos da remodelação óssea. Observou-se um aumento de 33% e 45% de osso neoformado nos grupos Dkk-1^{fl/fl};Rosa26ERT2:Cre e Dkk-1^{fl/fl};Dmp1, respectivamente, quando comparados aos respectivos controles Cre-. Entretanto, apenas na linhagem Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre+ observou-se aumento de P1NP, marcador de formação óssea, e redução de CTx, marcador de reabsorção óssea. A deleção de Dkk-1 derivado de osteócitos aumentou significativamente a quantidade de superfície óssea mineralizada, as taxas de aposição mineral e de formação óssea, bem como o número de osteoblastos. Em relação à expressão gênica, na linhagem Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre+ houve aumento de Runx2, OCN e OPG. Esses resultados sugerem que a via Wnt participa do processo de reparo ósseo, e o uso de animais com deleção específica de Dkk-1 derivado de osteócitos é uma ferramenta potencial de pesquisa para o estudo do envolvimento da via Wnt no metabolismo ósseo normal e

em várias condições patológicas associadas. Na segunda etapa do presente trabalho, camundongos C57BL/6 nocaute para Dkk-1 específica em osteócitos (Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre) foram submetidos ao modelo de diabetes tipo 1 induzida por 5 injeções consecutivas de estreptozotocina (STZ) (40 mg/kg – i.p) objetivando avaliar o impacto da diabetes tipo 1 (T1DM) no processo de reparo e remodelação óssea. Os descendentes respectivos Cre-negativos foram usados como controles. Doze semanas depois, os animais foram submetidos ao modelo de defeito de calvária conforme descrito anteriormente. Após a eutanásia, 4 semanas após o procedimento cirúrgico, a calvária e o fêmur de cada animal foram coletados para as análises microtomográfica, histológica e histométrica. Amostras de sangue foram coletadas para determinação sérica de proteínas envolvidas com o metabolismo ósseo P1NP, Dkk-1, SOST, CTx, TRAP, além da dosagem de glicemia e teste de tolerância à glicose. O peso corporal e a quantidade de gordura perigonadal e subcutânea foram analisadas. A T1DM reduziu em 36% o volume de osso trabecular nos animais Cre-, enquanto que os animais nocaute para Dkk-1 perderam apenas 16%. A perda óssea cortical não foi observada em animais diabéticos nocaute para Dkk-1, ao contrário dos animais controle. Animais diabéticos, tanto Cre- quanto Cre+, apresentaram menor taxa de reparo ósseo e redução do número de osteoblastos e dos níveis séricos de P1NP. O número de osteoclastos e níveis séricos de TRAP se apresentaram aumentados apenas nos animais diabéticos controle (Cre-). Em suma, Dkk-1 derivado de osteócitos não influencia o desenvolvimento de T1DM, nem interfere no reparo óssea durante a T1DM, mas desempenha papel importante na perda óssea induzida por Dkk-1 osteocítico por regular o número de osteoclastos.

Palavras-Chave: Cicatrização, Osso e Ossos, Via de sinalização Wnt, Diabetes Mellitus tipo 1, Crânio.

Abstract

Bone is a dynamic tissue able to repair spontaneously after an injury of establishment of a defect, due to the coordinated action of matrix and bone cells, mediated by the activation of several signaling pathways. Some factors, such as diabetes, interfere on this biological response, resulting in a negative impact over bone repair and remodeling. Nevertheless, the mechanism involved are yet to be clarified. The present study aimed to investigate the role of Wnt/ β -catenin on bone repair in animals either normal or diabetic and study the effects of diabetes on the remodeling process. First of all, the study aimed to evaluate the role of Wnt pathway through the inhibition of Dkk-1 expression, a regulatory protein of this pathway. For this, it was used C57BL/6 mice submitted to 2 types of Dkk-1 deletion: global deletion (Dkk-1^{fl/fl};Rosa26ERT2:Cre) or osteocyte-specific deletion (Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre). Animals without deletion were used as control (Cre-negative). All animals were submitted to subcritical calvaria defect of 1.8 mm diameter. The animals were followed for 4 weeks after the surgical procedure and then euthanized. Calvaria bones were collected for microtomographic, histological and histometric analyses. And for investigation of the expression of gene involved on bone metabolism (Dkk-1; Runx2; OCN; OPG e RANKL). Blood samples were collected before euthanasia in order to determine serum levels of P1NP and CTx, biochemical markers of bone remodeling. In both strains, it was observed greater bone repair when (Dkk-1^{fl/fl};Rosa26ERT2:Cre=33%; Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre=45%) compared to its respective control Cre-. However, only in the animals Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre+ it was observed an increase of P1NP, a marker of bone formation and reduction of CTx, marker of bone resorption. Deletion of osteocyte-derived Dkk-1 significantly increased the amount of mineralized bone surface, mineral apposition rate and bone formation, as well as the number of osteoblasts. Considering the genetic expression, in Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre+ there was an increase of Runx2, OCN e OPG. Therefore, we can conclude that Wnt plays a role on bone repair and the use of animals with specific deletion of osteocyte-derived Dkk-1 is a potential research tool to study the involvement of Wnt pathway on bone metabolism, in several pathological conditions associated. On the second part of this study, C57BL/6 mice with specific deletion of Dkk-1 in osteocytes (Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre) were subjected to the model of type 1 diabetes (T1DM) using 5 consecutive injections of streptozotocin (STZ) (40 mg/kg – i.p) aiming to evaluate the

impact of T1DM on bone repair. The respective offspring cre-negative animals were used as control. Twelve weeks later, the animals were subjected to the model of calvaria defect as described previously. After euthanasia, 4 weeks after the surgical procedure, calvaria and femur from each animal were collected for microtomographic, histological and histometric analyses. Blood samples were collected in order to determine serum levels of proteins involved with bone metabolism. Corporal weight and the amount of perigonodal and subcutaneous fats were analyzed. T1DM reduced by 46% the volume of trabecular bone in animals Cre⁻, while the Dkk-1 knockout animals lost only 16%. The cortical bone loss was completely protected in diabetic Dkk-1 knockout animals. T1DM suppressed the bone formation rate, number of osteoblast, the serum levels of P1NP and bone defect repair in either Cre⁻ or Cre⁺ animals. The number of osteoclasts and the serum levels of TRAP were increased only in diabetic control animals. In summary, osteocyte-derived Dkk-1 does not interfere on the development of T1DM, and it does not mediate bone repair during T1DM, but it plays an important role on bone loss induced by osteocyte-derived Dkk-1 by regulation of osteoclasts.

Keywords: Wound and healing, Bone and Bones, Wnt signaling pathway, Type 1 diabetes mellitus, Skull.

Sumário

1	Introdução geral.....	14
1.1.	Tecido Ósseo.....	15
1.2.	Reparo Ósseo.....	16
1.3.	Via de sinalização Wnt no tecido ósseo.....	17
1.4.	Modelo de defeito de calvária.....	19
1.5.	Diabetes tipo 1.....	20
2	Proposições.....	22
2.1.	Objetivo Geral.....	23
2.2.	Objetivos específicos.....	23
3	Capítulos.....	24
3.1.	Capítulo 1 - Papel da via de sinalização Wnt no reparo ósseo em camundongos knockout para Dkk-1 submetidos ao defeito sub-crítico de calvária	26
3.2.	Capítulo 2 - Perda de Dkk-1 osteocítico atenua perda óssea cortical e trabecular mas não acelera reparo ósseo em camundongos com diabetes tipo 1	44
4	Conclusão Geral.....	55
	Referências.....	57
	ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal.....	61

Introdução Geral

1.1. Tecido ósseo

O osso é um tecido conjuntivo mineralizado, que exerce funções importantes no corpo, tais como locomoção, suporte e proteção de tecidos moles, além de atuar como reserva de cálcio e fósforo e compartimentalizar a medula óssea (DATTA *et al.*, 2008). Apesar da sua aparência inerte, o osso é um tecido altamente dinâmico pois está continuamente sendo reabsorvido e neoformado (CLARKE, 2008), mediado por sua estrutura complexa, formada por células, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos e uma matriz extracelular (MEC).

Os osteoblastos são células cuboidais localizadas ao longo da superfície óssea. Consistem de 4-6% de todas as células residentes e são amplamente conhecidas por sua função de formação óssea. São derivados de uma célula tronco mesenquimal que se compromete com a linhagem osteoblástica por ação de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e pelos membros da família Wntless (Wnt). A expressão dos genes de fator de transcrição relacionado a Runt (Runx2) e Osterix (Osx) são cruciais para a diferenciação osteoblástica. Posteriormente, na fase proliferativa, os progenitores de osteoblastos mostram atividade de fosfatase alcalina (FA), sendo então considerados pré-osteoblastos. Quando maduros, os osteoblastos passam a expressar níveis elevados de Osx e osteoprotegerina (OPG) e a secretar proteínas da matriz óssea tais como osteocalcina (OCN), sialoproteína óssea (BSP) e colágeno tipo I (CAPULLI *et al.*, 2014).

Os osteócitos, os quais consistem de 90-95% do total de células ósseas, são os tipos celulares mais abundantes do tecido ósseo e apresentam vida útil de até 25 anos. Eles são derivados de osteoblastos, que se localizam dentro de uma lacuna circundada por matriz óssea mineralizada. Durante a fase de osteócitos maduro, os marcadores de osteoblastos (OCN, BSP, colágeno tipo I e FA) são regulados negativamente dando lugar aos marcadores de osteócitos, proteína da matriz de dentina-1 (DMP1) e esclerostina (SOST), que se tornam expressas em altas concentrações. Sua principal função é mecanossensitiva, que é alcançada devido sua morfologia dendrítica e localização estratégica dentro da matriz óssea (BONEWALD, 2011).

Os osteoclastos, cuja função é de reabsorção óssea, são terminalmente diferenciados em células multinucleadas, as quais se originam de células mononucleares da linhagem hematopoiética sob a influência de fator estimulador de

colônia de macrófagos (M-CSF) secretado por células mesenquimais osteoprogenitoras e osteoblastos, bem como de RANKL, secretado por osteoblastos, osteócitos e células estromais (CROCKETT *et al.*, 2011).

A MEC do tecido ósseo, é uma matriz rígida pois é calcificada, entretanto apresenta certa elasticidade. Ela é composta por uma fase orgânica constituída especialmente por colágeno do tipo I, além de proteínas não colagenosas tais como: proteoglicana, glicoproteína, osteonectina, fibronectina, osteopontina, sialoproteína óssea, osteocalcina, dentro outras. A fase inorgânica, por sua vez, é composta principalmente por fosfato e cálcio que se organizam em cristais de hidroxiapatita, proporcionando resistência e rigidez ao tecido (ORYAN *et al.*, 2015). Quando ainda está na fase não calcificada a MEC recebe o nome de osteoide.

1.2. Reparo ósseo

Em ação bem orquestrada, as células ósseas e a MEC promovem remodelação contínua do tecido ósseo (SIMS & GOOI, 2008). Essa capacidade intrínseca de regeneração é importante tanto para o desenvolvimento do sistema esquelético, quanto para o reparo em resposta à injúria tecidual.

O processo de reparo ósseo pode ser dividido em 3 fases: (1) estágio inflamatório, (2) estágio proliferativo, (3) estágio de remodelação. Na fase inflamatória, que acontece logo após a injúria, se observa inicialmente um hematoma, devido a lesão dos vasos do osso e periósteo, seguido de elevação da quantidade de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, -6 e TNF). A lesão vascular gera hipóxia tecidual com conseqüente necrose de osteócitos. Em seguida, macrófagos fagocitam as áreas necróticas e liberam fatores de crescimento responsáveis pela migração, recrutamento e proliferação de células tronco mesenquimais as quais se diferenciam em angioblastos, fibroblastos e osteoblastos. A combinação de células inflamatórias, broto vasculares e fibroblastos imaturos formam um tecido de granulação. Em condições normais a fase inflamatória é rápida e dura até uma semana após injúria (ORYAN *et al.*, 2015; ARAÚJO *et al.*, 2015). Em seguida se inicia a fase proliferativa, que pode ser dividida em duas partes, fibroplasia e formação óssea, e se caracteriza pela formação de tecido, de forma rápida e intensa. Na fibroplasia há deposição rápida de matriz, que por sua vez é penetrada por vasos e células formadoras de tecido ósseo. Os osteoclastos removem osso necrótico, ao mesmo tempo que se tem a formação de matriz osteoide gerando um

ósteon primário. Na fase de remodelação, há mineralização do osso, e escultura do tecido ósseo em sua forma, tamanho e competência biomecânica originais (ORYAN *et al.*, 2015).

Apesar da reconhecida capacidade regenerativa do tecido ósseo após uma lesão, fatores locais e sistêmicos tais como condições associadas a um microambiente desfavorável, técnicas cirúrgicas sub-ótimas, ou instabilidade biomecânica (GOMES & FERNANDES, 2011), podem afetar o equilíbrio fisiológico/molecular do osso e contribuir para um processo de reparo inadequado (GOMES & FERNANDES, 2011; PHAN *et al.*, 2004). Diante disso, torna-se interessante entender os mecanismos biológicos e moleculares envolvidos no processo de reparo.

1.3. Via de sinalização Wnt no tecido ósseo

A via de sinalização Wnt tem sido dividida em 3 braços principais: as vias não canônicas Wnt-polaridade celular planar e via Wnt-cálcio, e a via Wnt-beta-catenina também chamada de via canônica, sendo que esta última tem se destacado por seus efeitos em células ósseas.

A via de sinalização Wnt canônica se inicia quando proteínas WNT se ligam ao seu complexo de receptores, receptor transmembrana Frizzled (FZD) e receptor de lipoproteínas de baixa densidade - relacionado a proteína 5/6 (LRP5/6) (GRUBER *et al.*, 2016). Esta interação resulta em inativação do complexo de destruição de beta-catenina. Consequentemente, beta-catenina se acumula no citoplasma, e é então translocada para o núcleo onde se associa com fatores de transcrição para estimular genes alvo para estimular formação óssea. A via Wnt pode ser modulada por antagonistas extracelulares tais como Dickkopfs 1 (Dkk-1) ou Esclerostina (SOST), que se ligam ao LRP bloqueando seu sítio de interação (Figura 1). De forma geral, a via de sinalização Wnt estimula a proliferação, diferenciação, crescimento, sobrevivência, desenvolvimento e regeneração celular (SHI *et al.*, 2016).

No tecido ósseo, a via Wnt regula a osteogênese e parece estar envolvida no processo de reparo ósseo (KRISHNAN *et al.*, 2006). A via canônica Wnt afeta toda a linhagem osteoblástica, estimulando o comprometimento e diferenciação de células tronco mesenquimais em osteoblastos. A ativação da via Wnt em osteoblastos promove expressão de OPG causando menor diferenciação de osteoclastos e

consequentemente redução da reabsorção óssea (BARON & KNEISSEL, 2013). Durante o reparo ósseo, a via Wnt melhora a massa óssea, pois promove osteoblastogênese e contribui para função do osteoblasto sendo considerada, portanto, osteoindutora (KRISHNAN *et al.*, 2006; MAJIDINIA *et al.*, 2017).

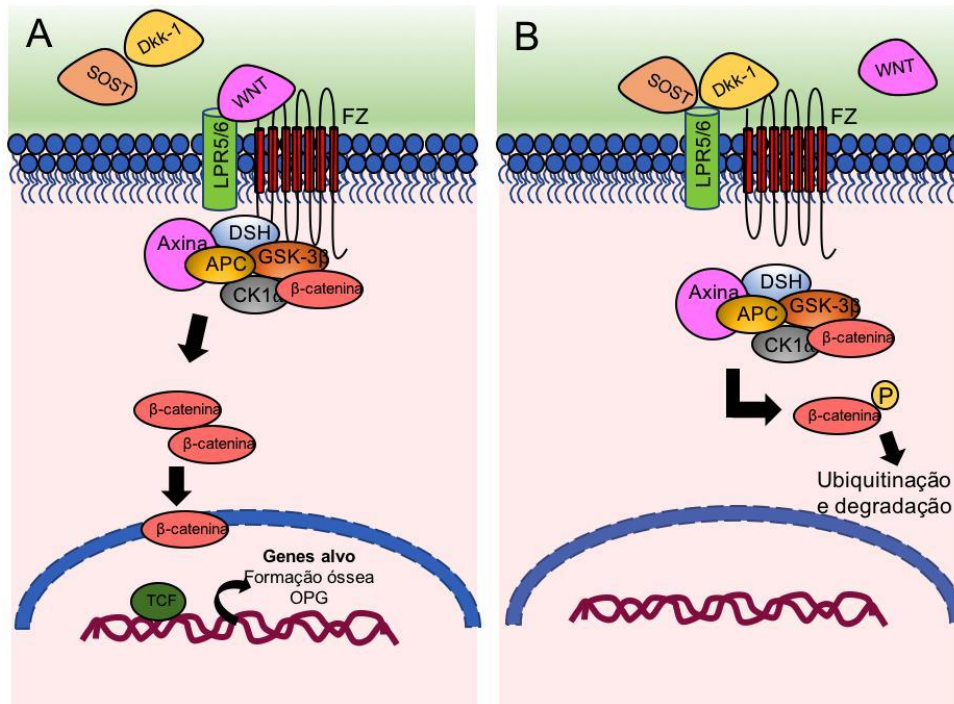


Figura 1. Via de sinalização Wnt/beta-catenina. (A) Wnt se liga ao receptor FZD e co-receptores LRP5/6. DSH recruta o complexo de destruição de beta-catenina para a membrana celular permitindo que beta-catenina se acumule no citoplasma e transloque para o núcleo. No núcleo, beta-catenina interage com TCF e ativa a transcrição gênica. (B) Quando Dkk-1 e SOST interagem com os receptores de Wnt, beta-catenina é sequestrada pelo complexo de destruição composto por Axina, CK1alfa, APC e GSK3beta, fosforilada e ubiquitinada e consequentemente degradada por proteassomo. (Fonte: Próprio autor)

Como dito anteriormente, a via Wnt pode ser regulada pela ação de alguns inibidores. Dkk-1 é o membro mais bem estudado da família de DKK que tem 4 formas diferentes (DIARRA *et al.*, 2007). Ele está amplamente expresso em diversas células, incluindo osteoblastos e osteócitos (KE *et al.*, 2012). Sabendo que Dkk-1 é inibidor chave da interação Wnt/LRP5, espera-se que a redução da expressão de Dkk-1 resulte no aumento da atividade de Wnt e consequentemente aumente a massa óssea (MORVAN *et al.*, 2006). A desregulação da expressão de Dkk-1 está relacionada a diversas desordens ósseas, incluindo artrite reumatoide, vários tipos de câncer, tais como câncer de mama, próstata e mieloma, bem como na

osteoporose induzida por glicocorticoide ou pós-menopausa, e diabetes (HUANG *et al.*, 2018). Assim, Dkk-1 se destaca não apenas como regulador negativo chave da diferenciação de osteoblastos, mas também porque está envolvido na patogênese de diversas doenças que afetam o tecido ósseo (COLDITZ *et al.*, 2018). Apesar da sua relevância, algumas questões acerca da regulação da homeostasia óssea via Dkk-1 ainda permanecem não respondidas, como por exemplo, a fonte celular de Dkk-1 relacionada às condições patológicas, e seu uso como ferramenta para estudo da participação da via Wnt durante o reparo ósseo (COLDITZ *et al.*, 2018).

1.4. Modelo de defeito de calvária

Considerando que os defeitos de reparo ósseo podem trazer sérios problemas clínicos e socioeconômicos com implicações no estilo e qualidade de vida de pacientes, o desenvolvimento de modelos experimentais que contribuam para a compreensão dos mecanismos biológicos do processo de reparo ósseo são de extrema importância (VAJGEL *et al.*, 2013).

Dentre os diversos tipos de ensaios, a pesquisa *in vivo* com animais, mais especificamente modelos em roedores, tem sido preferida por prover dados relevantes das condições fisiopatológicas e assim ser útil para estabelecer intervenções clínicas efetivas (GOMES & FERNANDES, 2011).

Dentre os modelos disponíveis para estudar a função óssea, os modelos de defeito de calvária tem ganhado grande destaque, pois permitem o estabelecimento de um defeito uniforme, reproduzível e padronizado, de fácil avaliação por análises radiográfica e histológica. Sua localização anatômica favorece um excelente acesso cirúrgico e manuseio intra-operatório. Esse modelo, por sua vez, apresenta como principal desvantagem a impossibilidade de avaliar a cicatrização óssea sob carga mecânica além da quantidade limitada de tecido para análise histológica ou outro tipo de avaliação (VAJGEL *et al.*, 2013).

O modelo de defeito em calvária pode ser subdividido em dois tipos: defeito de tamanho crítico, aqueles que não cicatrizam espontaneamente durante a vida do animal; ou defeitos subcríticos, onde a regeneração óssea é esperada. O modelo de defeito crítico tem sido indicado para estudo do reparo/regeneração tecidual auxiliado por enxertos, enquanto que o modelo de defeito subcrítico permite avaliação de uma ampla variação de condições, processos biológicos e efeito de substâncias no equilíbrio fisiológico do reparo ósseo. Especificamente o defeito

subcrítico de calvária tem sido usado para avaliar a resposta biológica do processo de reparo óssea após o estabelecimento de uma condição patológica (SANTANA *et al.*, 2003; SHYNG *et al.*, 2002; GOMES & FERNANDES, 2011).

1.5. Diabetes tipo 1

A diabetes mellitus (DM) é uma desordem do metabolismo da glicose caracterizado por hiperglicemia a qual induz o aparecimento de um grande número de complicações não tratáveis tais como retinopatia e dano renal. A DM pode ser classificada em dois tipos básicos: a DM tipo 2 (T2DM) que é resultado da resistência à insulina acompanhada de secreção insuficiente de insulina em resposta à glicose, e a DM tipo 1 (T1DM) que resulta na deficiência da secreção de insulina (Huang *et al.*, 2018).

Diabetes tipo 1 (T1DM) é uma desordem autoimune que acomete crianças e adultos jovens (DABELEA *et al.*, 2007; GREEN *et al.*, 2000). Portanto, o manejo clínico da T1DM é requerido durante toda a vida. Dados epidemiológicos vem indicando aumento na incidência de T1DM em torno de 2-5% em todo mundo (MAAHS *et al.*, 2010), sendo o Brasil o terceiro país do mundo com a maior prevalência de T1DM em crianças de 0-14 anos (IDF, 2019). Vias metabólicas que são alteradas pela T1DM impõem um dano constante e cumulativo à maioria dos tecidos e órgãos ao longo da vida. Enquanto que as complicações vasculares, renais, oftalmológicas e neuronais são amplamente conhecidas, alterações em outros tecidos, tais como o osso, têm também se tornado foco nos últimos anos.

Pacientes com T1DM apresentam risco aumentado a fraturas, aproximadamente 6 vezes maior, as quais são frequentemente responsáveis por imobilização crônica, redução da qualidade de vida, e morte (FLIKWEERT *et al.*, 2018). A T1DM pode prevenir a redução da secreção do fator anabólico ósseo, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e reduzir a concentração de osteocalcina (VERROKEN *et al.*, 2015). Além disso, há aumento do nível de produtos finais de glicação avançada (AGE), os quais são conhecidos por interferir na adesão de osteoblastos à matriz óssea e induzir apoptose de células-tronco mesenquimais, comprometendo assim a osteoblastogênese e subsequentemente a atividade osteoblástica (MCCARTHY *et al.*, 2004). Além disso, AGEs se intercalam na matriz de colágeno, aumentando a rigidez do osso e reduzindo a força óssea. Em adição, a mecanosensibilidade dos osteócitos está reduzida em camundongos diabéticos, o

que pode impactar negativamente a regulação da remodelação óssea (MCCARTHY *et al.*, 2004).

Como dito anteriormente, a via de sinalização Wnt é uma via importante para regulação da massa óssea. Ela estimula a formação de osso via osteoblastos e reduz osteoclastogênese, reduzindo assim, reabsorção óssea (KRISHNAN *et al.*, 2006). Considerando que a T1DM inibe formação óssea, torna-se interessante saber se a via de sinalização Wnt está alterada durante a T1DM. De fato, estudos têm mostrado um aumento dos níveis de Dkk-1, tanto em animais e humanos com T1DM (TSENTIDIS *et al.*, 2017; HUANG *et al.*, 2018). No entanto, os mecanismos pelos quais a via Wnt participa na doença óssea associada à T1DM ainda precisam ser melhor compreendidos. Portanto, esse estudo objetiva a investigação da participação da via Wnt, usando o Dkk-1 como ferramenta, no reparo ósseo após defeito subcrítico de calvária em animais com T1DM.

Proposições

2. PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivos:

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a participação da via Wnt no processo de reparo ósseo, via bloqueio da expressão de dkk-1, utilizando o defeito subcrítico de calvária em camundongos e investigar a influência da diabetes tipo 1 no reparo e remodelação óssea.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o tecido ósseo por meio de microtomografia computadorizada do fêmur e osso da calvária em camundongos normossistêmicos e diabéticos
- Avaliar a remodelação óssea por meio de dosagem sérica de marcadores de formação (P1NP) e de reabsorção óssea (CTX e TRAP) em camundongos normossistêmicos e diabéticos
- Avaliar a expressão gênica e níveis séricos dos reguladores da via Wnt, Dkk-1 e SOST no fêmur e no osso da calvária de camundongos normossistêmicos e diabéticos
- Avaliar a taxa de mineralização, aposição mineral, e de formação óssea por meio de análise histológica no fêmur e no osso da calvária em camundongos normossistêmicos e diabéticos
- Quantificar o número de osteoclastos e osteoblastos por perímetro ósseo no fêmur e no osso da calvária em camundongos normossistêmicos e diabéticos
- Avaliar a expressão gênica de marcadores do metabolismo ósseo, osteoprotegerina (OPG) e RANKL, no osso da calvária de camundongos normossistêmicos e diabéticos
- Analisar os parâmetros de controle metabólicos de glicose, peso corporal e quantidade de gordura de camundongos normossistêmicos e diabéticos

Capítulos

3. CAPÍTULO

REGIMENTO INTERNO

Por se tratar de pesquisa envolvendo animais, o projeto de pesquisa referente a esta dissertação foi submetido à apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado sob número de protocolo 150/2017 (Anexo A).

Esta Tese de Doutorado baseia-se no Artigo 37º do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado. Os resultados obtidos estão apresentados em na forma de dois artigos científicos, sendo um deles já publicado em revista científica indexada (ANEXO B) e o outro já redigido de acordo com as normas da revista científica escolhida para publicação. Esse artigo, no entanto, está apresentado em português, seguindo as normas do Programa de Pós-Graduação que determina a apresentação em inglês apenas para os artigos já previamente aceitos para publicação.

Artigo 1: Papel da via de sinalização Wnt no reparo ósseo em camundongos knockout para Dkk-1 submetidos ao defeito sub-crítico de calvária

Periódico: Bone*

Qualis capes: A2

Fator de Impacto: 4.5

Artigo 2: Perda de Dkk-1 osteocítico atenua perda óssea cortical e trabecular mas não acelera reparo ósseo em camundongos com diabetes tipo 1 (**Artigo Publicado**)

Periódico: Scientific Reports**

Qualis capes: A1

Fator de Impacto: 4.576

Normas das revistas disponíveis em:

* <https://www.journals.elsevier.com/bone>

** <https://www.nature.com/srep/author-instructions>

Capítulo 1

Artigo 1

Papel da via de sinalização Wnt no reparo ósseo em camundongos knockout para Dkk-1 submetidos ao defeito sub-crítico de calvária

Caio Dutra^{1,2}, Paula Goes^{1,3}, Juliane Colditz¹, Juliane Salbach-Hirsch¹, Lennart Lösser¹, Sylvia Thiele¹, Lorenz C. Hofbauer¹, Martina Rauner¹, Renata Ferreira Carvalho Leitão^{2,*}

¹ Divisão de Endocrinologia, Diabetes e Doenças Ósseas, Departamento de Medicina III & Centro de Envelhecimento, Universidade Técnica de Dresden, Alemanha.

² Departamento de Morfologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, Brasil.

³ Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, Brasil.

Papel da via de sinalização Wnt no reparo ósseo em camundongos knockout para Dkk-1 submetidos ao defeito sub-crítico de calvária

Resumo

Introdução: Os defeitos de reparo ósseo são um grave problema de saúde que trazem sérios problemas clínicos e socioeconômicos com impacto na qualidade de vida de pacientes. Dentre as vias de sinalização que regulam o metabolismo ósseo, ganha destaque a via Wnt por induzir a osteoblastogênese. Dickkopf -1 (Dkk-1) que é antagonista da via Wnt, por sua vez, regula negativamente a diferenciação osteoblástica, frequentemente está aumentado durante eventos inflamatórios e, portanto, envolvido na patogênese de doenças ósseas. **Objetivo:** Assim, esse estudo objetivou avaliar o papel da via de sinalização Wnt, através da deleção de Dkk-1 no reparo ósseo usando o modelo de defeito sub-crítico de calvária em camundongos. **Metodologia:** Para tanto foi realizado o defeito na calvária de camundongos (C57BL/6) submetidos a dois tipos de deleção de Dkk-1: global (Dkk-1^{fl/fl}; Rosa26ERT2:Cre) ou específica (Dkk-1^{fl/fl}; Dmp1:Cre). Os descendentes respectivos Cre-negativos foram usados como controles. Os animais foram acompanhados por 4 semanas, sendo então eutanasiados. As calvárias foram coletadas para as análises micro-tomográfica, histológica e histométrica (área mineralizada/área de osso [MS/BS]), taxa de aposição mineral [MAR] e taxa de formação óssea/área de osso [BFR/BS], avaliação do número de osteoclastos e osteoblastos/perímetro ósseo [N.Oc/B.Pm] [N.Ob/B.Pm] e investigação da expressão gênica de Dkk-1; Runx2, OCN, OPG e RANKL. Amostras sanguíneas foram coletadas para dosagem sérica de Dkk-1, P1NP e CTx. **Resultados:** As deleções global e específica de Dkk-1 resultaram em aumento na formação óssea em 33% e 45%, respectivamente. Entretanto apenas os animais com deleção específica de Dkk-1 em osteócitos e submetidos ao defeito induziram remodelação óssea (P1NP=+47%, CTx=-27%), e estimularam o aumento da função de osteoblastos (Runx=+142%, OCN=+73%, OPG=+319%), e do seu número (3x maior) quando comparado aos animais Cre-. (p<0,05). **Conclusão:** A via Wnt exerce papel no reparo ósseo.

Palavras-chave: reparo ósseo, sinalização Wnt, Dkk-1, osteócitos, defeito de calvária

1. INTRODUÇÃO

O osso é um tecido capaz de reparar espontaneamente durante a vida adulta, após o estabelecimento de uma lesão ou defeito, quando um estímulo fisiológico converge para uma resposta. No entanto, determinadas condições associadas a um microambiente não-favorável, técnicas cirúrgicas sub-ótimas ou instabilidade mecânica podem levar a um prognóstico ruim da regeneração óssea. Porém, o exato mecanismo biológico/molecular relacionado ao reparo tardio de uma fratura óssea ainda permanece desconhecido (Gomes & Fernandes, 2011; Houschyar et al., 2019).

O tecido ósseo é regulado por múltiplos fatores de crescimento (Lieberman et al., 2002). A via de sinalização Wnt/ β -catenina tem papel central no desenvolvimento e homeostasia, bem como no reparo e regeneração óssea após injúria (Xu et al., 2014). Ligantes da via estimulam crescimento ósseo, sugerindo sua participação na regulação da cicatrização óssea, e destacando o seu potencial como alvo terapêutico nos casos de reparo de fraturas. O papel da via Wnt/ β -catenina é reforçado por pesquisas que mostram que a redução da expressão de Dickkopf-1 (Dkk-1), um antagonista da via, pode levar ao aumento da massa óssea cortical e trabecular *in vivo* (Morvan et al., 2006), e pode causar supressão de forma dose-dependente da mineralização da matriz de osteoblastos *in vitro* (Li et al., 2006). Além disso, anticorpos que neutralizam Dkk-1 (Dkk-1Ab) estão sendo avaliados como potencial terapia para distúrbios ósseos e cicatrização de fraturas em modelos animais (Li et al., 2011; Ominsky et al., 2011). Neste contexto, a literatura aponta que a antagonização da via Wnt/ β -catenina através de Dkk-1 tem se mostrado uma ferramenta de pesquisa adequada para os estudos relacionados à regulação da biologia óssea REFERÊNCIA.

Estudos *in vivo* têm sido extensamente utilizados e têm contribuído grandemente para o desenvolvimento e estabelecimento de uma ampla variedade de abordagens que contribuam para a regeneração do tecido ósseo REFERÊNCIA. Entre os diferentes modelos de estudo sobre reparo ósseo, se destaca o defeito sub-crítico de calvária, que permite a avaliação do impacto de muitas condições, processos biológicos e substâncias na fisiologia da regeneração óssea (Gomes & Fernandes, 2011). O'Loughlin et al (2008) revisaram o uso de modelos animais em estudos sobre reparo de fraturas e classificaram a seguinte ordem de frequência:

rato 38%, coelho 19%, camundongo 13%, ovelha 11%, cachorro 9%, cabra 4% e outros 4%. Comparado com animais de grande porte, roedores apresentam baixo custo e são de fácil manuseio e armazenamento. Adicionalmente, para roedores, existe mais disponibilidade de ferramentas biológicas para testes. Além disso, eles têm uma alta taxa metabólica, e, especialmente em camundongos, o uso de modelos transgênicos e *knockout* tem contribuído enormemente para o conhecimento da função de modulação de genes específicos. Em suma, neste artigo investigamos o papel da via de sinalização Wnt no reparo ósseo usando o modelo de defeito sub-crítico de calvária em camundongos com deleção global ou específica de Dkk-1.

2. METODOLOGIA

2.1. Desenho do estudo e aspectos éticos

Este foi um estudo randomizado, controlado e cego. Os protocolos experimentais foram executados seguindo as recomendações do *guideline* ARRIVE (*Animal Research: Reporting In Vivo Experiments*) para o uso de animais experimentais (Kilkenny et al., 2010). Os experimentos foram iniciados após aprovação pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Ceará e da Universidade Técnica de Dresden e do Governo do Estado da Saxônia, na Alemanha.

2.2. Animais

Os experimentos foram realizados em camundongos adultos jovens machos (12 semanas de idade), pesando de 20-25 g, submetidos a dois tipos de deleção de Dkk-1: deleção global (Dkk-1^{fl/fl};Rosa26ERT2:Cre) ou específica em osteócitos (Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre). Foram utilizados uma linhagem transgênica de camundongos (C57BL/6), previamente descrita (Colditz et al., 2018). Os descendentes respectivos Cre-negativos foram usados como controles. Os animais da linhagem Dkk-1^{fl/fl};Rosa26ERT2:Cre (positivos e negativos), na idade de 7 semanas receberam 100 µL de Tamoxifeno (10 g/L, Sigma, Munique, Alemanha) por 5 dias para indução da deleção global de Dkk-1. Todos os camundongos foram genotipados usando protocolos de PCR padronizados.

Os camundongos foram mantidos em grupos de até 4 animais por gaiola, em ciclo claro-escuro de 12:12h, em temperatura ambiente. Os animais foram randomicamente distribuídos em grupos, e as análises subsequentes foram realizadas de modo cego.

O cálculo do poder do teste foi realizado para determinar o tamanho da amostra. O animal foi considerado a unidade do estudo. O tamanho da amostra foi determinado para prover 80% de poder a fim de reconhecer uma diferença estatística de 20% entre os grupos, e o desvio padrão de 15% com intervalo de confiança de 95% ($p=0,05$), considerando o reparo ósseo com variável de desfecho primário. Portanto, foi requerido um tamanho da amostra de pelo menos 6 animais por grupo. Foram utilizados no presente estudo 96 animais.

2.3. Modelo de defeito sub-crítico de calvária

Para indução do defeito sub-crítico, os animais foram anestesiados, e então foi realizada uma incisão de 1,0 cm para exposição do tecido ósseo da calvária. Por meio de uma broca carbide, foi criado um defeito subcrítico de 1,8 mm de diâmetro, sob irrigação contínua com solução salina estéril (Yang, Girod, 2014). Os animais foram acompanhados por 4 semanas após o procedimento cirúrgico e então eutanasiados através de inalação de dióxido de carbono (Yang, Girod, 2014).

2.4. Análise por micro-tomografia-computadorizada

Após a eutanásia, o osso da calvária foi removido e fixado em paraformaldeído tamponado a 10%. Em seguida, os espécimes foram escaneados por um micro-tomógrafo computadorizado (μ -CT) (vivaCT 40, Scanco Medical), usando configurações previamente descritas (Tsourdi et al., 2015; Goes et al., 2019). O volume de osso reparado foi medido após reconstrução 3D. Os dados foram apresentados como média da área do defeito dado em mm^2 .

2.5. Análises histológica e histométrica do osso

Análises histológica e histométrica do osso foram realizadas de acordo com Rauner et al. (2014). Brevemente, 2 injeções intraperitoneais de calceína, um corante fluorescente que se liga ao osso (20 mg/kg; Sigma) foram administradas em cada animal 5 e 2 dias antes da eutanásia. Após escaneamento por micro CT, o osso da calvária foi embebido em metilmetacrilato e cortado em secções de $7\mu\text{m}$ para análise da fluorescência óssea, a fim de determinar a área mineralizada/área de osso (MS/BS), taxa de aposição mineral (MAR) e taxa de formação óssea/área de osso (BFR/BS).

Calvárias coletadas em um outro set de experimentos foram fixadas, desmineralizadas com EDTA a 10% e processadas para a inclusão em parafina e

obtenção de cortes histológicos de 4 μm , corados em seguida com fosfatase ácida târtaro-resistente (TRAP) para a quantificação do número de osteoclastos/perímetro ósseo (N.Oc/B.Pm). A partir dessas mesmas lâminas foi calculado o número de osteoblastos/perímetro ósseo (N.Ob/B.Pm). As análises histométricas foram realizadas utilizando o software *Osteomeasure* (*Osteometrics*) de acordo com padrões internacionais (Dempster et al., 2013).

2.6. Isolamento de mRNA e PCR quantitativo

Em um novo set de experimentos, o tecido da região do defeito foi macerado em nitrogênio líquido usando Trizol (Invitrogen), o mRNA foi isolado do osso da calvária e quantificado usando espectrômetro Nanodrop (Peqlab). 500 nanogramas de mRNA foram transcritos reversamente usando Superscript II (Invitrogen) e subsequentemente usados para RT-PCR baseado em SYBR_green (ABI 7500 Fast; Applied Biosystems). As condições de PCR foram 50°C por 2 minutos e 90°C por 10 minutos seguido de 40 ciclos com 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto e foram realizados em sistema de RT-PCR a 7900HT da *Applied Biosystems*. Os resultados foram calculados aplicando o método de ciclo de threshold (Livak & Schmittgen, 2001) e foram apresentados como aumento *x-fold* relativo à beta-actina. As sequências de *primers* foram: β -actina s: ATCTGGCACACACCTTCT, β -actina as: GGGGTGTTGAAGGTCTCAA; Dkk-1 s: GAGGGGAAATTGAGGAAAGC, Dkk-1 as: AGCCTTCTTGTCCTTTGGTG, Runx2 s: CCCAGCCACCTTTACCTACA, Runx2 as: TATGGAGTGCTGCTGGTCTG, OCN s: GCGCTCTGTCTCTCTGACCT, OCN as: ACCTTATTGCCCTCCTGCTT, OPG s: CCTTGCCCTGACCACTCTTA, OPG as: ACACTGGGCTGCAATACACA, RANKL s: CCGAGACTACGGCAAGTACC, RANKL as: GCGCTCGAAAGTACAGGAAC (Goes et al., 2019).

2.7. Análise sérica

Imediatamente antes da eutanásia, sob anestesia, amostras sanguíneas foram coletadas via punção cardíaca, e o soro foi armazenado após 10 min de centrifugação a 400 G. As concentrações de Dkk-1, telopeptídeo C-terminal (CTX) e propeptídeo amino-terminal procolágeno tipo 1 (P1NP) foram mensuradas no plasma sanguíneo usando kits de imunoenensaio (Dkk-1: R&D Systems, USA; CTX e P1NP: Immundiagnostik Systems, Alemanha) de acordo com os protocolos recomendados pelos fabricantes.

2.8. Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) ou como mediana (variação), quando apropriado. A normalidade e homoscedasticidade dos dados foram verificadas. ANOVA seguido de Teste de Bonferroni foram usados para comparar médias. O Teste T-Student foi utilizado para análise dos parâmetros histomofométricos da calvária. O nível de significância foi estabelecido em 5% em todos os testes. Todos os cálculos foram realizados usando o software Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Todos os protocolos e análises foram realizados por examinadores calibrados e cegos para os grupos.

3. RESULTADOS

3.1 Deleção de Dkk-1 induziu reparo do osso da calvária

Sendo um defeito subcrítico, após 4 semanas, foi observada uma redução significativa da área do defeito em todos os grupos experimentais quando comparado à área total do defeito no dia 0 (Figura 1A e 1C). Os grupos experimentais com deleção, global (Dkk-1^{fl/fl};Rosa26ERT2:Cre+ [Figura 1A e 1B]) e deleção osteocítica (Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre+ [Figura 1C e 1D]) apresentaram maior formação óssea, evidenciadas pela redução da área do defeito (Dkk-1^{fl/fl};Rosa26ERT2:Cre = 33%; Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre = 45%) quando comparado aos seus respectivos controles Cre-negativo.

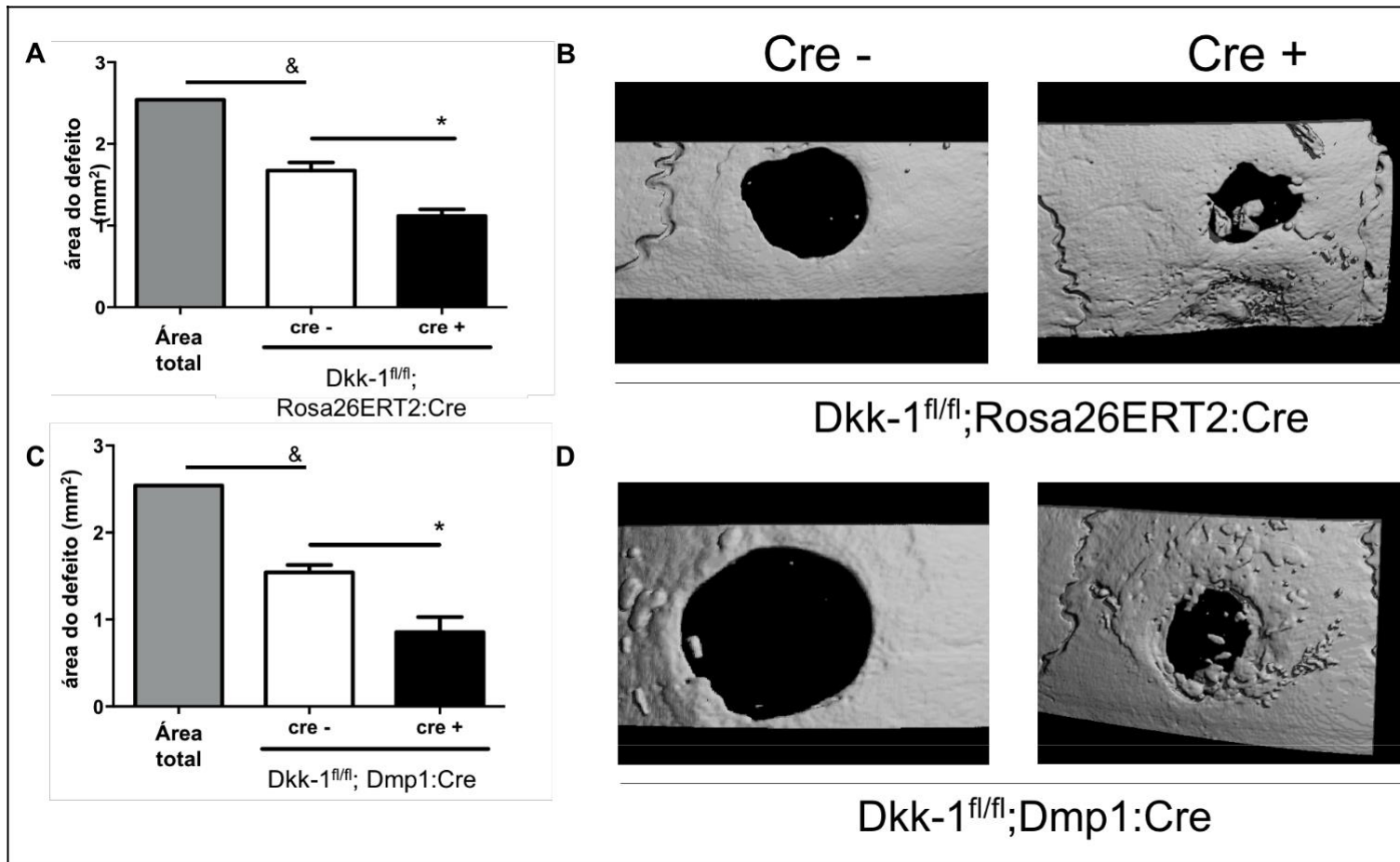


FIGURA 1 | Deleção de Dkk-1 acelerou o reparo do osso da calvária. Osso da calvária de camundongos machos Dkk-1^{fl/fl};Rosa26ERT2:Cre e Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre-positivo e -negativo com 16 semanas foram analisados por μ CT. (A) Área do defeito ósseo de camundongos Dkk-1^{fl/fl};Rosa26ERT2:Cre, (B) Reconstrução 3D da calvária, (C) Área do defeito ósseo de camundongos Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre (D) Reconstrução 3D da calvária em. Dados representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo. Análises estatísticas foram realizadas por ANOVA seguida de Teste de Bonferroni. &P<0.05 vs. área total do defeito no dia 0; *P<0.05 vs. Controle Cre-negativo.

3.2. Deleção de Dkk-1 osteocítico induziu aumento do marcador de formação óssea (P1NP) e redução do marcador de reabsorção óssea (CTx) no plasma sanguíneo.

A fim de confirmar a ausência de expressão do gene Dkk-1 em animais knockout, qRT-PCR foi realizada na calvária. O defeito semi-crítico em calvária aumentou de forma significativa a expressão do gene Dkk-1 nos animais Cre-negativos, mas não nos Cre-positivos, em ambas as linhagens Dkk-1^{fl/fl};Rosa26ERT2:Cre (Figura 2A) e Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre (Figura 2B).

Os marcadores séricos de remodelação óssea também foram avaliados. O defeito de calvária não causou mudança nas concentrações de P1NP nos grupos controles Cre-, uma vez que não se observaram diferenças estatísticas entre as concentrações de P1NP no plasma desses animais no dia 0 e 3 semanas após a cirurgia. Os camundongos Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre-positivos, mas não os Dkk-1^{fl/fl};Rosa26ERT2:Cre-positivos, apresentaram aumento significativo dos níveis séricos deste marcador de formação óssea quando comparados ao grupo controle Cre-negativo (Figuras 2C e 2D).

As figuras 2E e 2F mostram que o processo de reparo ósseo resulta em um aumento significativo da concentração de CTx, um marcador de reabsorção óssea no plasma sanguíneos dos animais de todos os grupos experimentais. Esse aumento, no entanto, é maior nos grupos Cre-negativos, controles das linhagens Dkk-1^{fl/fl};Rosa26ERT2:Cre (Figura 2E) e Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre (Figura 2F), quando comparados aos dois grupos com deleção de Dkk (Cre positivos), indicando menor atividade osteoclástica nos grupos Cre positivos.

Na análise histomorfométrica da calvária, foi possível observar maior taxa de remodelação óssea apenas nos animais Cre-positivos da linhagem Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre, quando comparado ao respectivo controle ($p < 0,05$) (Tabela 1). Adicionalmente, foi observado um aumento significativo do número de osteoblastos na calvária dos animais Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre-positivo. Não houve diferença significativa quanto ao número de osteoclastos em ambas as linhagens (Tabela 1).

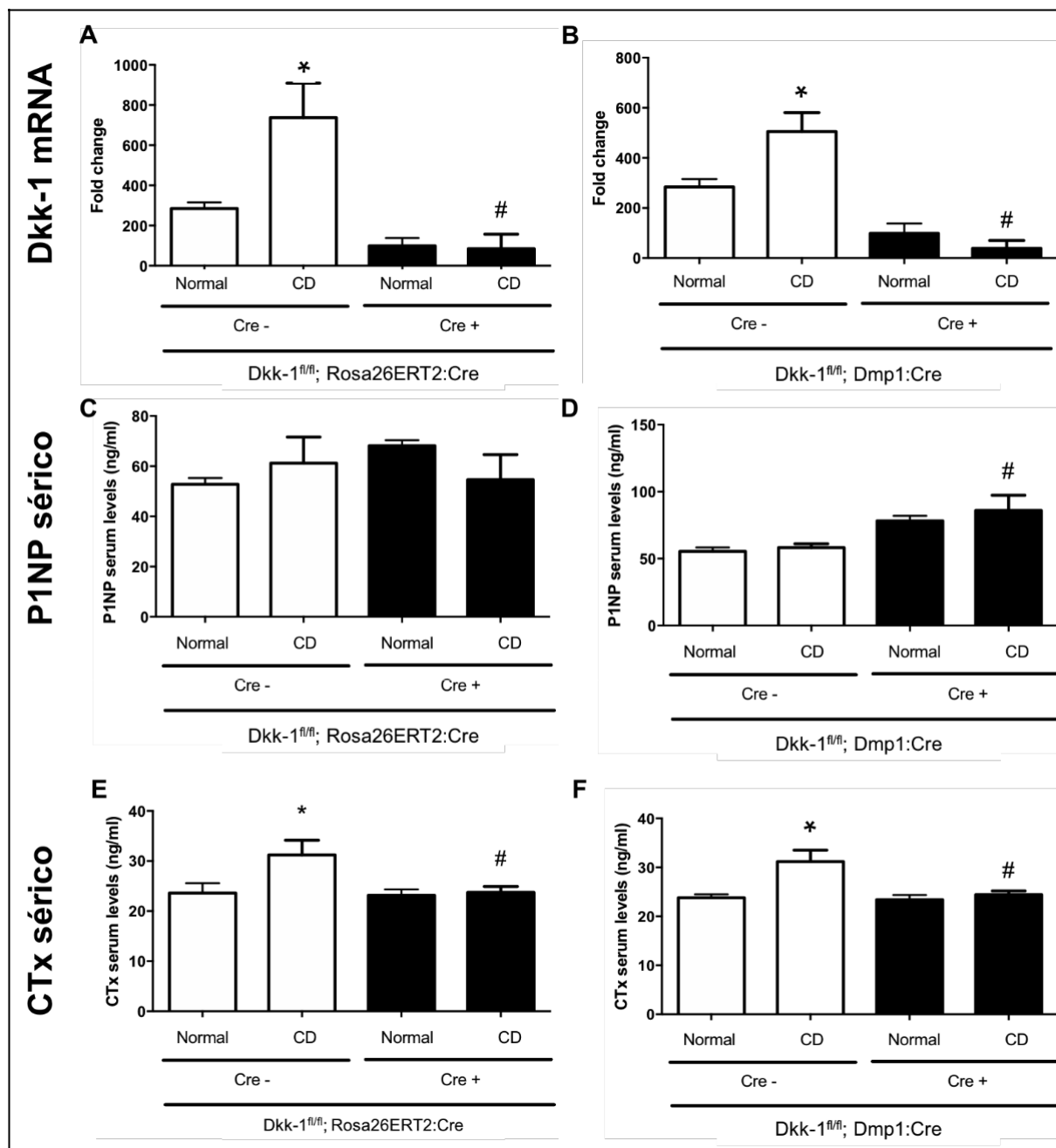


FIGURA 2 | Deleção de Dkk-1 altera os níveis séricos de marcadores do metabolismo ósseo após defeitos de calvária. Análise de RT-PCR foi realizada para Dickkopf-1 (Dkk-1) no tecido ósseo da calvária nas linhagens Dkk-1^{fl/fl};Rosa26ERT2:Cre (A) e Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre (B). Níveis séricos de P1NP nas linhagens Dkk-1^{fl/fl};Rosa26ERT2:Cre (C) e Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre (D). Níveis séricos de CTx nas linhagens Dkk-1^{fl/fl};Rosa26ERT2:Cre (E) e Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre (F). Dados representam a média±EPM de 6 animais por grupo. Análise estatística foi realizada usando os testes ANOVA seguida de Teste de Bonferroni. *P<0.05 vs. Calvária normal de animais Cre-; #P < 0.05 vs. controle Cre-negativo submetido a defeito de calvária. (CD = defeito de calvária).

Tabela 1. Parâmetros histomorfométricos da calvária de camundongosDkk-1^{fl/fl};Rosa26ERT2:Cre e Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre.

	Dkk-1 ^{fl/fl} ;Rosa26ERT2:Cre			Dkk-1 ^{fl/fl} ;Dmp1:Cre		
	Cre –	Cre +	Valor de p	Cre –	Cre +	Valor de p
MS/BS (%)	25,79±2,65	24,41±6,98	0,87	24,03±2,01	39,37±2,39	<0,01
MAR (µm/d)	4,11±1,27	4,24±2,72	0,96	2,25±0,29	7,12±1,87	<0,01
BFR/BS (µm ³ /µm ² /d)	0,40±0,12	0,42±0,27	0,96	1,24±0,30	5,93±1,20	<0,01
N.Oc/B.Pm (#/mm)	9,25±0,90	7,58±0,75	0,21	1,60±0,46	1,35±0,42	0,74
N.Ob/B.Pm (#/mm)	4,94±0,97	8,38±2,38	0,06	3,58±1,13	11,85±0,65	<0,01

MS/BS. Superfície mineralizada/superfície óssea; MAR. Taxa de aposição mineral; BFR/BS. Taxa de formação óssea/superfície óssea; N.Oc/B.Pm. número de osteoclastos/perímetro ósseo, ; N.Ob/B.Pm. número de osteoblastos/perímetro ósseo.

Dados representam a média±EPM. Análise estatística por teste T-Student.

3.3.A deleção específica de Dkk-1 em osteócitos induziu formação óssea.

A análise da expressão gênica de Runx2, OCN, OPG e RANKL em tecido ósseo de calvária, coletada 3 semanas após o procedimento cirúrgico, não mostrou diferenças estatísticas entre a expressão desses genes entre os grupos Dkk-1^{fl/fl};Rosa26ERT2:Cre positivo e seu respectivo controle Cre-negativo (Figuras 3A, 3B, 3C e 3D). Entretanto, no grupo knockout para Dkk-1 derivado de osteócitos, foi observado um aumento na expressão de Runx2 (Figura 3E), OCN (Figura 3F) e OPG (Figura 3G) ($p < 0.05$), marcadores de formação óssea, e uma diminuição significativa da expressão de RANKL (Figura 3H) quando comparado ao seu respectivo grupo controle Cre-negativo

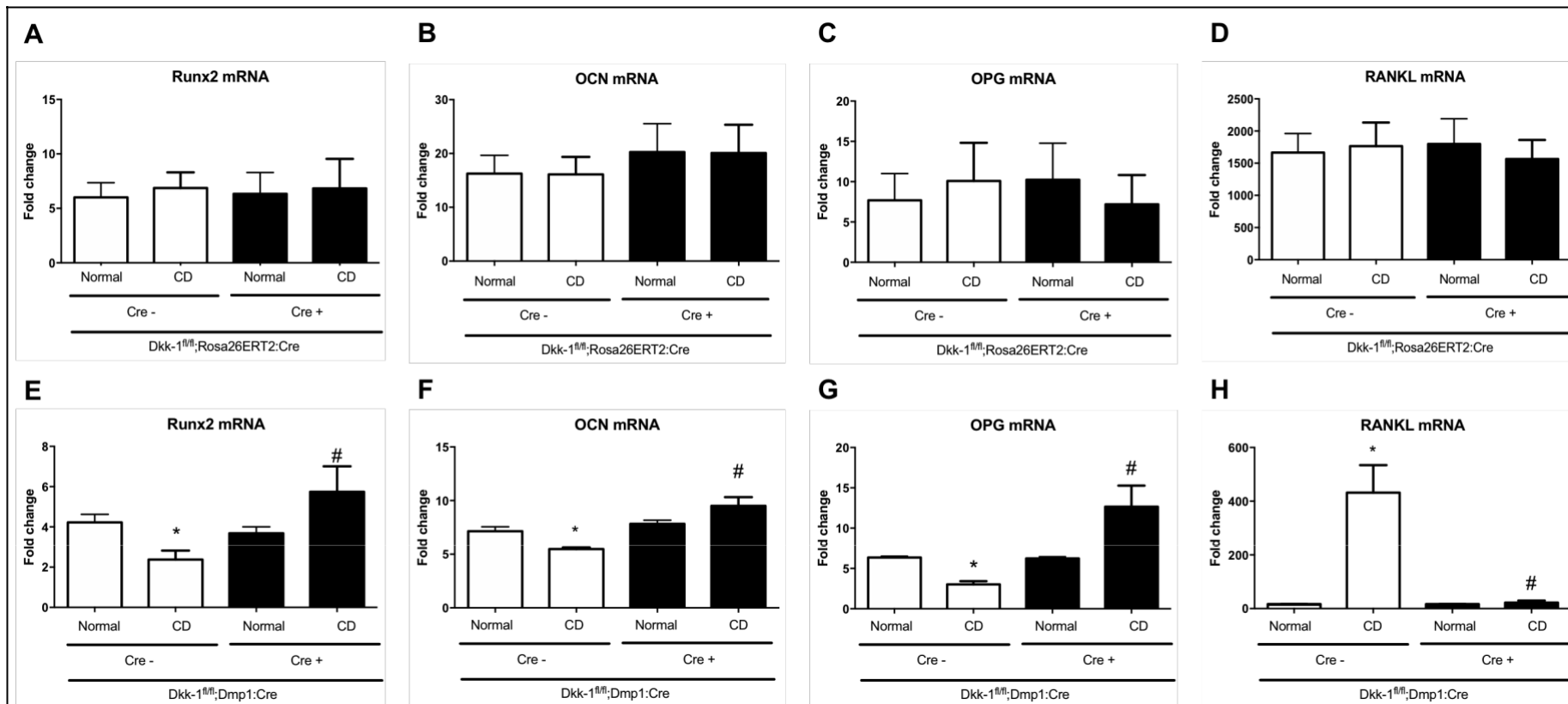


FIGURA 3 | A deleção específica de Dkk-1 em osteócitos induziu aumento na expressão gênica de marcadores da formação óssea e diminuição de RANKL, marcador de reabsorção óssea. Expressão gênica de marcadores do metabolismo ósseo durante o reparo ósseo de defeito de calvária das linhagens Dkk-1^{fl/fl};Rosa26ERT2:Cre e Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre-positivo e -negativo, através de RT-PCR para investigação de: (A e E) *Runx2*, (B e F) *Osteocalcina* (OCN), (C e G) *Osteoprotegerina* (OPG) (D e H) *Receptor ativador do Fator Nuclear kB* (RANKL). Dados representam a média±EPM de 6 animais por grupo. Análises estatísticas foram realizadas através dos testes de ANOVA seguido de Bonferroni. *P<0.05 vs. Calvária normal de animais Cre-; #P < 0.05 vs. controle Cre-negativo submetido a defeito de calvária. (CD = defeito de calvária).

4. DISCUSSÃO

Este estudo mostrou que o reparo parcial das lesões ósseas foi observado 4 semanas após a indução do defeito ósseo em todos os grupos experimentais, sendo esse efeito mais evidente no grupo Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre. A deleção de Dkk-1 de origem osteocítica resultou ainda no aumento da concentração sérica de P1NP, um marcador associado à formação óssea e redução da concentração sérica de CTx, um marcador de reabsorção óssea. O grupo de animais Dkk-1^{fl/fl};Dmp1:Cre apresentou um aumento significativo da razão superfície mineralizada/superfície óssea (MS/BS), das taxas de aposição mineral (MAR) e formação óssea/superfície óssea (BFR/BS), além de um número maior de osteoblastos e aumento na expressão de genes relacionados à formação óssea, tais como: Runx2, osteocalcina e osteoprotegerina. De fato, a literatura relata que a superexpressão de Dkk-1 em camundongos resulta em osteopenia com número reduzido de osteoblastos (Li et al., 2006) ao passo que a deleção de um único alelo do gene Dkk-1 aumenta a massa óssea, a formação óssea (Morvan et al., 2006) e o número de osteoblastos (Colditz et al., 2018).

Esses resultados sugerem fortemente a participação da via Wnt/ β -catenina no reparo ósseo, uma vez que Dkk-1 é considerado o inibidor mais importante da via. As proteínas Wnt consistem em uma família de moléculas que permitem a comunicação celular com importante atuação na remodelação óssea REFERÊNCIA. A via de sinalização Wnt/ β -catenina estimula a diferenciação de osteoblastos e promove formação óssea REFERÊNCIA. A ligação de Dkk-1 ao receptor LRP5/6, resulta em sua internalização, inibindo assim a translocação da beta-catenina para o núcleo, e consequentemente a transcrição de genes envolvidos na proliferação celular (Funck-Brentano et al., 2014).

Apesar de a deleção global de Dkk-1 ter reduzido a área do defeito de calvária quando comparado ao controle Cre-negativo, não foi capaz de aumentar as concentrações séricas P1NP nem de reduzir as concentrações de CTx. Os animais submetidos à deleção global de Dkk tampouco apresentaram aumento no número e/ou função de osteoblastos de forma significativa, como foi observado nos animais com deleção osteocítica de Dkk-1. Uma possível explicação para tal achado pode estar relacionada ao aumento compensatório de Esclerostina (SOST), que restringe o recrutamento e reativação de osteoblastos quando os níveis de Dkk-1 estão baixos. Esclerostina, um inibidor solúvel da via Wnt intimamente relacionado com Dkk-1, é uma molécula produzida por osteócitos que impede a ligação de proteínas Wnt ao seu

receptor, levando à inibição da via. Os dois inibidores de Wnt parecem se autorregular. Florio e colaboradores demonstraram que a inibição de esclerostina resulta em regulação positiva de Dkk-1 (Florio et al., 2016), o que sugere uma superexpressão de esclerostina associada à inibição de Dkk. De forma controversa, Colditz et al. (2018) mostraram que a deficiência de Dkk-1 aumenta formação óssea mesmo quando os níveis de SOST estão elevados, sugerindo que a esclerostina só é capaz de inibir formação óssea na presença de Dkk-1, e Dkk-1 seria determinante para a formação óssea. De qualquer forma a regulação da função osteoblástica pela sinalização de Wnt é um mecanismo que ainda requer maior investigação.

Esses resultados podem estar relacionados ao mecanismo de deleção global de Dkk-1, através do sistema cre/lox, por meio da enzima cre-recombinase dependente de tamoxifeno (TAM), onde TAM é usado para ativar Cre e gerar animais modificados tempo- ou tecido-específico. Entretanto, TAM é um fármaco que pertence à classe dos moduladores seletivos do receptor de estrógeno, apresentando uma ação antagonista ao estrógeno no osso, o que pode influenciar a homeostasia óssea. TAM reduz a ação de osteoclastos e isso pode repercutir negativamente no *turnover* ósseo, o que explica as diferenças nos resultados das concentrações séricas de P1NP e expressões gênicas de Runx2, OCN e OPG entre os grupos com deleção global e deleção osteocítica de Dkk-1. O efeito do TAM no tecido ósseo pôde ainda ser corroborado quando da análise da expressão gênica de marcadores ósseo nos animais com deleção específica de Dkk-1. Os animais DMP submetidos ao defeito de calvária apresentaram aumento importante de RANKL, indicando ação de osteoclastos, em detrimento à ação de osteoblastos que foi reduzida. O grupo de animais submetidos à deleção global de Dkk-1, apesar do reparo óssea quando comparado ao seu controle Cre-negativo, apresentou uma taxa menor de formação óssea em relação ao grupo com deleção osteocítica (Zhong et al., 2015).

Vale ressaltar que a deleção específica de Dkk-1 envolve o promotor de DMP1 como alvo pra Cre, especificamente em osteócitos, células que expressam DMP1 (Toyosawa et al., 2001; Feng et al., 2002), sem interferir no receptor de estrógeno (Lu et al., 2007). Muito embora a deleção de Dkk-1 seja local, tem sido descrito que ela é suficiente para modular massa óssea, regular o *turnover* sistêmico independente do aumento compensatório de esclerostina (Colditz et al., 2018). Além disso, considerando a análise da expressão gênica de marcadores do metabolismo ósseo, a deleção específica de Dkk-1 parece estimular a formação óssea abreviando a atuação de osteoclastos durante a fase proliferativa do reparo ósseo, enquanto ativa osteoblastos fazendo com

que sua atuação aconteça de forma mais precoce. Neste contexto, o uso de modelo animal com deleção de Dkk-1 derivado de osteócito parece ser mais interessante para o estudo de condições patológicas que possam interferir no metabolismo ósseo.

5. CONCLUSÃO

A via Wnt exerce papel fundamental no reparo ósseo .

6. REFERÊNCIAS

Colditz, J. Thiele, S. Baschant, U. Niehrs, C. Bonewald, L.F. Hofbauer, L.C. Rauner, M. Postnatal Skeletal Deletion of Dickkopf-1 Increases Bone Formation and Bone Volume in Male and Female Mice, Despite Increased Sclerostin Expression. *J. Bone Miner. Res.* 33(2018):1698-1707.

Dempster, D.W. Compston, J.E. Drezner, M.K. Glorieux, F.H. Kanis, J.A. Malluche, H. et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J. Bone Miner. Res.* 28(2013):2-17.

Feng, J.Q. Zhang, J. Dallas, S.L. Lu, Y. Chen, S. Tan, X. et al. Dentin matrix protein 1, a target molecule for Cbfa1 in bone, is a unique bone marker gene. *J. Bone Miner. Res.* 17(2002):1822-1831.

Florio, M. Gunasekaran, K. Stolina, M. Li, X. Liu, L. Tipton, B. et al. A bispecific antibody targeting sclerostin and DKK-1 promotes bone mass accrual and fracture repair. *Nat. Commun.* 27(2016);7:11505.

Funck-Brentano, T. Bouaziz, W. Marty, C. Geoffroy, V. Hay, E. Cohen-Solal, M. Dkk-1-Mediated Inhibition of Wnt Signaling in Bone Ameliorates Osteoarthritis in Mice. *Arthritis & Rheumatology* 66(2014), 3028–3039.

Goes, P. Dutra, C. Lösser, L. Hofbauer, L.C. Rauner, M. Thiele, S. Loss of Dkk-1 in Osteocytes Mitigates Alveolar Bone Loss in Mice With Periodontitis. *Front Immunol.* 10(2019)10:2924.

Gomes, xx. Fernandes, xx. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Laboratory Animals*. 45(2011),14–24.

Houschyar, K.S. Tapking, C. Borrelli, M.R. et al. Wnt Pathway in Bone Repair and Regeneration - What Do We Know So Far. *Front Cell Dev Biol*. 6(2019),170.

Kilkenny, C. Browne, W. Cuthill, I.C. Emerson, M. Altman, D.G. NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br. J. Pharmacol*. 160(2010):1577-9.

Li, J. Sarosi, I. Cattley, R.C. Pretorius, J. Asuncion, F. Grisanti, M. et al., Dkk1-mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia, *Bone* 39 (2006) 754–766.

Li, X. Grisanti, M. Fan, W. Asuncion, F.J. Tan, H.L. Dwyer, D. et al. Dickkopf-1 regulates bone formation in young growing rodents and upon traumatic injury. *J Bone Miner Res*. 26(2011):2610-2621.

Lieberman, J.R. Daluiski, A. Einhorn, T.A. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*. 84(2002):1032-1044.

Livak, K.J. Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*. 25(2001):402-408.

Lu, Y. Xie, Y. Zhang, S. Dusevich, V. Bonewald, L.F. Feng, J.Q. DMP1-targeted Cre Expression in Odontoblasts and Osteocytes. *Journal of Dental Research*, 86(2007): 320–325.

Morvan, F. Boulukos, K. Clement-Lacroix, P. Roman, R.S, Suc-Royer, I. Vayssiere, B. Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass, *J. Bone Miner. Res*. 21 (2006) 934–945

O'Loughlin, P. Morr, S. Bogunovic, L. Kim, A. Park, B. Lane, J. Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J. Bone Joint Surg. Am.* 90(2008):79–94

Ominsky, M.S. Li, C. Li, X. Tan, H.L. Lee, E. Barrero, M. et al. Inhibition of sclerostin by monoclonal antibody enhances bone healing and improves bone density and strength of nonfractured bones. *J. Bone Miner. Res.*; 26(2011):1012-1021.

Rauner, M. Föger-Samwald, U. Kurz, M.F. Brünner-Kubath, C. Schamall, D. Kapfenberger, A et al. Cathepsin S controls adipocytic and osteoblastic differentiation, bone turnover, and bone microarchitecture. *Bone.* 64(2014):281-287.

Toyosawa S, Shintani S, Fujiwara T, Ooshima T, Sato A, Ijuhin N, et al. (2001). Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 16:2017-2026.

Tsourdi, E. Rijntjes, E. Köhrle, J. Hofbauer, L.C. Rauner, M. Hyperthyroidism and Hypothyroidism in Male Mice and Their Effects on Bone Mass, Bone Turnover, and the Wnt Inhibitors Sclerostin and Dickkopf-1. *Endocrinology.*156(2015):3517-3527.

Xu, H. Duan, J. Ning, D. Li, J. Liu, R., Yang, R. et al. Role of Wnt signaling in fracture healing. *BMB Rep.* 47(2014):666-672.

Yang, B.E. Girod, S. Efficacy of bone healing in calvarial defects using piezoelectric surgical instruments. *J. Craniofac. Surg.* 25(2014):149-153.

Zhong, Z.A. Sun, W. Chen, H. Zhang, H, Lay, Y.E. Lane, N.E. Yao, W. Optimizing tamoxifen-inducible Cre/loxP system to reduce tamoxifen effect on bone turnover in long bones of young mice. *Bone.* 81(2015):614-619.

Capítulo 2



OPEN

Role of osteogenic Dickkopf-1 in bone remodeling and bone healing in mice with type I diabetes mellitus

Nick Hildebrandt^{1,5}, Juliane Colditz^{1,4,5}, Caio Dutra^{1,2}, Paula Goes^{1,3}, Juliane Salbach-Hirsch¹, Sylvia Thiele¹, Lorenz C. Hofbauer^{1,5} & Martina Rauner^{1,5}✉

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is associated with low bone mass and a higher risk for fractures. Dickkopf-1 (Dkk1), which inhibits Wnt signaling, osteoblast function, and bone formation, has been found to be increased in the serum of patients with T1DM. Here, we investigated the functional role of Dkk1 in T1DM-induced bone loss in mice. T1DM was induced in 10-week-old male mice with Dkk1-deficiency in late osteoblasts/osteocytes (Dkk1^{fl};Dmp1-Cre, cKO) and littermate control mice by 5 subsequent injections of streptozotocin (40 mg/kg). Age-matched, non-diabetic control groups received citrate buffer instead. At week 12, calvarial defects were created in subgroups of each cohort. After a total of 16 weeks, weight, fat, the femoral bone phenotype and the area of the bone defect were analyzed using μ CT and dynamic histomorphometry. During the experiment, diabetic WT and cKO mice did not gain body weight compared to control mice. Further they lost their perigonadal and subcutaneous fat pads. Diabetic mice had highly elevated serum glucose levels and impaired glucose tolerance, regardless of their Dkk1 levels. T1DM led to a 36% decrease in trabecular bone volume in Cre- negative control animals, whereas Dkk1 cKO mice only lost 16%. Of note, Dkk1 cKO mice were completely protected from T1DM-induced cortical bone loss. T1DM suppressed the bone formation rate, the number of osteoblasts at trabecular bone, serum levels of P1NP and bone defect healing in both, Dkk1-deficient and sufficient, mice. This may be explained by increased serum sclerostin levels in both genotypes and the strict dependence on bone formation for bone defect healing. In contrast, the number of osteoclasts and TRACP 5b serum levels only increased in diabetic control mice, but not in Dkk1 cKO mice. In summary, Dkk1 derived from osteogenic cells does not influence the development of T1DM but plays a crucial role in T1DM-induced bone loss in male mice by regulating osteoclast numbers.

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is an autoimmune disorder that is most often diagnosed in children and young adults^{1,2}. Thus, clinical management of T1DM is required throughout life. Metabolic pathways that are altered by T1DM impose a constant damage to most tissues and organ systems. While vascular, renal, ophthalmologic, and neuronal complications are widely known, other organs such as bone have also come into focus during more recent years. Patients with T1DM face an over sixfold increased risk of hip fractures, which are frequently responsible for chronic immobilization, reduced quality of life and death³⁻⁵. Various studies already established the link between T1DM, osteoporosis and impaired cortical and trabecular bone microarchitecture, e.g. reduced cortical thickness, decreased volumetric bone mineral density, as well as lower trabecular bone volume and trabecular number compared to non-diabetic controls⁴⁻⁸. Multiple reasons for the resulting structural bone fragility are in discussion, for example, the reduced secretion of the bone-anabolic insulin-like growth factor

¹Department of Medicine III and Center for Healthy Aging, Medical Faculty, Technische Universität Dresden, Fetscherstr. 74, 01307 Dresden, Germany. ²Post-Graduation Program in Morphological Science, Department of Morphology, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil. ³Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil. ⁴Present address: Rudolf Schönheimer Institute of Biochemistry, Medical Faculty, University of Leipzig, Johannisallee 30, 04103 Leipzig, Germany. ⁵These authors contributed equally: Nick Hildebrandt, Juliane Colditz, Lorenz C. Hofbauer and Martina Rauner. ✉email: martina.rauner@ukdd.de

1 (IGF-1), but also the reduced concentration of insulin itself and thereby the lack of anabolic effects on bone provided by the peptide hormone^{8,10}.

Further, the level of the advanced glycation end products (AGEs) is elevated, which is known to interfere with osteoblast attachment to bone matrix and to induce apoptosis in mesenchymal stem cells (MSC), thereby compromising osteoblastogenesis and subsequently osteoblast activity^{11,12}. Moreover, AGEs intercalate into the collagenous bone matrix, thereby increasing the collagenous network stiffness and render bone more susceptible to fractures¹³. In addition, mechanosensing by osteocytes is reduced in diabetic mice, which may negatively impact on the regulation of the bone remodeling cycle¹⁴.

The Wnt signaling pathway is one of the most important pathways to regulate bone mass. It stimulates bone formation via osteoblasts and reduces osteoclastogenesis, thereby, reducing bone resorption^{15,16}. Moreover, Wnt signaling promotes mesenchymal stem cell differentiation into osteoblasts rather than adipocytes¹⁷. Considering that T1DM inhibits bone formation^{17,18}, the question arises as to whether Wnt signaling is impaired in T1DM. In fact, studies found increased serum levels of Dickkopf-1 (Dkk1) and sclerostin, both of which are inhibitors of the Wnt pathway, in animals and human patients with T1DM^{19–21}. Moreover, elevated Dkk1 levels correlated with decreased bone mineral density in patients with T1DM. However, the formal proof whether Dkk1 and/or sclerostin are implicated in bone disease due to T1DM is still lacking²². As previously described, bone mass regulation via Dkk1 is not dependent on systemic levels, but on local Dkk1 expression, secreted by osteoblasts and osteocytes²³. Accordingly, we assessed here if skeletal Dkk1 production is implicated in the pathogenesis of T1DM-induced bone loss. Our results show that mice lacking Dkk1 in osteoblasts and osteocytes are not fully protected from trabecular bone loss due to T1DM, but that they lose less bone than their wildtype littermates. Cortical bone loss, however, is completely abrogated by Dkk1 deficiency. In contrast, Dkk1 does not drive impaired bone defect healing in T1DM. Thus, the effects of Dkk1 in diabetic bone disease appear to be site-specific and depending on modeling vs. remodeling activities.

Methods

Declaration of approval for animal experiments. All experiments involving animals were approved by the Landesdirektion Sachsen, Germany and were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations (approval number: TVV 38/2017). All experiments were performed according to ARRIVE guidelines as well.

Mouse models. *Dkk1^{fl/fl};Dmp1-Cre* mice, which lack Dkk1 constitutively in *Dmp1*-expressing cells (late osteoblasts, osteocytes), were characterized previously²³. *Dkk1^{fl/fl};Dmp1-Cre* littermates were used as controls. At the age of 10 weeks, male mice were randomly divided into groups treated with streptozotocin (STZ, 40 mg/kg) and control groups receiving intraperitoneal injections of citrate buffer (Ctrl). Both agents were injected for five consecutive days using the properties of low-dose STZ therapy to induce T1DM²⁴. Thus, the following cohorts were generated: *Dkk1^{fl/fl};Dmp1-Cre* Ctrl: n = 12, *Dkk1^{fl/fl};Dmp1-Cre* STZ: n = 12, *Dkk1^{fl/fl};Dmp1-Cre+Ctrl*: n = 10, *Dkk1^{fl/fl};Dmp1-Cre+STZ*: n = 12. Blood glucose levels and body weight of each mouse were measured twice a week until week 16, when they were sacrificed via intraperitoneal injection of a ketamine/xylazine mixture (90/10 mg/kg body weight). Blood samples were taken from the tail vein. A subgroup of mice received a subcritical calvarial defect of the size of 1.8 mm two weeks after induction of T1DM. After four weeks, the experiment was terminated (Fig. 1a).

All mice received a standard diet and drinking water *ad libitum*. Mice were separated in groups of 4 per cage and kept at room temperature in a 12 h light–dark-cycle. Each cage was enriched by a cardboard house. Approval for breeding the *Dkk1^{fl/fl};Dmp1-Cre* mouse line and for performing all invasive treatments was given by the institutional animal care committee of TU Dresden and the Landesdirektion Sachsen.

RNA isolation and quantitative PCR. Femoral bone was flushed and crushed in liquid nitrogen and the remains were immersed in Trifast (Peqlab, Germany). RNA isolation was performed according to the manufacturer's protocol. After reverse transcription using Superscript II (Invitrogen), cDNA was used for SYBR green-based real-time PCR. Primer sequences were as following: β -actin s: GATCTGGCACCACACCTTCT, β -actin as: GGGGTGTTGAAGGTCTCAAA; Dkk1 s: GCCTCOGATCATCAGACGGT, Dkk1 as: GCAGGTGTGGAGCCTAGAAG. Applied PCR conditions were: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C continued by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. A melting curve was created at 15 s of 90 °C, 1 min of 60 °C and 30 s of 95 °C. $\Delta\Delta CT$ method was used to calculate the results, which are presented as x-fold increase in comparison to beta-actin.

Defect healing. A subcritical calvarial defect was created in mice under anesthesia (ketamine/xylazine mixture (100/10 mg/kg body weight) by intraperitoneal injection) by drilling a hole of 1.8 mm. Therefore, the head was shaved, an incision was made, and the calvaria was exposed. The defect was created with a carbide burr drill with a tip diameter of 1.8 mm and a rotation rate of 400 rpm (Fine Science Tools, Heidelberg) on both hemispheres. The defect was made carefully to avoid damage to the dura mater. After rinsing the defect thoroughly with saline, the skin was closed and disinfected to avoid infection. After the procedure, mice received metamizole in their drinking water (1.33 mg/ml) for 7 days to reduce pain.

μ CT and assessment of the calvarial defect. The bones were fixed in 4% PBS-buffered formaldehyde for 48 h and dehydrated with 50% EtOH. Bone samples were stored in 50% EtOH until further analysis. Bone mass and microarchitecture were determined by micro-computed tomography (μ CT, vivaCT40, ScancoMedical, Switzerland) of femoral bone. The isotropic voxel size was 10.5 μ m (70 kVp, 114 μ A, 200 ms integration time). Femur scans included 100 metaphyseal slices, starting 1 mm proximal of the lower growth plate continuing

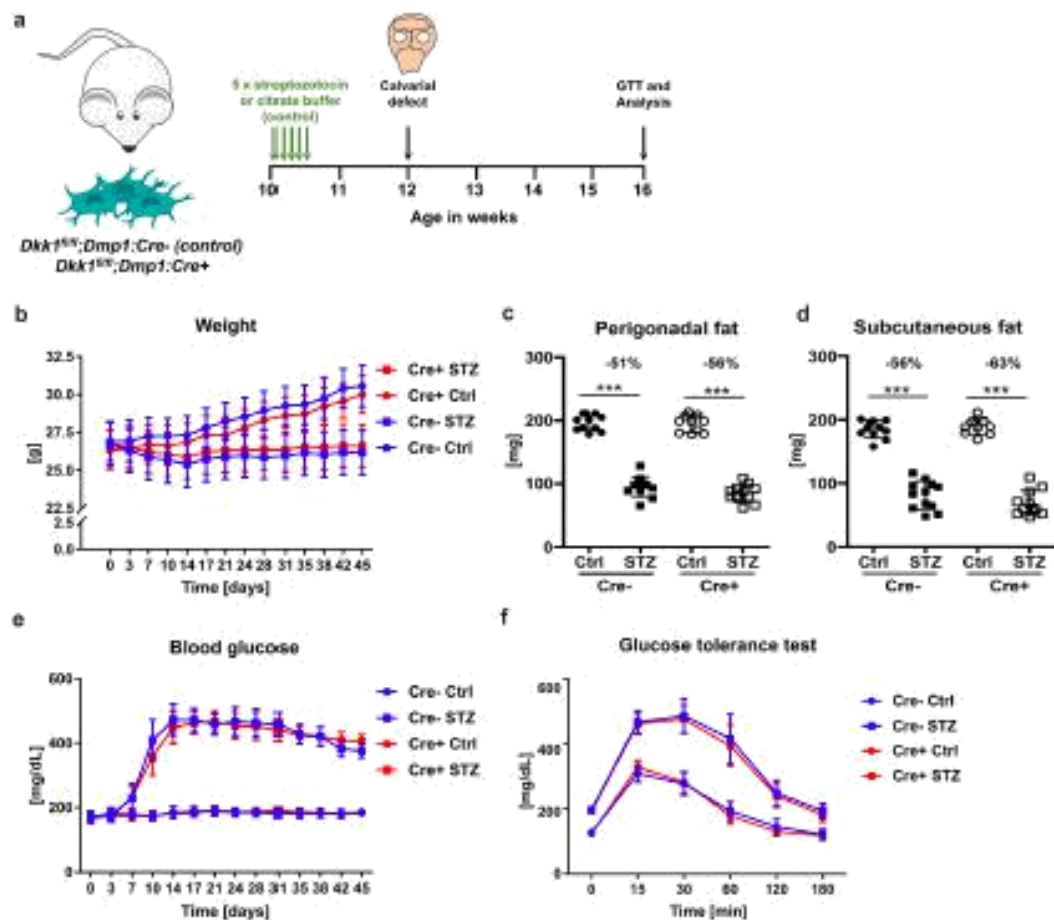


Figure 1. Osteogenic Dkk1 does not alter glucose homeostasis in T1DM. (a) Scheme of the experimental procedures. 10 week-old male $Dkk1^{fl/y};Dmp1:Cre$ mice and their respective Cre-negative littermates were injected 5 times with streptozotocin or citrate buffer (control group). Two weeks later the subcritical-sized calvarial defect was induced. After another four weeks, the glucose tolerance test (GTT) was conducted and mice were sacrificed afterwards for further analysis. Throughout the entire experiment, the body weight and blood glucose level of the animals was measured twice a week. (b) Weight was measured throughout the experiment. (c) Perigonadal and (d) subcutaneous fat pads were excised after sacrifice and weighed. (e) Blood glucose levels were measured throughout the experiment. (f) Glucose tolerance test was performed after 3 weeks of diabetes induction. All data are represented as the mean \pm standard deviation or as individual dots. $N = 10$ –12 per group. Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test. $^{***}p < 0.001$ vs. Ctrl.

upwards, and 150 diaphyseal slices, taken midpoint between the femoral head and femoral condylus. Scanco-Medical protocols were used for all analyses. Measurements of trabecular bone mineral density (BMD) and the ratio of trabecular bone volume per total bone volume (BV/TV) were conducted on metaphyseal femur, whereas cortical BV/TV, cortical tissue mineral density (TMD), cross-sectional total area (TA), cross-sectional bone area (BA), and maximum and minimum area moments of inertia (Imax and Imin) were analyzed in diaphyseal slices. All μ CT parameters adhere to international guidelines²⁵.

The right halves of the calvariae were measured using the μ CT with an isotropic voxel size of 10.5 μ m, 70 kVp, 145 μ A, and 300 ms integration time to generate three-dimensional reconstruction images of the defect areas. The area of newly formed bone at the bone defects was calculated from μ CT-reconstructed images by using an ImageJ analysis system²⁶.

Bone histomorphometry. Calcenin staining was performed to determine the bone formation rate in vivo. Therefore, mice received intraperitoneal injections of calcenin (20 mg/kg, Sigma, Germany) 5 and 2 days before

sacrifice. After fixation with 4% PBS-buffered paraformaldehyde tibias were dehydrated in an ethanol series with ascending concentrations. Methacrylate (Technovit 9100, Heraeus Kulzer, Germany) was used to embed the bones, which were then cut into 7 μm slices. Utilizing fluorescence microscopy, bone formation parameters such as the mineralized surface, mineral apposition rate, and bone formation rate were evaluated at the proximal tibia. To assess the number of osteoblasts, osteoclasts, and osteocytes, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-staining was performed on 2 μm thick, paraffin-embedded slices of the distal femur. Following international standards, Osteomeasure software (Osteometrics, Decatur, GA, USA) was used to obtain the just described histomorphometric data.

Serum analysis. Blood was taken via heart puncture of anaesthetized mice and serum was collected after 15 min centrifugation at 400 g. The concentration of type 1 procollagen amino-terminal-propeptide (P1NP) as bone formation marker, C-terminal telopeptide (CTX) as bone resorption marker, Dkk1, and sclerostin were determined using ELISA following the manufacturer's protocol (P1NP and CTX: Immundiagnostik Systems, Frankfurt am Main; Dkk1: R&D Systems, USA; Sclerostin: Alpco, USA). Serum samples used in sclerostin immunoassays were diluted 1:3. A mouse TRAP kit was used to determine the serum level of tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) according to the manufacturer's protocol (Immundiagnostik Systems Limited, Boldon).

Intraperitoneal glucose tolerance test. At an age of 16 weeks, right before sacrificing the mice, a glucose tolerance test was performed. Therefore, mice were fasted for 16 h and fasting blood glucose levels of mice were measured. Afterwards D-glucose (2 g/kg body weight) was administered via intraperitoneal injection and blood glucose levels were detected after 15, 30, 60, 120 and 180 min using a glucometer (ACCU CHEK Aviva III; Roche Diabetes Care, Mannheim, Germany). Blood samples were taken from the tail vein at indicated times.

Statistical analysis. Results are shown as means \pm standard deviation or as individual dots with the mean indicated as a horizontal line. Mouse cohorts were compared by calculating percentages based on mean differences within the genotypes. Two-way ANOVA with Bonferroni's ad hoc tests were performed to evaluate statistical significance. P-values below 0.05 were considered statistically significant.

Results

Osteogenic Dkk1-deletion does not alter metabolic parameters in T1DM. Knock-down of Dkk1 in bone tissue was first validated by qPCR. Cre-positive animals in the control and the STZ-treated groups showed a strong reduction of Dkk1 mRNA expression (-82% in non-diabetic Cre+ mice [p-value: 0.041], -91% in Cre+ diabetic mice [p-value: 0.048], compared to their respective Cre- littermates). To determine if osteogenic deletion of Dkk1 impacts on the development of T1DM, all animals were weighed twice a week and blood glucose levels were measured. As shown in Fig. 1b, Dkk1-knockout in Dmp1-cre-expressing cells did not influence weight development of diabetic or normoglycemic mice. This was also reflected in the weight of subcutaneous and perigonadal fat pads, which was similar in Cre-positive and Cre-negative mice (Fig. 1c,d). Furthermore, Cre positivity did not protect from hyperglycemia, since twofold increased blood glucose levels were found in diabetic mice compared to non-diabetic controls in both genotypes (Fig. 1e). Moreover, all STZ-injected mice showed impaired glucose tolerance regardless of osteogenic Dkk1 expression (Fig. 1f). Thus, Dkk1 derived from late osteoblasts and osteocytes does not play a major role in T1DM pathophysiology.

Lack of Dkk1 in osteoblasts and osteocytes mitigates T1DM-induced bone loss. To investigate the degree of bone protection provided by knockdown of Dkk1 in osteoblasts and osteocytes in T1DM mice, we performed μCT analyses. All Dkk1 knockout mice showed a significantly higher baseline bone mass, while all diabetic mice showed a significant reduction of trabecular bone volume (Fig. 2a). The degree of bone loss however was mitigated in Dkk1^{fl/fl};Dmp1-Cre+ mice, showing only a 16% loss of bone volume as compared to 36% in Cre- mice (Fig. 2a). Furthermore, Cre- diabetic mice displayed a decrease in trabecular number, thickness, and separation compared to Cre- controls, whereas no significant or lesser distinct differences within these parameters were observed between the normoglycemic and diabetic Cre+ groups (Fig. 2b–d). Regarding cortical thickness of the femoral midshaft, Cre- diabetic mice showed a significant 14% reduction, however, no bone loss was detected in diabetic mice with osteoblast/osteocyte-specific Dkk1-deletion (Fig. 2e). Similarly, Cre-diabetic mice lost 9% of cortical TMD compared to their normoglycemic controls, while no change occurred in Cre+ diabetic mice (Fig. 2f). Both, cross-sectional total area and cross-sectional bone area, as well as the maximum and minimum moment of inertia (I_{max} and I_{min}), decreased significantly in wildtype diabetic mice compared to their buffer-injected controls, whereas no difference could be established between healthy and diabetic Cre+ mice (Fig. 2g–j). Also, Cre+ mice showed higher baseline values for the aforementioned parameters (Fig. 2g–j). Thus, these data demonstrate the potential of osteogenic Dkk1 knockout to mitigate trabecular bone loss and to completely abolish reduction of cortical bone in T1DM in mice.

Dkk1 deletion in osteogenic cells does not protect from T1DM-induced inhibition of bone formation. To investigate the mechanisms why bone loss was mitigated in Dkk1 conditional knockout mice, we further analyzed bone formation parameters using histomorphometry and serum bone turnover markers. All mice lacking Dkk1 in late osteoblasts/osteocytes displayed elevated P1NP levels and a higher bone formation rate than their wildtype littermates (Fig. 3a–c). However, these parameters as well as the number of osteoblasts were decreased to an almost similar extent in both diabetic groups (Fig. 3a–c). Blood levels of the Wnt inhibitors

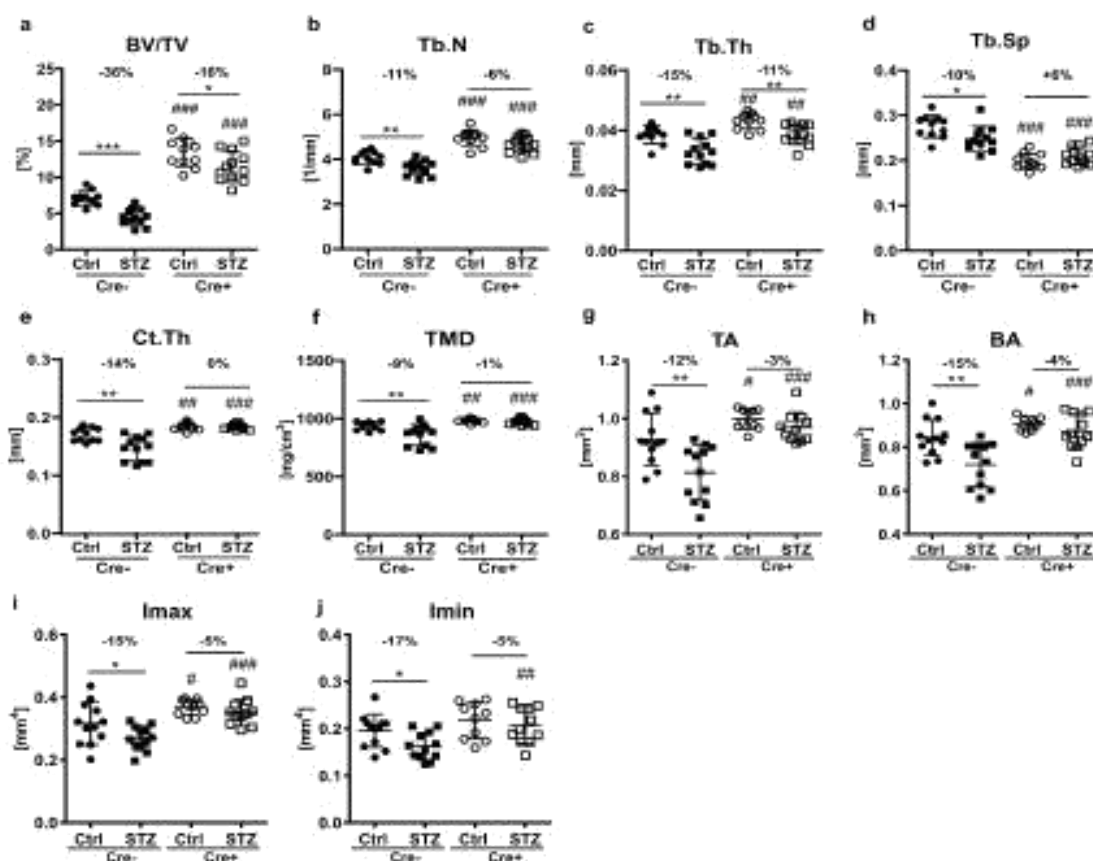


Figure 2. Deletion of *Dkk1* in osteoblasts and osteocytes mitigates bone loss due to T1DM. (a) Trabecular bone volume per total volume (BV/TV), (b) trabecular number (Tb.N), (c) trabecular thickness (Tb.Th), and (d) trabecular separation (Tb.Sp) of the distal femur of male *Dkk1;Dmp1-Cre* positive and negative mice with and without T1DM. (e) Cortical thickness (Ct.Th) of the femoral midshaft and (f) cortical tissue mineral density (TMD), (g) cross-sectional total area (TA), (h) cross sectional bone area (BA), (i) maximum moment of inertia (Imax), (j) minimum moment of inertia (Imin). Each dot indicates an individual mouse. $N = 11-12$ per group. Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Ctrl; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ comparing Ctrl and STZ *Cre-* mice with their corresponding *Cre+* littermates.

Dkk1 and sclerostin were increased in both diabetic groups (Fig. 3d,e), which may explain why osteogenic *Dkk1* deficiency failed to prevent the inhibition of bone formation in T1DM.

Knockout of *Dkk1* in *Dmp1*-expressing cells ameliorates the T1DM-mediated increase in bone resorption. In contrast to bone formation parameters, CTX as bone resorption marker, showed significantly increased serum levels in STZ-treated mice of both genotypes (Fig. 4a). Furthermore, STZ treatment increased serum levels of TRACP 5b in *Cre-* mice, while no difference was observed in *Cre+* mice (Fig. 4b). Similar results were obtained at histological level, with *Cre-* controls showing 35% more osteoclasts than *Cre+* controls and STZ increasing the number of osteoclasts in *Cre-* mice significantly by 37%, whereas *Cre+* mice showed no significant induction of osteoclasts (Fig. 4c). Thus, except for CTX, T1DM-induced changes in bone resorption parameters were mitigated by osteogenic *Dkk1* deficiency.

Impaired bone regeneration in T1DM is not mediated by *Dkk1*. Finally, we assessed the impact of *Dkk1* knockout in late osteoblasts/osteocytes on bone defect healing, as fracture healing is frequently impaired in patients with diabetes. The calvarial bone defect was used to obtain insights into the function of osteoblasts and osteoclasts during bone healing without confounding factors such as the callus and cartilage scaffold that are necessary for fracture healing. Therefore, a subcritical defect was created in the calvaria and healing was assessed after 4 weeks using μCT . The largest defect area was found in diabetic *Cre-* mice (Fig. 5a). This area was increased by 17% as compared to their normoglycemic controls. *Cre+* control mice had the smallest defect

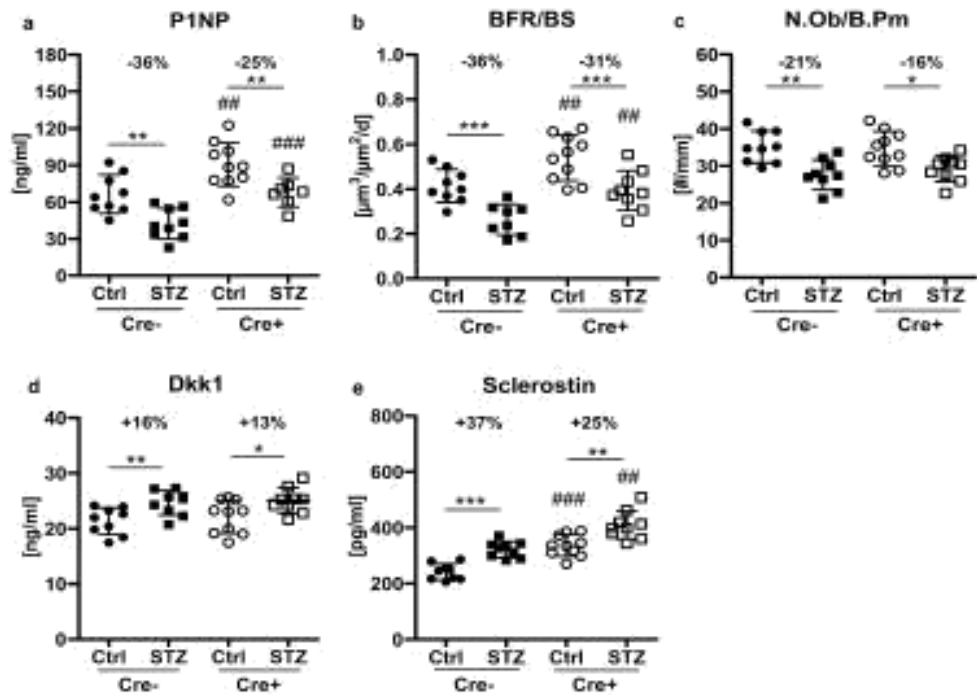


Figure 3. T1DM mediated loss of bone formation is not prevented by osteogenic Dkk1 deletion. (a) Procollagen type 1 amino-terminal propeptide (P1NP) serum level was measured by ELISA. (b) The bone formation rate per bone surface (BFR/BS) at the tibia was assessed histomorphometrically using calcein labels. (c) The number of osteoblasts per bone perimeter (N.Ob/B.p.m) was quantified after tartrate resistant acid phosphatase staining at the femur. Quantifications were performed with Osteomeasure software. (d) Dickkopf-1 (Dkk1) and (e) sclerostin serum levels measured with ELISAs. Each dot indicates an individual mouse. N = 9–10 per group. Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 vs. Ctrl; †*p* < 0.05, ††*p* < 0.01, †††*p* < 0.001 comparing Ctrl and STZ Cre- mice with their corresponding Cre+ littermates.

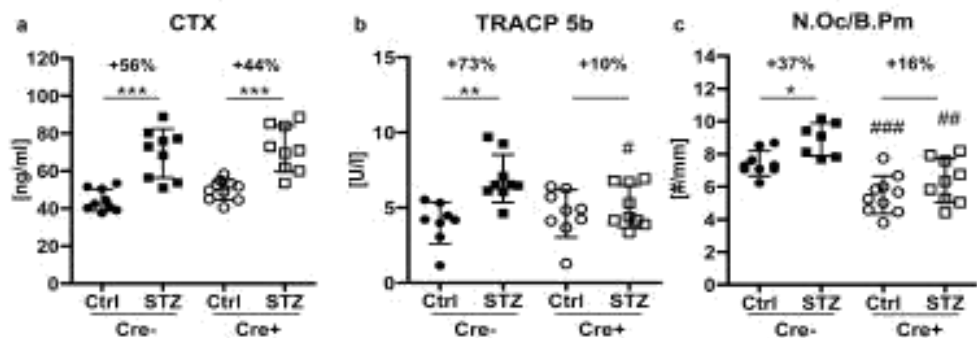


Figure 4. Lack of Dkk1 in osteoblasts and osteocytes ameliorates bone resorption in T1DM mice. (a) Serum carboxy-terminal collagen crosslinks (CTX) and (b) tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) measurements were performed using ELISA. (c) Trap staining was utilized to determine the number of osteoclasts per bone perimeter (N.Oc/B.Pm). Quantifications were performed with Osteomeasure software. Each dot indicates an individual mouse. N = 8–10 per group. Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test. **p* < 0.05, ***p* < 0.01 vs. Ctrl; †*p* < 0.05, ††*p* < 0.01 comparing Ctrl and STZ Cre- mice with their corresponding Cre+ littermates.

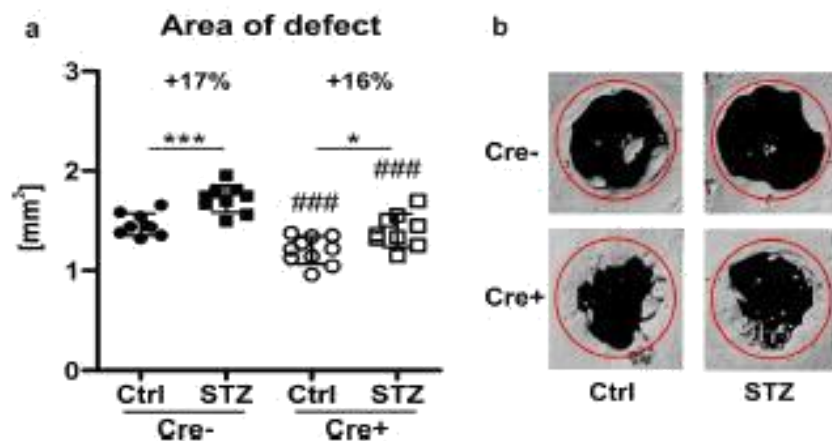


Figure 5. Bone defect healing in diabetic mice with an osteocyte-specific Dkk1-knockout. (a) Four weeks after a hole of 1.8 mm in diameter was drilled in parietal bone of male mice, the size of bone defects in mm² was determined by μ CT analyses. (b) Representative images of each group are depicted above. Each dot indicates an individual mouse. N = 8–10 per group. Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Ctrl, # $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ comparing Ctrl and STZ Cre⁻ mice with their corresponding Cre⁺ littermates.

area as seen in the representative μ CT images (Fig. 5b) and as quantified in Fig. 5a. However, diabetic Cre⁺ mice showed similarly impaired bone defect healing as diabetic Cre⁻ mice, with an increase in the defect area by 16%. In line with the low bone formation rates in diabetic Cre⁺ mice, it appears that defect healing cannot be rescued by deleting Dkk1 in osteogenic cells.

Discussion

T1DM affects roughly 1.24 million people in the US²⁷ and severely impairs bone strength by reducing bone formation and increasing bone resorption rates^{28,29}. However, mechanistic details are not fully elucidated, but are required to develop targeted therapies to prevent bone loss and associated fractures. Previous studies indicate that Dkk1 serum levels are increased in children and adolescents with T1DM and also in skeletal tissue of mice with T1DM^{30,31}. Thus, this paper aimed to clarify the bone protecting capacity of enhancing local Wnt signalling by knocking out Dkk1 in osteocytes and late osteoblasts.

Despite elevated levels of Dkk1 in the serum of T1DM mice, deletion of osteogenic Dkk1 did not affect weight development, fat distribution or glucose tolerance in diabetic mice. This is in line with our previous study in a high-fat diet model, in which lack of osteogenic Dkk1 also did not affect metabolic parameters³⁰. Thus, these data suggest that the local production of Dkk1 by mature osteoblasts and osteocytes does not act in an endocrine way to affect glucose metabolism.

In contrast to glucose metabolism, deletion of osteogenic Dkk1 partially prevented T1DM-induced trabecular bone loss and completely prevented cortical bone loss. T1DM is known to reduce bone quantity and furthermore suppress the Wnt/ β -catenin pathway^{18,19,28,31,32}. Our results are consistent with another study postulating differential effects of β -catenin overexpression in mice with T1DM on trabecular and cortical bone³¹. Similar to our study, Wnt activation only ameliorated cortical, but not trabecular bone loss induced by T1DM, an effect the authors proposed to be dependent on differential Wnt16 expression.

Elucidating the underlying mechanisms of preserved bone mass, our data aligns with various publications showing bone formation is reduced in diabetic conditions in rodents^{18,33,34}. Subsequently we investigated if osteogenic Dkk1 deletion, which is known to increase total bone volume and bone formation parameters^{23,35}, could counteract these STZ-induced changes. Surprisingly, diabetic mice with osteogenic Dkk1 deficiency were not protected from decreased bone formation parameters, indicating the inability of local Dkk1 deletion to protect osteoblasts from impaired differentiation³⁶ and increased apoptosis in T1DM³⁷. This implies the possibility of systemic Dkk1 and/or sclerostin in suppressing bone formation in T1DM despite low levels of local Dkk1. Both parameters were increased in diabetic mice regardless of genotype. Currently, it is unknown which cell types contribute to the increased systemic levels of Dkk1 in T1DM, even in mice with reduced Dkk1 expression in osteogenic cells. Adipocytes in the bone marrow may constitute a source of Dkk1, as they have been shown to express Dkk1 and their numbers increase in T1DM, thereby further altering bone homeostasis and providing a proinflammatory environment^{38,39}. As for sclerostin, levels were also elevated by osteogenic Dkk1-knockout under steady state conditions, leading to peak levels within the diabetic knockout group. In sum this supports current literature stating Dkk1 and sclerostin are elevated in type 1 diabetic individuals and further provides evidence for the intertwined compensatory circuits of the two Wnt inhibitors^{33,36,40}. Accordingly, an approach blocking Dkk1 as well as sclerostin might be the most effective strategy to counteract bone loss in cases of severe osteoporosis.

Our key finding revolves around the osteoblast-mediated inhibition of bone resorption in diabetic Cre+ mice, which seems to be the most essential contributor to bone protection. While various studies suggest low or normal bone resorption rates in individuals with T1DM^{18,41–45}, in the STZ mouse model, most studies report increased bone resorption rates^{46–49}. Further, Coe et al. showed attenuated bone loss in diabetic mice under alendronate treatment⁴⁸. The topic remains controversial, as they highlight the capacity of bisphosphonates to prevent osteoblast and osteocyte apoptosis rather than the suppression of osteoclasts^{50,51}. However, also increased osteoclast parameters were reported to be at least partly responsible for reduced bone mass in T1DM^{52,53}. Coherently with the latter, STZ induced an elevation in osteoclast activity and osteoclast numbers in Cre- mice, indicating a major role of increased bone resorption in diabetic bone loss. However, Cre+ mice were largely protected from this effect. Interestingly, serum CTX did not reflect the histological increase in osteoclast numbers, similar to our findings in healthy Dkk1-deficient mice, suggesting that Dkk1 rather affects osteoclast numbers than osteoclast activity^{23,54}. Inhibition of Dkk1 has already been associated with suppressed bone resorption. Antibody-mediated Dkk1 inhibition resulted in decreased osteoclast formation in mice with arthritis and multiple myeloma^{55,56}. This was mainly due to increased levels of the Wnt target osteoprotegerin in osteoblasts, which subsequently suppress osteoclastogenesis. Similar decreases of RANKL/OPG and osteoclastogenesis were found in Dkk1-deficient mice during steady state²³ and after Dkk1 antisense treatment in ovariectomized mice⁵⁷. Also, in this study, osteogenic Dkk1 deletion was sufficient to suppress the T1DM-induced increase in osteoclast numbers highlighting the importance of Dkk1 in regulating osteoclast rather than osteoblast function.

Finally, as T1DM is known to impair bone defect healing^{58,59}, we investigated the role of Dkk1 therein. Diabetes significantly impaired bone defect healing in both Dkk1-deficient and wildtype mice, suggesting that Dkk1 does not play a prominent role in bone defect healing. As bone defect healing relies on active bone formation, yet, osteogenic Dkk1 deficiency was not able to overcome the T1DM-induced suppression of bone formation at the spine or tibia, we believe that this explains why bone defect healing was not improved by lack of Dkk1. However, it should be noted that blocking Dkk1 with antibodies improved tibial and femoral fracture healing in mice due to activated β -catenin signalling^{60,61}. One major difference is that we created a bone defect in the calvarial bone, whereas the others investigated long bones, which underlie different ossification processes (intramembranous vs. endochondral ossification). Further studies are necessary to untangle these discrepant results.

Our study has limitations. This includes the model chosen to mimic T1DM. Although the low-dose treatment regimen with STZ is a common approach, the effect of STZ is enormously dependent on the dose, time and route of injection⁶². In addition, due to the fact that female mice do not develop overt T1DM after STZ injection, we only investigated the effects of T1DM in male mice. Finally, based on this study, it seems plausible that treatment of Dkk1 blocking strategies may improve bone mass in patients with T1DM. However, due to its lack of effect on enhancing bone formation under diabetic conditions, likely due to the compensatory increase in sclerostin, it may be more effective to block both Wnt inhibitors simultaneously.

In sum, this study shows that Dkk1 from Dmp1-expressing cells contributes to T1DM-induced bone loss mainly by increasing bone resorption. This mechanism appears to be more critical in cortical than trabecular bone, and more crucial for bone remodelling than calvarial bone defect healing.

Data availability

No large datasets were generated or analysed during this study. All other datasets analysed during this study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 16 August 2020; Accepted: 5 January 2021

Published online: 21 January 2021

References

1. Daniels, D. et al. Incidence of diabetes in youth in the united states. *JAMA* **297**, 2716–2724 (2007).
2. Green, A. et al. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. *Lancet* **355**, 9207 (2000).
3. Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S. & Michuda, A. W. Type 1 diabetes. *Lancet* **383**, e9–52 (2014).
4. Janghorbani, M., Van Dam, R. M., Willett, W. C. & Hu, F. B. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am. J. Epidemiol.* **166**, 495–505 (2007).
5. Fliszwort, E. R. et al. Complications after hip fracture surgery: Are they preventable?. *Exp. J. Trauma Emerg. Surg.* **44**, 573–580 (2018).
6. Hofbauer, L. C., Bruck, C. C., Singh, S. K. & Dobnig, H. Osteoporosis in patients with diabetes mellitus. *J. Bone Miner. Res.* **22**, 1317–1328 (2007).
7. Verreken, C. et al. Cortical bone size deficit in adult patients with type 1 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **102**, 2887–2895 (2015).
8. Abdalrhman, N. et al. Deficits in trabecular bone microarchitecture in young women with type 1 diabetes mellitus. *J. Bone Miner. Res.* **30**, 1386–1393 (2015).
9. Bouillon, R. et al. Influence of age, sex, and insulin on osteoblast function: osteoblast dysfunction in diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**, 1194–1202 (1995).
10. Nyman, J. S. et al. Preserving and restoring bone with continuous insulin infusion therapy in a mouse model of type 1 diabetes. *Bone Rep.* **7**, 1–8 (2017).
11. McCarthy, A. D., Uemura, T., Fichaserry, S. R. & Corbett, A. M. Advanced glycation endproducts interfere with integrin-mediated osteoblastic attachment to a type-1 collagen matrix. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 840–848 (2004).
12. Kame, S. et al. Advanced glycation end-products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone. *J. Bone Miner. Res.* **20**, 1647–1658 (2005).
13. Vaidyanath, D. et al. Influence of nonenzymatic glycation on biomechanical properties of cortical bone. *Bone* **28**, 195–201 (2001).
14. Portal-Núñez, S. et al. Alterations of the Wnt/ β -catenin pathway and its target genes for the N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein in bone from diabetic mice. *FEBS Lett.* **584**, 3095–3100 (2010).
15. Krishnan, V., Bryant, H. U. & MacDougald, C. A. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J. Clin. Invest.* **116**, 1202–1209 (2006).

16. McDonald, M. M. et al. Homozygous Dkk1 knockout mice exhibit high bone mass phenotype due to increased bone formation. *Calcif. Tissue Int.* **102**, 105–116 (2018).
17. Kemzik, S. A., Herrms, A. R., Swickels, L. M., Latterman, J. A. & Semls, A. G. Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus: prevalence and aspects of pathophysiology. *J. Endocrinol. Invest.* **23**, 295–303 (2000).
18. McCabe, L. R. Understanding the pathology and mechanisms of type 1 diabetic bone loss. *J. Cell Biochem.* **102**, 1343–1357 (2007).
19. Hie, M., Itaka, N., Otsuka, T. & Tsukamoto, I. Insulin-dependent diabetes mellitus decreases osteoblastogenesis associated with the inhibition of Wnt signaling through increased expression of *sost* and *Dkk1* and inhibition of Akt activation. *Int. J. Mol. Med.* **28**, 455–462 (2011).
20. Futema, M. F. et al. High sclerostin and dickkopf-1 (Dkk-1) serum levels in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **102**, 1174–1181 (2017).
21. Tsentidis, C. et al. Increased levels of Dickkopf-1 are indicative of Wnt/ β -catenin downregulation and lower osteoblast signaling in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus, contributing to lower bone mineral density. *Osteoporos. Int.* **28**, 945–953 (2017).
22. Butler, J. S. et al. The role of Dkk1 in bone mass regulation: Correlating serum Dkk1 expression with bone mineral density. *J. Orthop. Res.* **29**, 414–418 (2011).
23. Golditz, I. et al. Postnatal skeletal deletion of Dickkopf-1 increases bone formation and bone volume in male and female mice, despite increased sclerostin expression. *J. Bone Miner. Res.* **33**, 1698–1707 (2018).
24. Furman, B. L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **70**, 1–5 (2015).
25. Bouxsein, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J. Bone Miner. Res.* **25**, 1468–1486 (2010).
26. Schroeder, C. A., Rashband, W. S. & Elisei, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).
27. Luster, J. & Wietruszka, R. S. Diabetes mellitus type 1. *StatPearls*. 2020.
28. Lu, H., Kraus, D., Gerstenfeld, L. C. & Graves, D. T. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology* **144**, 346–352 (2003).
29. Reni, C., Mangialardi, G., Meloni, M. & Maddaloni, P. Diabetes stimulates osteoblastogenesis by acute-induced activation of transient receptor potential cation channels. *Sci. Rep.* **6**, 30639 (2016).
30. Golditz, I., Pickle, A. K., Hulbauer, L. C. & Rauner, M. Contributions of Dickkopf-1 to obesity-induced bone loss and marrow adiposity. *JRMR Plus* **4**, e10364 (2020).
31. Chen, S. et al. Differential effects of type 1 diabetes mellitus and subsequent osteoblastic β -catenin activation on trabecular and cortical bone in a mouse model. *Exp. Mol. Med.* **50**, 1–14 (2018).
32. Motyl, K. & McCabe, L. R. Streptozotocin, type 1 diabetes severity and bone. *Biol. Proced. Online* **11**, 296 (2009).
33. Fowlkes, J. L. et al. Runx-related transcription factor 2 (RUNX2) and RUNX2-related osteogenic genes are down-regulated throughout osteogenesis in type 1 diabetes mellitus. *Endocrinology* **149**, 1697–1704 (2008).
34. Thrallkill, K. M. et al. Bone formation is impaired in a model of type 1 diabetes. *Diabetes* **54**, 2875–2881 (2005).
35. Morrison, E. et al. Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J. Bone Miner. Res.* **21**, 934–945 (2006).
36. Kalatzoglou, E., Popescu, I., Bunn, R. C., Fowlkes, J. L. & Thrallkill, K. M. Effects of type 1 diabetes on osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. *Curr. Osteoporos. Rep.* **14**, 310–319 (2016).
37. Cox, L. M., Irwin, R., Lippner, D. & McCabe, L. R. The bone marrow microenvironment contributes to type 1 diabetes induced osteoblast death. *J. Cell Physiol.* **226**, 477–483 (2011).
38. Gustafson, B., Eltason, B. & Srinivas, U. Thiazolidinediones increase the wntless-type MMTV integration site family (WNT) inhibitor Dickkopf-1 in adipocytes: a link with osteogenesis. *Diabetologia* **53**, 536–540 (2010).
39. Holtz, S. & McCabe, L. R. Bone loss and increased bone adiposity in spontaneous and pharmacologically induced diabetic mice. *Endocrinology* **148**, 198–205 (2007).
40. Florin, M. et al. A bispecific antibody targeting sclerostin and DKK-1 promotes bone mass accrual and fracture repair. *Nat. Commun.* **7**, 11505 (2016).
41. Li, X. et al. Hyperglycaemia exacerbates choroidal neovascularisation in mice via the oxidative stress-induced activation of STAT3 signalling in RPE cells. *PLoS ONE* **7**, e47600 (2012).
42. Peng, L. et al. Low bone turnover and reduced angiogenesis in streptozotocin-induced osteoporotic mice. *Connect. Tissue Res.* **57**, 277–289 (2014).
43. Madsen, J. O. B., Jørgensen, N. R., Pocot, F. & Johannsen, J. Bone turnover markers in children and adolescents with type 1 diabetes: A systematic review. *Pediatr. Diabetes* **20**, 510–522 (2019).
44. Madsen, J. O. B. et al. Decreased markers of bone turnover in children and adolescents with type 1 diabetes. *Pediatr. Diabetes* **21**, 505–514 (2020).
45. Napoli, N. et al. Serum sclerostin and bone turnover in latent autoimmune diabetes in adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **103**, 1921–1928 (2018).
46. Zhong, H. X., Chen, D. L., Zu, Y. X., Wang, E. Z. & Qi, S. S. Chondroitin sulfate prevents STZ-induced diabetic osteoporosis through decreasing blood glucose, antioxidant stress, anti-inflammation and OPG/RANKL expression regulation. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 5303 (2020).
47. Ye, Y. et al. Effect of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors on bone metabolism and fracture risk. *Front. Pharmacol.* **9**, 1517 (2019).
48. Gao, C. J. et al. Paerarin alleviates streptozotocin (STZ)-induced osteoporosis in rats through suppressing inflammation and apoptosis via HDAC1/HDAC3 signaling. *Biomed. Pharmacother.* **115**, 108570 (2019).
49. Tsentidis, C. et al. Higher levels of α -RANKL and osteoprotegerin in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus may indicate increased osteoclast signaling and predisposition to lower bone mass: A multivariate cross-sectional analysis. *Osteoporos. Int.* **27**, 1631–1643 (2016).
50. Cox, L. M., Tekalar, S. A., Shu, Y., Raumann, M. J. & McCabe, L. R. Bisphosphonate treatment of type 1 diabetic mice prevents early bone loss but accentuates suppression of bone formation. *J. Cell Physiol.* **290**, 1944–1953 (2015).
51. Rodan, L. I. et al. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J. Clin. Invest.* **104**, 1363–1374 (1999).
52. Thrallkill, K. M. et al. SGLT2 inhibitor therapy improves blood glucose but does not prevent diabetic bone disease in diabetic DBA/2J male mice. *Bone* **82**, 101–107 (2016).
53. Catalano, D. L. et al. Augmented LPS responsiveness in type 1 diabetes-derived osteoclasts. *J. Cell Physiol.* **228**, 349–361 (2013).
54. Goss, P. et al. Loss of Dkk-1 in osteocytes mitigates alveolar bone loss in mice with periodontitis. *Front. Immunol.* **10**, 2924 (2019).
55. Dharia, D. et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat. Med.* **13**, 156–163 (2007).
56. Yacoby, S. et al. Antibody-based inhibition of DKK1 suppresses tumor-induced bone resorption and multiple myeloma growth in vivo. *Blood* **109**, 2106–2111 (2007).
57. Wang, F. S. et al. Knocking down dickkopf-1 alleviates estrogen deficiency induction of bone loss. A histomorphological study in ovariectomized rats. *Bone* **40**, 485–492 (2007).
58. Santana, R. B. et al. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes* **52**, 1502–1510 (2003).

59. Shyng, Y. C., Devlin, H. & Sloan, P. The effect of streptozotocin-induced experimental diabetes mellitus on calvarial defect healing and bone turnover in the rat. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **30**, 70–74 (2001).
60. In, H. et al. Anti-DRK1 antibody promotes bone fracture healing through activation of β -catenin signaling. *Bone* **71**, 63–75 (2015).
61. Fu, Y. & Hurley, M. M. Role of fibroblast growth factor 2 and Wnt signaling in anabolic effects of parathyroid hormone on bone formation. *J. Cell. Physiol.* **227**, 3539–3545 (2012).

Acknowledgements

This project has received funding from the Elisabeth Bonhoff foundation to MR. PG, MR, JSH and LCH received funding from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation)—TRR67. JSH was supported by a MeDDrive and the Women's habilitation program of the Medical Faculty of the TU Dresden.

Author contributions

N.H., J.C., C.D., P.G., I.S.H., S.T. contributed to experimental procedures, data collection, and data analysis. J.C., P.G., L.C.H., and M.R. conceived the study, designed experiments, and interpreted data. N.H., J.C., and M.R. drafted the manuscript. All authors read the manuscript and provided critical comments.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Competing interests


The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.R.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

Conclusão Geral

Conclusão Geral

Podemos concluir que a via Wnt exerce papel no reparo ósseo. A deleção de Dkk-1, um antagonista da via Wnt, em animais submetidos ao modelo de defeito de calvária induziu reparo do tecido ósseo. Entretanto foi possível observar que o Dkk-1 derivado de osteócitos foi mais importante neste processo por estimular a remodelação óssea bem como o aumento no número e função de osteoblastos. Durante a diabetes do tipo 1, a deleção de Dkk-1 osteocítico contribui para a perda óssea induzida aumentando o processo de reabsorção especialmente no osso cortical. Por outro lado, Dkk-1 derivado de osteócitos não influencia o desenvolvimento de T1DM, nem medeia o reparo óssea após defeito de calvária, durante a T1DM.

Referências

ARAÚJO MG, SILVA CO, MISAWA M, SUKEKAVA F. Alveolar socket healing: what can we learn? *Periodontol* 2000. 2015 Jun;68(1):122-34.

BARON R, KNEISSEL M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nature Medicine*, 2013;19(2):179–92.

BONEWALD LF. The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2011;26(2):229–38.

CAPULLI M, PAONE R, RUCCI N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2014;561:3–12.

CLARKE B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008 Nov;3 Suppl 3(Suppl 3):S131-9.

CROCKETT JC, MELLIS DJ, SCOTT DI, HELFRICH MH. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporosis International*. 2011;22(1):1–20.

DABELEA D, BELL RA, D'AGOSTINO RB JR, IMPERATORE G, JOHANSEN JM, LINDER B, LIU LL, LOOTS B, MARCOVINA S, MAYER-DAVIS EJ, PETTITT DJ, WAITZFELDER B. Incidence of diabetes in youth in the united states. *JAMA*. 2007;297:2716–24.

DATTA HK, NG WF, WALKER JA, TUCK SP, VARANASI SS. The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology*. 2008;61(5):577–87.

DIARRA D, STOLINA M, POLZER K, ZWERINA J, OMINSKY MS, DWYER D, et al., Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling, *Nat. Med*. 2007;13:156–63.

FLIKWEERT ER, WENDT KW, DIERCKS RL, IZAKS GJ, LANDSHEER D, STEVENS M, REININGA IHF. Complications after hip fracture surgery: Are they preventable? *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2018;44:573–80.

GOMES PS, FERNANDES MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Laboratory Animals*. 2011;45(1):14–24.

GREEN A, et al. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. *Lancet*. 2000;355:9207.

GRUBER J, YEE Z, TOLWINSKI NS. Developmental Drift and the Role of Wnt Signaling in Aging. *Cancers (Basel)*. 2016 Aug 2;8(8):73.

HUANG Y, LIU L, LIU A. Dickkopf-1: Current knowledge and related diseases. *Life Sciences*. 2018;209:249–54.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas, 9th edn. Brussels, Belgium: 2019. Available at <<http://www.diabetesatlas.org>>.

KE HZ, RICHARDS WG, LI X, OMINSKY MS. Sclerostin and Dickkopf-1 as therapeutic targets in bone diseases, *Endocr Rev.* 2012;33: 747–83.

KRISHNAN V, BRYANT HU, MACDOUGALD OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest.* 2006;116:1202–9.

MAAHS DM, WEST NA, LAWRENCE JM, MAYER -DAVIS EJ. Epidemiology of type 1 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010 Sep;39(3):481-97.

MAJIDINIA M, SADEGHPOUR A, YOUSEFI B. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. *Journal of Cellular Physiology,* 2017;233(4):2937–48.

MCCARTHY AD, UEMURA T, ETCHEVERRY SB, CORTIZO AM. Advanced glycation endproducts interfere with integrin-mediated osteoblastic attachment to a type-I collagen matrix. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:840–8.

MORVAN F, BOULUKOS K, CLEMENT-LACROIX P, ROMAN RS, SUC-ROYER I, VAYSSIERE B, et al., Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass, *J. Bone Miner. Res.* 2006;21:934–45

ORYAN A, MONAZZAH S, BIGHAM-SADEGH A. Bone injury and fracture healing biology. *Biomed Environ Sci.* 2015 Jan;28(1):57-71.

PHAN TCA, XU J, ZHENG MH. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histology and Histopathology.* 2004;19(4):1325–44.

SANTANA R, XU L, CHASE H, AMAR S, GRAVES D, TRACKMAN P. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes. *Diabetes* 2003;52:1502-10.

SHI GX, MAO WW, ZHENG XF, JIANG LS. The role of R-spondins and their receptors in bone metabolism. *Prog Biophys Mol Biol.* 2016 Nov;122(2):93-100.

SHYNG Y, DEVLIN H, SLOAN P. The effect of streptozotocin-induced experimental diabetes mellitus on calvarial defect healing and bone turnover in the rat. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002;30:70-4

SIMS NA, GOOI JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 2008;19(5):444–51.

TSENTIDIS C, GOURGIOTIS D, KOSSIVA L, MARMARINOS A, DOULGERAKI A, KARAVANAKI K. Increased levels of Dickkopf-1 are indicative of Wnt/ β -catenin downregulation and lower osteoblast signaling in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus, contributing to lower bone mineral density. *Osteoporos Int.* 2017;28:945–53.

VAJGEL A, MARDAS N, FARIAS BC, PETRIE A, CIMÕES R, DONOS N. A systematic review on the critical size defect model. *Clinical Oral Implants Research.* 2013;25(8):879–93.

VERROKEN C, PIETERS W, BEDDELEEM L, GOEMAERE S, ZMIERCZAK HG, SHADID S, KAUFMAN JM, LAPAUW B. Cortical bone size deficit in adult patients with type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;102:2887–95.

Anexo

Anexo A - Certificado de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (UFC)



**UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ**

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS DO REPARO ÓSSEO EM DEFEITO ÓSSEO SUBCRÍTICO NA CALVÁRIA DE CAMUNDONGOS DIABÉTICOS: PARTICIPAÇÃO DA VIA WNT", protocolada sob o CEUA nº 6010060218 (10 000144), sob a responsabilidade de **Renata Ferreira de Carvalho Leitão** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 27/03/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE MORPHOFUNCTIONAL ASPECTS OF BONE REPAIR IN SUBCRITICAL-SIZED CALVARIA DEFECT IN DIABETIC MICE: ROLE OF WNT PATHWAY", utilizing 60 Heterogenics mice (60 males), protocol number CEUA 6010060218 (10 000144), under the responsibility of **Renata Ferreira de Carvalho Leitão** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 03/27/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [03/2018](#) a [03/2021](#)

Área: [Departamento de Morfologia](#)

Origem: [Biotério Central da UFC](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

Idade: [8 a 10 semanas](#)

N: [60](#)

Linhagem: [Swiss](#)

Peso: [20 a 25 g](#)

Local do experimento: Os experimentos serão conduzidos com camundongos Swiss machos, com idade de 8-10 semanas de vida, provenientes do biotério central da UFC e mantidos no Núcleo de Estudos e Pesquisa em Processamento de Imagem (NEMPI) em gaiolas de polipropileno recebendo água e comida ad libitum, em sala climatizada, com exaustão de gases e redução de ruídos. Os camundongos TH, os quais são geneticamente modificados para diabetes tipo 2, serão disponibilizados pelo Bone Lab em colaboração com a Profa Martina Rauner da Universidade Técnica de Dresden na Alemanha, durante realização de doutorado sanduíche

Fortaleza, 27 de março de 2018

Prof. Dr. Alexandre Havt Blindá

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Virginia Cláudia Carneiro Girão

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará