KELLY CRISTINA STÉFANI

**Relação do polimorfismo do receptor P2X7 com a densidade mineral
óssea: estudo em pacientes idosos com fraturas do tornozelo**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ortopedia e Traumatologia

Orientador: Prof. Dr. Túlio Diniz Fernandes

**SÃO PAULO
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Stéfani, Kelly Cristina

Relação do polimorfismo do receptor P2X7 com a
densidade mineral óssea : estudo em pacientes idosos
com fraturas do tornozelo / Kelly Cristina Stéfani.

-- São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Ortopedia e Traumatologia.

Orientador: Túlio Diniz Fernandes.

Descritores: 1.Polimorfismo genético 2.Fraturas
do tornozelo 3.Fraturas por osteoporose
4.Osteoporose 5.Agonistas do receptor purinérgico
P2X 6.Antagonistas do receptor purinérgico P2X

USF/FM/DBD-249/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

EPÍGRAFE

“A experiência é algo que você não pode obter em troca de nada”.

Oscar Wilde.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais Maurício e Irene,

“Sou apenas o reflexo do amor de vocês”.

Aos meus queridos irmãos Thaís e Maurício,

amigos e companheiros de todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Professor Doutor Gilberto Luis Camanho, Professor Doutor Olavo Pires de Camargo e Professor Doutor Tarcísio Eloy Pessoa de Barros Filho; Professores Titulares do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela possibilidade a mim oferecida de aprimorar minha formação acadêmica.

Professor Doutor Túlio Diniz Fernandes, Diretor do Grupo de Tornozelo e Pé do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, meu especial agradecimento pela sua importante contribuição a minha formação pessoal e profissional através de seus exemplos de academicismo, caráter, liderança, seriedade, dedicação de toda uma vida à especialidade e que me acolheu na Instituição para esse desafio, me estimulando em busca da excelência em todos os aspectos da minha atividade profissional através de críticas diretas e objetivas.

Professor Doutor Roberto Dantas Queiroz, Diretor do Departamento de Ortopedia e Traumatologia do Hospital do Servidor Público Estadual pelos ensinamentos na convivência profissional e pela amizade.

Aos meus grandes amigos Dr. Abdalla Scaf, Dr. César de César Neto, Dr. Rogério de Carvalho Teixeira pelo incentivo em todos os momentos e pela amizade incondicional.

Aos meus amigos do grupo do pé, os médicos: Dr. Gabriel Ferraz Ferreira, Dr. Vinícius Quadros Borges, Dr. Aldo Barbachan, Dr. Leonardo Vinícius de Matos Moraes e o fisioterapeuta Pedro de Oliveira Rizzi pela dedicação e colaboração durante a execução desse projeto e pela amizade fraterna.

Ao Professor Doutor Ciro Dresch Martinhago e a bióloga Kalina Renata Naomi Endo, pela análise genética e por acreditar nesse projeto, sem os quais o trabalho não seria possível.

Às secretárias Rosana M. Costa e Tânia M. Borges da pós-graduação de Ortopedia e Traumatologia e à Leide de Souza Salomão e Maria Cristina S. Emerick da Comissão Científica Centro de Pesquisas, Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela presteza e carinho.

Às bibliotecárias Andressa da Costa Santos Souza e Camila Gomes da Rocha Agostini do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela dedicação ao trabalho e carinho.

À tradutora e amiga Ângela Christine Charity que sempre me incentivou em todos os momentos.

Aos residentes do Departamento de Ortopedia e Traumatologia do Hospital do Servidor Público Estadual, verdadeiros motores da Instituição, meu agradecimento pelo permanente estímulo para evolução científica, didática e assistencial de todos nós.

Aos funcionários e pacientes do Departamento de Ortopedia e Traumatologia do Hospital do Servidor Público Estadual, meu reconhecimento pela enorme contribuição para a realização desse trabalho.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*. Sociedade Brasileira de Anatomia. Terminologia anatômica. São Paulo: Ed. Manole Ltda.; 2001.

Utilizaram-se a terminologia e as definições estatísticas conforme o Guia para expressão da incerteza de medição, Segunda Edição Brasileira do Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (BIPM, IEC, IFCC, ISSO, IUPAC, IUPAP, OIML, 1983). Edição Revisada (Agosto de 1998) – Rio de Janeiro: ABNT, INMETRO, SBM, 1998.

SUMÁRIO

	Abreviaturas, símbolos e siglas	
	Lista de quadros e figuras	
	Lista de tabelas	
	Resumo	
	Abstract	
1	INTRODUÇÃO.....	2
2	OBJETIVO.....	13
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
4	MÉTODOS.....	31
4.1	Obtenção do DNA	34
4.2	Extração do DNA.....	35
4.3	Genotipagem.....	35
4.3.1	Desenho dos primers.....	36
4.3.2	Mini sequenciamento multiplex (Snapshot).....	39
4.4	Análise estatística dos resultados.....	42
4.5	Análise da amostra.....	42
5	RESULTADOS.....	45
6	DISCUSSÃO.....	53
7	CONCLUSÃO.....	70
8	ANEXOS.....	72
9	REFERÊNCIAS.....	83

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

A	adenina
AMPc	monofosfato de adenosina cíclico (do inglês, <i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
ATP	trifosfato adenosina (do inglês, <i>adenosine triphosphate</i>)
BzATP	benzoil trifosfato de adenosina (do inglês, <i>adenosine triphosphate</i>)
C	citossina
CAPPESQ	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
dbSNP	banco de dados de polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês, <i>data base single nucleotide polymorphism</i>)
DHL	desidrogenase láctica
DKK1	proteína relacionada à DKK1 (do inglês, <i>dickkopf-related protein1</i>)
DMO	densitometria mineral óssea
DMP-1	matriz dentinária de fosfoproteína ácida (do inglês, <i>dentin matrix acidic phosphoprotein</i>)
DNA	ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DP	desvio padrão
DXA	aparelho com dupla emissão de raios X (<i>do inglês dual energy X ray</i>)
EUA	Estados Unidos da América
FGF23	fator de crescimento fibroblástico 23 (do inglês, <i>fibroblast growth factor 23</i>)
Frizzled	da família das G proteínas acopladas que são receptoras do sinalizador WTN
G	guanina

GOF	ganho de função (do inglês, <i>gain function</i>)
HSPE	Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo
IL 1 β	interleucina1 beta
IMC	índice de massa corpórea
IOF	International Osteoporosis Foundation
IOT	Instituto de Ortopedia e Traumatologia
KO	tipo modificado (do inglês, knockout)
L2	segunda vertebra lombar
L4	quarta vertebra lombar
LOF	perda de função (do inglês, <i>loss function</i>)
LPS	lipopolissacarídeo bacteriano
LRP5	proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (do inglês, <i>low density lipoprotein related protein 5</i>)
LRP6	proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (do inglês, <i>low density lipoprotein related protein 6</i>)
MAF	frequência alélica menor (do inglês, minor allele frequency)
MEPE	matriz extracelular de glicofosfoproteína (do inglês, <i>matrix extracellular phosphoglycoprotein</i>)
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro (do inglês, <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MTX	maitotoxina
NCBI	Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (do inglês, <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NF-kB	fator nuclear de cadeia-leve-kappa-potenciador de células B ativadas (do inglês, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

NHGRI	Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano (do inglês, <i>National Human Genome Research Institute</i>)
NO	óxido nítrico (do inglês, <i>nitric oxide</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPG	osteoprotegerina (do inglês, <i>osteoprotegerin</i>)
P2X	receptor purinérgico ligante fechado
P2Y	receptor purinérgico G proteína acoplada
PCR	reação de cadeia de polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i>)
PGE2	prostaglandina E2
pH	percentual hidrogeniônico
PHA	fito-hemaglutinina (do inglês, <i>phytohaemagglutinin</i>)
PHEX	endopeptidase neutra reguladora de fosfato (do inglês, <i>phosphatase regulating neutral endopeptidase</i>)
PTH	paratormonio
RANK	receptor ativador do NF-κB (do inglês, <i>receptor activator of nuclear factor kappa-B</i>)
RANKL	receptor ativador do NF-κB ligante (do inglês, <i>receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>)
Receptor P1	receptor purinérgico 1
Receptor P2	receptor purinérgico 2
RNA	ácido ribonucleico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i>)
Scl	esclerostina (do inglês, <i>sclerostin</i>)
SFRP1	proetina secretada relacionada ao receptor Frizzled 1 (do inglês, <i>secreted frizzled related protein 1</i>)

SNP	polimorfismo de nucleotídeo simples (do inglês, <i>single nucleotide polymorphism</i>)
T	tiamnina
TNF	fator de necrose tumoral (do inglês, <i>tumoral necrosis factor</i>)
TNF1 β	fator de necrose tumoral 1 beta (do inglês, <i>tumor necrosis factor 1 beta</i>)
TNF α	fator de necrose tumoral alfa (do inglês, <i>tumor necrosis fator alfa</i>)
Wg	gene da drosófila sem asas (do inglês, <i>wingless</i>)
WT	tipo selvagem (do inglês, <i>wild type</i>)
WTN	integração relacionado ao Wg (do inglês, <i>wingless-related integration</i>)

LISTA DE QUADROS E FIGURAS

Quadro 1 – Critérios de exclusão para osteoporose secundária.....	32
Quadro 2 – Exames solicitados para investigação de osteoporose secundária.....	33
Quadro 3 – Primers utilizados no sequenciamento pelo método de Sanger.....	37
Quadro 4 – Primers utilizados no sequenciamento pela reação de Long Range PC.....	38
Quadro 5 – Primers utilizados no minisequenciamento pelo SNaPshot.....	40
Quadro 6 – Visão geral dos 15 SNPs não sinônimos utilizados no estudo.....	41
Quadro 7 – Global MAF para os SNPs variantes.....	63
Figura 1 – Visão geral dos 15 SNPs não sinônimos utilizados no estudo.....	11
Figura 2 – Processo de remodelação óssea.....	58

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 –	Perfil epidemiológico dos grupos estudados.....	45
Tabela 2 –	Visão geral das variantes dos SNPs de forma agrupada.....	46
Tabela 3 –	Visão geral das variantes dos SNPs de forma individual.....	50
Tabela 4 –	Visão geral das variantes por SNP.....	51
Tabela 5 –	Visão geral das variantes dos SNPs e comparação entre os Grupo Controle e o Grupo de Estudo, mostrando sua divisão na variante homozigoto mutado.....	51

RESUMO

Stéfani KC. *Relação do polimorfismo do receptor P2X7 com a densidade mineral óssea: estudo em pacientes idosos com fraturas do tornozelo* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

O objetivo deste estudo foi determinar se a variação genética no gene do receptor P2X7 está associada com a diminuição da densidade mineral óssea e o risco de osteoporose em pacientes acima de 50 anos de idade com fratura de tornozelo. Foi realizado um estudo diagnóstico Nível I. Os pacientes acima de 50 anos com fratura de tornozelo submetidos ao tratamento cirúrgico foram divididos em dois grupos após o resultado da densitometria óssea: o grupo de estudo com osteopenia (T score entre -1 e -2,5) ou osteoporose (T score $\leq$ -2,5) e o grupo controle com valores de normalidade (com T score $\geq$ -1). Os critérios de exclusão foram alterações que levam à osteoporose secundária. Os pacientes foram genotipados para 15 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) não sinônimos dentro do receptor P2X7 (numerados de 1 à 15) obtidos a partir da saliva. Avaliamos 121 pacientes com fratura de tornozelo, sendo 56 do grupo controle e 65 do grupo de estudo. Todos os pacientes eram sedentários, não utilizavam nenhum medicamento para tratamento de osteoporose, não eram tabagistas e sofreram trauma de baixa energia. A análise agrupada das alterações dos SNPs demonstrou que se o gene tem 3 ou mais variantes de SNPs (36,4% dos 121 pacientes), dos 15 possíveis, ele está alterado com repercussão clínica relacionada à perda ou ganho de função do gene. E ao analisar as alterações dos SNPs, individualmente, os resultados sugerem que: os SNPs 1,4,14 e 15 são variantes de perda de função; SNPs 5 e 10 são descritos como variantes de perda de função; entretanto, não têm influência na nossa população; SNPs 11 e 13 são variantes de perda de função e não ganho de função, como descrito na literatura; e SNP 12 foi associado à perda de função em nossa população. Podemos ressaltar como limitações do nosso estudo o fato de nos concentrarmos principalmente em polimorfismos não sinônimos que não cobrem toda a variação genética em P2X7 e no número pequeno de participantes quando comparados com a literatura mundial. Em contrapartida, um dos pontos fortes do nosso estudo é ser o primeiro a avaliar o P2X7 na população brasileira, que é bastante heterogênea do ponto de vista genético devido à nossa miscigenação, quando comparado com os outros estudos que avaliaram a população do norte da Europa, que é mais homogênea geneticamente. Em conclusão, o polimorfismo do SNP 12 em P2X7 está associado à densidade mineral óssea e risco de fraturas de tornozelo.

Descritores: Polimorfismo genético; Fraturas do tornozelo; Fraturas por osteoporose; Osteoporose; Agonistas do receptor purinérgico P2X; Antagonistas do receptor Purinérgico P2X.

ABSTRACT

Stéfani KC. *Relationship between polymorphism of receptor P2X7 with bone mineral density: a study on elderly patients with ankle fractures* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

The purpose of this study was to determine whether a genetic variation in the P2X7 receptor gene is associated with reduced bone mineral density and the risk of osteoporosis in patients over 50 years of age with ankle fractures. A Level-1 diagnostic study was conducted. Patients over 50 years of age with ankle fractures who had undergone surgical treatment were divided into two groups following the result of a bone densitometry: a study group with osteopenia (bone mineral density T score between -1 and -2.5) or osteoporosis (bone mineral density T score $\leq$ -2.5) and the control group with normal values (bone mineral density T score $\geq$ -1). Exclusion criteria were alterations that led to secondary osteoporosis. Patients were genotyped for 15 nonsynonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the P2X7 receptor (numbered from 1 to 15) obtained from saliva. We evaluated 121 patients with ankle fractures, 56 being from the control group, and 65 from the study group. All patients were sedentary, did not take any medication for the treatment of osteoporosis, did not smoke, and had suffered a low-impact trauma. The grouped assessment of the SNP alterations showed that if a gene has three or more SNP variants (36.4% of the 121 patients), out of the 15 possibilities, it is altered with clinical repercussions related to the loss or gain of the function of the gene. In evaluating the SNP alterations individually, the results suggest that: SNPs 1,4,14, and 15 are loss of function variants; SNPs 5 and 10 are described as loss of function variants; however, they have no influence on our study population; SNPs 11 and 13 are loss of function variants and not gain of function function as is described in the literature; and SNP 12 was associated with a loss of function in our population. In conclusion, we showed that the functional polymorphisms in P2X7 are associated with Bone Mineral Density and the risk of ankle fractures. As limitations to our study, we can point out the fact that we focused mainly on nonsynonymous polymorphisms, which do not cover all the genetic variations in P2X7, and the small number of participants when compared to the world literature. On the other hand, a strength of our study is that it was the first to assess P2X7 in the Brazilian population, which is quite heterogeneous from the genetic point of view due to our miscegenation, as compared to other studies that evaluated the population of northern Europe, which is genetically more homogeneous. In conclusion, the SNP12 polymorphism in P2X7 is associated with Bone Mineral Density and the risk of ankle fractures.

Descriptors: Polymorphism, Genetic; Ankle fractures; Osteoporotic fractures; Osteoporosis; Purinergic P2X receptor agonists; Purinergic P2X receptor antagonists.

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As fraturas do tornozelo estão entre as lesões mais comuns tratadas por cirurgias ortopédicas. Inicialmente, essas fraturas estavam associadas a pacientes jovens com traumas de alta energia em atividades esportivas, acidentes motociclísticos e/ou automobilísticos (**Rockwood et al., 2013**).

Desde o início dos anos 2.000 os artigos epidemiológicos relatam o aumento da incidência da fratura de tornozelo na população, observando-se a associação dessa fratura em pacientes acima de 50 anos decorrente de traumas de baixa energia, podendo, portanto, estarem associadas com diminuição da densidade mineral óssea.

Kannus et al. (1996) relatam a epidemiologia da incidência de fraturas de tornozelo em os idosos na Finlândia entre 1970 e 1994. Definem a avaliação da fratura como osteoporótica somente se ocorresse como resultado de trauma mínimo em uma pessoa 60 anos de idade ou mais. Ao avaliarem os dados observam que o número de fraturas osteoporóticas do tornozelo na Finlândia está aumentando a uma taxa que não pode ser explicado simplesmente por alterações demográficas. E a partir desses resultados iniciam um projeto de medidas preventivas vigorosas para controlar o aumento da incidência deste tipo de fratura, assim como tentar entender porque a epidemiologia dessas fraturas está mudando.

Court-Brown et al. (1998) descrevem que epidemiologia das fraturas do tornozelo está mudando. O aumento da longevidade resultou na maior incidência específica por idade de fraturas de tornozelo em mulheres entre 75 e 84 anos de idade.

Desde o início dos anos 2.000 os artigos epidemiológicos relatam o aumento da incidência da fratura de tornozelo na população, observando-se a associação dessa fratura

em pacientes acima de 50 anos decorrente de traumas de baixa energia, podendo, portanto, estarem associadas com diminuição da densidade mineral óssea.

Siris et al. (2001) relatam que a osteoporose é uma alteração que muitas vezes se manifesta inicialmente com uma fratura, a DMO é considerada como um exame altamente preditivo do risco de fratura. Um estudo demonstrou os resultados de DMO em 200.160 mulheres pós-menopáusicas com idade igual ou superior a 50 anos sem diagnóstico prévio de osteoporose, derivadas de 4236 atendimentos ambulatoriais de cuidados primários em 34 estados dos EUA. Nessa avaliação quase metade dessa população apresentou DMO com alterações, incluindo 7% com osteoporose. Os autores sugerem que devido aos custos econômicos e sociais das fraturas osteoporóticas, as estratégias para identificar e gerenciar a osteoporose nas unidades de atendimento de cuidados primários precisam ser estabelecidas e implementadas.

Greenfield e Eastell (2001) relatam a comparação de um grupo de estudo 103 mulheres entre 50 e 80 anos (média 63,2) portadoras de fratura no tornozelo com um grupo controle 375 mulheres entre 50-86 anos (média 64,5) sem fratura de tornozelo, e observaram que 27 mulheres (7%) do grupo controle e 10 mulheres (10%) do grupo de estudo tiveram fraturas vertebrais prevalentes. Desta forma, as fraturas do tornozelo foram frequentemente observadas em mulheres pós-menopáusicas e poderiam estar correlacionadas com fraturas osteoporóticas.

Kannus et al. (2002) realizam um estudo epidemiológico e constataam o aumento da incidência das fraturas de tornozelo em pacientes com idade igual ou superior a 60 anos de idade sugerindo assim a associação dessa fratura com os traumas de baixa energia. Nele foi demonstrando que o número total dessas fraturas aumentou de 369 em 1970 para 1545 em 2000, um aumento de 319%, e que a incidência bruta aumentou de 57 para 150, um aumento de 163%. Além disso, a incidência ajustada por idade dessas fraturas também

aumentou em ambos os gêneros: as mulheres (de 66 em 1970 para 174 em 2000, aumento de 164%) e homens (de 38 em 1970 para 114 em 2000, aumento de 200%). Ao aplicar o modelo de regressão foi indicado que se essa tendência continuar haverá cerca de três vezes mais fraturas de tornozelo com trauma de baixa energia na Finlândia no ano de 2030 do que em 2000.

O aumento da incidência das fraturas de tornozelo decorrentes de trauma de baixa energia levou a uma hipótese que começou a ser testada, a de que essas fraturas poderiam estar correlacionadas com a diminuição da densidade mineral óssea.

Hasselman et al. (2003) realizam um estudo coorte associando a fratura do tornozelo à densidade mineral óssea acompanhou 9.704 mulheres idosas, não negras, matriculadas no Estudo Multicêntrico de Fraturas Osteoporóticas, por uma média de 10,2 anos. Durante esse período, houve uma incidência de 301 mulheres que tiveram fratura no pé e outras 291 mulheres que tiveram fraturas no tornozelo. As mulheres que sofreram uma fratura de tornozelo eram um pouco mais jovens do que as mulheres que não sofreram uma fratura (71,0 em comparação com 71,7 anos), e apresentaram maior índice de massa corporal (27,6 em comparação com 26,5). Os autores demonstraram que as fraturas dos pés eram fraturas osteoporóticas típicas, enquanto as fraturas do tornozelo estavam relacionadas com IMC elevado e não necessariamente com diminuição da densidade mineral óssea.

Johnell e Kanis (2006) relatam que a osteoporose gera um impacto social e econômico significativo já que uma mulher em duas, e um homem em cinco, acima de 50 anos de idade, irão sofrer pelo menos uma fratura devido à osteoporose durante sua vida. Em todo o mundo estimou-se cerca de nove milhões de fraturas osteoporóticas, sendo 25.00 fraturas por dia e uma a cada três segundos.

Compston (2010) relatam que as fraturas osteoporóticas são uma das principais causas morbidade e mortalidade em pessoas idosas e impor um enorme ônus econômico para os serviços de saúde. Relacionado a idade perda óssea é um fenômeno universal e está intimamente relacionado com a deficiência de estrogênio, tanto em homem e mulher e redução da atividade.

Os trabalhos a partir de 2010 referem que a fratura de tornozelo no idoso parece ser a fratura mais precoce indicativa de osteoporose, precedendo as fraturas de punho, quadril e coluna, todavia isso ainda não foi comprovado. Em busca de comprovar que a fratura de tornozelo é indicativa de osteoporose, foram identificadas algumas características em comum desses pacientes.

Urruela e Egol (2011) referem que a maioria dos pacientes com fratura de tornozelo decorrente de trauma de baixa energia são mulheres na pós-menopausa. Além disso, esses pacientes apresentaram como fatores de risco: obesidade com propensão à queda, tabagismo, polifarmácia, atividades físicas inadequadas (excesso ou falta) e diabetes.

Armstrong et al. (2012) avaliaram os dados coletados prospectivamente de uma grande coorte para examinar o papel desses fatores no risco de fraturas de tornozelo, punho e quadril incidentes em mulheres na pós-menopausa. 1.155.304 participantes pós-menopausa com uma idade média de 56 anos. As informações sobre estilo de vida, fatores antropométricos e reprodutivos no recrutamento em 1996-2001 também foram avaliadas. Durante acompanhamento de uma média de 8,3 anos por mulher, 6807 mulheres tiveram uma fratura de tornozelo incidente, 9733 uma fratura de punho incidente e 5267 uma fratura de quadril incidente. Os riscos absolutos cumulativos de 50 a 84 anos por 100 mulheres foram 2,5 (IC95% 2,2-2,8) para fratura de tornozelo, 5,0 (IC 95% 4,4-5,5) para fratura do punho e 6,2 (IC 95% 5,5-7,0) para fratura de quadril. A atividade física foi

associada a um risco reduzido de fratura de quadril, mas não foi associado com risco de fratura de tornozelo ou punho. As fraturas de tornozelo, punho e quadril fraturas são extremamente comuns em mulheres na pós-menopausa, mas as associações com idade, adiposidade e atividade física diferem substancialmente entre os três locais de fratura.

Olsen et al. (2013) relatam que as fraturas osteoporóticas do tornozelo ocorrem comumente em idosos e diferem das fraturas vertebrais e de quadril, pois estão associadas a diferentes fatores de risco como: diabetes, doença vascular periférica, demência e densidade mineral óssea. Várias técnicas cirúrgicas diferentes foram descritas para obter uma fixação estável em pacientes com fraturas osteoporóticas do tornozelo com bons resultados.

Esses estudos sugeriram que a **osteoporose estava correlacionada com a fratura de tornozelo** e, portanto os cirurgiões ortopédicos deveriam ter um papel ativo na identificação e no tratamento da osteoporose.

Kanis et al. (2013) publicam as recomendações do Grupo de Trabalho de Epidemiologia e Qualidade de Vida da *International Osteoporosis Foundation* (IOF). Eles relatam que a osteoporose é considerada um problema de saúde pública mundial e 50% das pessoas que sofrem a primeira fratura por osteoporose terão uma segunda fratura. Os custos anuais com o tratamento das fraturas em idosos vêm crescendo exponencialmente sendo que os gastos anuais projetados para 2020 são de: 32 milhões de euros na Europa, 20 milhões de dólares nos Estados Unidos da América (EUA) e 12.5 milhões de dólares na China. As pessoas idosas representam o seguimento de maior crescimento da população, pois nos próximos 20 anos 450 milhões de pessoas irão celebrar seu 65º aniversário.

Atualmente a classificação **de osteoporose é baseada na densitometria mineral óssea** (DMO) proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) desde 1994 quando

(**Kanis, 1994**) publica o relato do Grupo de Estudos da OMS da avaliação do risco de fratura e sua aplicação no rastreamento da osteoporose pós-menopausa. Esse relatório refere que a osteoporose é uma doença é comum e pode ser diagnosticada pela medida da densidade mineral óssea através da DMO. Portanto, propõe a realização da DMO em todas as mulheres pós-menopausa como método de rastreamento de osteoporose, pois como o custo de triagem é baixo.

Kanis (2002) publica os valores da **DMO como parte do “padrão-ouro”** de acompanhamento médico de pacientes com fratura, a DMO da coluna lombar (segunda vértebra lombar –L2 à quarta vértebra lombar - L4) e do colo do fêmur e quadril total (trocânter e colo) é avaliada por esse exame. Os valores da DMO são padronizados como valores T-score, valores esses baseados na variabilidade do desvio padrão (DP) da DMO medida nos pacientes, comparada com a média de DMO de uma população de referência. O T-score é o número de DP abaixo da média de DMO para adultos jovens, usualmente entre 20 e 40 anos. Os valores de T-score são utilizados para estabelecer a ausência ($T \geq 1$) ou presença de osteoporose ($T \leq -2.5$) e osteopenia ($T < -1$ a -2.5).

Baim et al. (2005) relatam que um dos fatores que interferem na avaliação da DMO é que os valores obtidos só podem ser comparados entre si quando os aparelhos utilizados para a execução do exame são os mesmos, pois eles têm diferentes tecnologias para gerar o duplo feixe de fótons, diferentes algoritmos de detecção de bordas e uma variedade de suposições matemáticas em relação à espessura e à composição corporais. Os equipamentos para a medida da DMO frequentemente utilizam a técnica por dupla emissão de raios X (DXA), utilizando a radiação ionizante com feixes de fótons em dois diferentes níveis de energia. As diferenças de atenuação dos feixes, ao passar pelos tecidos corporais de diferentes composições, permitem que o equipamento forneça uma

medida quantitativa da densidade mineral óssea do indivíduo, pois a porção osteomineral absorve mais radiação que os tecidos moles.

Compston (2010) relata que apesar da densitometria óssea ser o exame de escolha, os estudos atuais apontam as fraturas osteoporóticas poderiam ocorrer mesmo com DMO normal .

Na discussão atual temos as seguintes questões:

- Estudos epidemiológicos demonstrando o aumento de fraturas de tornozelo de baixa energia,
- Trabalhos sugerindo que a fratura de tornozelo pode ser a fratura mais precoce indicativa de osteoporose,
- Os pacientes com fraturas de tornozelo podem ter a DMO normal.

A associação desses fatores nos motivou a entender melhor essa questão onde um paciente possui uma DMO normal, todavia há a dificuldade técnica para fixação da fratura devido à má qualidade óssea indicando, em última instância, diminuição da densidade mineral óssea conforme descrito por **Olsen et al. (2013)**. Avaliar as **possíveis etiologias da osteoporose** foi o direcionamento para entender melhor essa questão.

Clarke (2008) relata que a dinâmica de aquisição de massa óssea e a manutenção de sua homeostase durante toda a fase da vida são processos regulados pela contínua e complexa interação entre fatores hormonais, genéticos e ambientais. A osteoporose é, portanto uma doença multifatorial. O fator que pode atuar de forma decisiva provavelmente está associado ao genoma humano, visto que mutações em certas proteínas podem causar fraqueza no osso. **Mutações ou polimorfismos de genes** codificadores de proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo foram propostas como meios para prever a futura perda óssea e, eventualmente, osteoporose, e vários estudos revelaram que fatores genéticos desempenham um papel importante na regulação massa óssea.

Wheeler et al. (2007) relatam que o Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) no Instituto Nacional de Pesquisa em Genoma Humano (NHGRI) foi criado em 1988 para desenvolver sistemas de informação para biologia molecular. Além de manter o banco de dados da sequência de ácidos nucleicos para o qual os dados são submetidos pela comunidade científica, o NCBI fornece sistemas de recuperação de dados e recursos computacionais para a análise de dados bem como uma variedade de outros dados biológicos. E ao avaliarem o genoma de uma forma geral relatam que as diferenças entre as pessoas são devido aos polimorfismos. Cada um dos bilhões de seres humanos de nosso planeta (com exceção dos gêmeos monozigóticos) possui seu próprio e único genoma. Apesar de serem únicos, os genomas de dois seres humanos não aparentados têm uma identidade média de 99,9%. Entretanto, a sutil diferença de 0,1% representa uma coleção de alguns milhões de nucleotídeos, responsáveis pela diversidade. A maioria dessas diferenças tem a forma de substituições ou polimorfismos de nucleotídeos únicos (conhecidos em inglês como SNPs, ou Single Nucleotide Polymorphisms). Portanto, a miscigenação é uma característica que induz a isso. No Brasil há uma miscigenação grande devido à sua colonização e os polimorfismos podem atuar de forma bastante significativa.

NCBI Resource Coordinators (2014) descrevem que os SNPs constituem um elemento-chave para compreendermos a variabilidade genética humana e sua associação com diversas doenças. O banco de dados de polimorfismo de nucleotídeo único (dbSNP) é um arquivo público gratuito para consulta da variação genética dentro e entre diferentes espécies desenvolvidas e hospedadas pelo Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI) em colaboração com o Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano (NHGRI). Apesar de haver um grande número de SNPs nesse banco de dados, menos de 1% dos polimorfismos já foram estudados de maneira mais aprofundada e

numerosos polimorfismos ainda restam serem descobertos. Outra informação importante que pode ser pesquisada nesse banco de dados é a frequência alélica menor (MAF) que se refere à frequência com que o SNP funcional ocorre nas populações que eles foram estudados.

Kellis et al. (2014) descrevem que os SNPs são uma variação na sequência do DNA que afeta somente uma base de nucleotídeo: adenina (A), timina (T), citosina (C) ou guanina (G) na sequência do genoma. A mutação não sinônima é a mudança de uma base de nucleotídeo e consequentemente mudança na conformação da proteína e alteração do sistema chave fechadura da proteína, ou seja, essa mudança codifica um aminoácido diferente. Portanto a expressão do gene pode ser alterada.

1000 Genomes Project Consortium et al. (2010) relatam que o receptor P2X7 está correlacionado com a fisiologia do metabolismo ósseo como pro-osteogênico. Ele é um receptor que é codificado pelo gene P2RX7 na localização cromossômica 12q24 e pertence à família dos receptores P2X. Este receptor está amplamente distribuído por todo o corpo de um mamífero e expresso numa variedade de tipos de tecidos, incluindo o ósseo. O gene é altamente polimórfico e mais de 220 SNPs, e apenas alguns destes foram caracterizados. Os efeitos inibidores mediados pelos receptores de P2X7 resultam em menor número de osteoclastos, proporcionando um mecanismo para a supressão da reabsorção óssea.

Durante a última década, um grande esforço tem sido colocado no entendimento do receptor P2X7 e há uma quantidade grande de várias evidências já documentadas da sua expressão em osteoclastos e osteócitos, bem como importantes papéis funcionais na proliferação, na diferenciação e na função das células de osso. Estão descritos 15 SNPs não sinônimos para o gene P2XR7, que podem ser visualizados na **Figura 1 (Miga et al., 2014)**.

Figura 1 – Visão geral dos 15 SNPs não sinônimos do gene P2XR7

Fonte: Miga et al., 2014

Os SNPs funcionais (não sinônimos) podem agir no fenótipo como perda ou ganho de sua função. A perda de função dos SNPs não sinônimos no receptor P2X7 está associada com a perda óssea e aumento do risco de fraturas assim como o ganho de função está associado à diminuição do risco de fraturas.

Dessa forma, entendemos que ao investigar os polimorfismos no gene do receptor P2X7 e correlacionarmos com a densidade mineral óssea através da DMO, possamos esclarecer porque pacientes com fraturas de baixa energia possuem DMO normal. Portanto, analisaremos uma associação entre 15 SNPs não sinônimos do receptor P2X7 humano e o risco de osteoporose em pacientes portadores de fraturas do tornozelo acima de 50 anos de idade.

2. OBJETIVO

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo será avaliar se a variação genética do receptor P2X7 do gene P2XR7 está associada com a perda óssea e o risco de osteoporose em pacientes com fratura de tornozelo, acima de 50 anos de idade.

3. *REVISÃO DA LITERATURA*

3 REVISÃO DA LITERATURA

Burnstock (1972) descreve a presença de um componente não-colinérgico e não adrenérgico no sistema nervoso autônomo dos vertebrados através da evidência de que o trifosfato de adenosina (ATP) é o transmissor liberado de alguns desses nervos chamados de "purinérgico" (o nome se deve às purinas, pois a adenosina é uma purina endógena formada pela união de uma adenina e uma ribose). Estabelece assim o conceito de que o ATP pode atuar como uma molécula de sinalização extracelular através de interações com receptores purinérgicos específicos para mediar uma ampla variedade de processos tão diversos como a neurotransmissão, a inflamação, a apoptose e a remodelação óssea. O sistema nervoso periférico proposto por Burnstock liderou o caminho das descrições de que o ATP funciona como um transmissor sináptico dos nervos simpáticos.

Burnstock et al. (1975) relata que a evidência de que o ATP é o transmissor liberado dos nervos purinérgicos inclui: síntese e armazenamento de ATP nos nervos, liberação de ATP dos nervos quando estimulados, aplicação exógena ATP simulando a ação do transmissor liberado pelo nervo, a presença de ectoenzimas que inativam o ATP, drogas que produzem efeitos similares de bloqueio ou potencialização na resposta à ATP e estimulação nervosa aplicada exogenamente. Uma base para distinguir dois tipos de receptores purinérgicos (P1 e P2) tem sido proposta: os P1 são mais sensíveis à adenosina e competitivamente bloqueados pelas metilxantinas enquanto os purinoceptores e sua ocupação leva a alterações acumulação de monofosfato de adenosina cíclica (AMPC) ; P2 são mais sensíveis ao ATP e bloqueados (embora não competitivamente) por quinidina, imidazolininas, piridilistógeno e apamina, e sua ocupação leva à produção de prostaglandina. Os purinoceptores P2 medeiam as respostas do músculo liso ao ATP

liberado pelos nervos purinérgicos, enquanto os purinoceptores P1 medeiam as ações pré-sinápticas da adenosina nas terminações nervosas adrenérgicas, colinérgicas e purinérgicas.

Burnstock (1990) considerando a base da subdivisão dos receptores para purinas nos purinoceptores P1 para adenosina e purinoceptores P2 para ATP e ADP propõe a subdivisão dos receptores ATP em P2X, P2Y, P2Z e P2T. Esses subtipos de purinoceptores são discutidos com relação a seus mecanismos de transdução, sua distribuição e seus papéis fisiológicos, incluindo seus papéis na cotransmissão e neuromodulação.

Abbracchio e Burnstock (1994) relatam as duas famílias purinoceptoras P2X (ligante fechado) e P2Y (G-proteína-acoplada) não diferem apenas em termos de perfil farmacológico e distribuição tecidual, mas também em seus mecanismos de transdução e sistemas efetores. Os purinoceptores de P2X são canais iônicos intrínsecos permeáveis a Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , enquanto os purinoceptores P2Y são receptores acoplados à proteína G. Propõem subdivisões dentro de cada uma das duas famílias. O P2X é subdividido em: P2X1, P2X2, P2X3 e P2X4.

Kannus et al. (1996) realizam um estudo para determinar a tendência no número e incidência de fraturas osteoporóticas de tornozelo em idosos. Eles definem uma fratura como osteoporótica somente se ocorresse como resultado de trauma mínimo em uma pessoa de 60 anos de idade ou mais. Observam que a incidência ajustada por idade dessas fraturas aumentou em mulheres, de 66 em 1970 para 162 em 1994, e em homens, de 38 em 1970 para 82 em 1994. Eles concluem que o número de fraturas osteoporóticas no tornozelo na Finlândia está aumentando a uma taxa isso não pode ser explicado simplesmente por alterações demográficas.

Surprenant et al. (1996) relatam que o receptor P2z é responsável pela lise dependente do ATP de macrófagos através da formação de poros de membrana permeáveis a moléculas grandes. Outros canais controlados por ATP, os receptores P2X, são permeáveis apenas a pequenos cátions. Os autores referem que, um receptor de ATP, o receptor P2X7, foi clonado do cérebro de ratos e exibiu ambas as propriedades. Esta proteína é homóloga a outros receptores P2X, mas possui um domínio carboxilterminal único, necessário para as ações líticas do ATP. Assim, o receptor P2X7 (ou P2z) é uma molécula bifuncional que poderia funcionar tanto na transmissão sináptica rápida quanto na lise mediada por ATP das células apresentadoras de antígeno.

Collo et al. (1997) descrevem a distribuição tecidual do receptor P2X7. O receptor é uma proteína amplamente expressa em células hematopoiéticas como: granulócitos, monócitos e linfócitos. Também foram encontrados em outros tecidos tais como: baço, fígado, glândula salivar, epitélio brônquico, testículos, medula óssea e epêndima cerebral.

Buell et al. (1998) descrevem a organização genômica do gene do receptor P2X7 com 13 exons (áreas de codificação, podem ser denominados como bases de DNA que são traduzidas em ácido ribonucleico mensageiro - mRNA) e 10 introns (áreas não codificadas, que são bases de DNA que são encontradas entre exons).

Naemsch et al. (2001) publicam os resultados de estudos em animais (coelhos) a respeito do mecanismo de ação do P2X7 no metabolismo ósseo. Os osteoclastos foram isolados dos ossos longos de coelhos e foram submetidos à estimulação inicial com ATP. Através desse estudo, os autores conseguiram demonstrar que as altas concentrações de ATP ativam receptores P2X7 e, portanto, forneceram a evidência funcional para um canal de cálcio relacionado à via de influxo em osteoclastos.

North (2002) descreve que o papel fisiológico dos receptores P2X em células nativas foi se tornando mais claro através dos efeitos dos agonistas e antagonistas e os

defeitos observados após o bloqueio de expressão gênica. O sistema nervoso periférico lidera a fisiologia através do ATP que opera como um transmissor sináptico de nervos simpáticos musculares e é cada vez mais percebido como sendo um transmissor autócrino e parácrino. A identificação de modificações pós-traducionais começa a indicar como a função do canal de cátion pode ser modificada por outros componentes celulares, entretanto a ativação dos receptores P2X7 não só abre um canal, mas envolve vários efetores a jusante. Embora a clonagem do P2X7 proporcionou o entendimento da permeabilidade de canais de cátion com propriedades distintas, não forneceu uma explicação completa da “permeabilização” celular por nucleotídeos extracelulares, ou do acoplamento de receptores P2Z. O isolamento das primeiras proteínas sinalizadoras (antagonistas potentes e seletivos) para o receptor pode revelar como células individuais são influenciadas pelo receptor P2X7.

Gartland et al. (2003a) relatam que os osteoclastos são grandes células multinucleadas, terminalmente diferenciadas, formadas pela fusão de precursores hemopoiéticos mononucleares. Sua função é a reabsorção óssea, que é uma parte essencial do crescimento, modelagem e remodelação do esqueleto. Embora alguns fatores de diferenciação de osteoclastos tenham sido identificados recentemente, a base molecular para o processo de fusão que leva à multinucleação é pouco compreendida. O receptor P2x7 foi identificado como responsável pela geração de células gigantes multinucleadas. Para testar se essa correlação, eles realizam um estudo in vitro através do bloqueio do receptor de P2X7 com o antagonista de ATP e observaram que houve inibição da fusão de osteoclastos precursores para formar osteoclastos multinucleados e associam os receptores P2X na geração de células multinucleadas gigantes. Portanto, esses dados sugerem um papel importante para o receptor P2X7 na regulação da população de osteoclastos oferecendo um novo alvo para a modulação da função dos

osteoclastos nas doenças caracterizadas por um aumento do número de osteoclastos e remodelação óssea excessiva.

Gartland et al. (2003b) descrevem que tanto os osteoblastos como os osteoclastos expressam múltiplos subtipos de receptores P2, e o número crescente de efeitos induzidos por nucleotídeos relatados no osso serve para realçar a importância destes receptores no microambiente ósseo e nos processos de remodelação óssea. O receptor P2X7 tem um papel paradoxal na função dos osteoclastos. O aparente paradoxo é de que tanto a ativação quanto o bloqueio do receptor P2X7 têm a mesma consequência final nos osteoclastos, ou seja, redução da reabsorção óssea, o que traduz a natureza complexa do modo de ação desse receptor. Os osteoclastos sugerem uma importante função deste receptor na manutenção da homeostase esquelética e podem fornecer um alvo para a intervenção de drogas em distúrbios de remodelação óssea.

Gartland et al. (2003c) relatam que após ativação prolongada do receptor P2X7 eles formam grandes poros na membrana plasmática celular. Este receptor também foi implicado na geração de células gigantes multinucleadas e osteoclastos. Os autores demonstraram, em estudo anterior, que um bloqueio deste receptor inibe a formação de osteoclastos in vitro. No atual estudo usam camundongos deficientes no receptor P2X7 no contexto do osso demonstraram que eles eram saudáveis e não apresentavam problemas esqueléticos. Após a estimulação com maitotoxina (MTX- ativadora dos canais de cálcio extracelulares, levando a um aumento nos níveis de íons de cálcio – Ca^{2+}) também demonstram a capacidade de osteoclastos multinucleados para formar poros na membrana plasmática in vitro. Estas descobertas são consistentes com a existência de uma estrutura endógena de poros presente em células precursoras de osteoclastos que podem ser ativadas pelo receptor P2X7, ou na sua ausência, por sinais alternativos para mediar fusão

e formação de poros. Esses dados fornecem mais informações sobre o modo de ação do receptor P2X7.

Ke et al. (2003) através de estudos *in vitro*, demonstram que a exclusão do receptor P2X7 revelou suas funções reguladoras na formação e de reabsorção óssea. O receptor foi sugerido como um alvo terapêutico para a gestão de alterações esqueléticas tais como a osteoporose. O estudo incluiu avaliação dos fenótipos de ratos geneticamente modificados para inativação do receptor P2X7 que foi denominado de tipo modificado (knockout-KO) e comparado com os ratos de tipo selvagem (wild type-WT). Ao avaliarem o comprimento do fêmur da mesma ninhada em 2 ou 9 meses de idade não houve diferenças entre tipo KO e de tipo WT o que indicou que o receptor P2X7 não regula o crescimento ósseo longitudinal. Contudo, KO exibiu uma redução significativa com relação ao teor total da cortical óssea e circunferência periosteal em fêmures, e reduziu a formação periosteal óssea com aumento da reabsorção óssea trabecular em tíbias. Os osteoclastos estavam presentes *in vivo* e também nas culturas de osso-medula de rato KO, o que indicou que esse receptor não foi essencial para a fusão de precursores de osteoclastos com receptores P2X7 funcionais. Também foram encontrados receptores P2X7 em osteoblastos a partir de rato KO e WT, e, portanto não sugerindo um papel direto na formação óssea. O receptor P2X7 em rato KO demonstrou um fenótipo único esquelético que envolveu a formação de osso periosteal deficiente em conjunto com a reabsorção óssea trabecular excessiva.

Korcok et al. (2004) descrevem em um estudo *in vitro* que os receptores de P2X7 participam da ativação do fator nuclear de cadeia-leve-kappa-potenciador de células B ativadas (NF- κ B), pois ele desempenha um papel chave na resposta de osteoclastos ao receptor ativador NF- κ B (RANK) no receptor NF- κ B ligante (RANKL). O estudo incluiu coelhos recém-nascidos do tipo WT, seus osteoclastos foram isolados para serem testados

com receptor P2X7, a imunofluorescência foi utilizada para detectar NF-kB e a concentração de cálcio foi monitorizada em osteoclastos individuais. O estímulo nos osteoclastos através do ATP e benzoil-ATP (BzATP) provocaram a elevação transitória do cálcio, indicando que o aumento de cálcio por si só não é suficiente para ativar NF-kB. O pré-tratamento de osteoclastos de coelho com a osteoprotegenina (OPG) inibiram a translocação de NF-kB induzida por RANKL, mas não por BzATP, estabelecendo que os efeitos de BzATP são independentes de sinalização RANKL. Esses resultados mostram que o receptor P2X7 faz a ativação de NF-kB em osteoclastos. Portanto, citocinas liberadas em locais de inflamação, ou em resposta a estímulos mecânicos, podem através de NF-kB regular a formação da atividade dos osteoclastos.

Ohlendorff et al. (2007) publicam que genotipagem para três polimorfismos detectados no exon 13 (SNP13, SNP14 e SNP 15) do receptor P2X7 foi realizada em 1764 mulheres pós-menopausa. Os marcadores ósseos da densidade mineral óssea da coluna lombar e do quadril foram determinados no início e após 10 anos, e a incidência de fraturas vertebrais após 10 anos. Os três polimorfismos foram detectados (SNP13-Gln460Arg, SNP14-Glu496Ala, e SNP15-Ile568Asn), entretanto nenhum deles foi relacionado com a DMO. O SNP15 (Ile568Asn) foi associado com o efeito da terapia de reposição hormonal, além disso, a incidência de fraturas em 10 anos foi estatisticamente associada ao SNP14 (Glu496Ala) e o SNP15 (Ile568Asn). Quando foram avaliados os osteoclastos in vitro, o SNP14 (Glu496Ala) influenciou fortemente a apoptose o que contribuiu para o aumento do risco de fratura. O SNP14 (Glu496Ala) foi identificado como SNP funcional no P2X7 afetando a apoptose de osteoclastos in vitro, portanto sendo considerado como um marcador de risco de fratura em mulheres dinamarquesas na pós-menopausa.

Nissen et al. (2009) avaliam 800 mulheres saudáveis perimenopausa com idade média de 50,4 anos que não utilizaram terapia hormonal de substituição. Os autores testaram a hipótese de que há uma significativa contribuição genética para o risco de osteoporose, e provas fornecidas por estudos individuais sugeriram que a geometria do quadril também pode em parte ser geneticamente programada. Os exames realizados foram: DMO, RX (para medir o comprimento, o eixo e a largura do colo femoral e diâmetro da cabeça femoral) e análise genética de quatro polimorfismos (metileno-tetra-hidrofolato redutase-MTHFR c.677C> T), os receptores purinérgicos P2X7: Glu496Ala (SNP 14) e Ile568Asn (SNP 15), e a proteína relacionada com o receptor de lipoproteína de baixa densidade (5 - Lrp5 - c.266A> G) . Não houve diferenças significativas entre homozigotos para o alelo secundário e portadores do alelo comum em relação aos parâmetros de geometria do quadril, portanto as dimensões geométricas do fêmur proximal em mulheres na perimenopausa não estão associadas a esses polimorfismos.

Li et al. (2009) relatam seus estudos in vitro testando a hipótese de que a cura de uma fratura pode ser retardada na deficiência do P2X7. Para testar a hipótese, ratos adultos no grupo de estudo tiveram os receptores de P2X7 inativados (KO) e foram comparados com o grupo controle P2X7 (WT) realizaram uma osteotomia do fêmur direito seguida de fixação com um pino de aço inoxidável na cavidade medular para estabilizar o local da fratura. O desenvolvimento de calo ósseo foi avaliado na radiografia e na microtomografia computadorizada e não houve diferenças entre os grupos. Os testes mecânicos demonstraram que a recuperação da força máxima, rigidez e energia até a quebra foram ligeiramente diminuídas no KO. As medições histomorfométricas do calo revelaram que a superfície de mineralização e a formação óssea foram significativamente menores, 22% em KO e 29% em WT. Esses dados mostram que uma mutação nula de

P2X7 não afetou a quantidade de calo formado na fratura, no entanto, a remodelação do calo foi significativamente retardada.

Orriss et al. (2010) relatam que o sistema de sinalização dos receptores de ATP-P2X passou a ser referido como podendo exercer complexos efeitos locais sobre a função das células ósseas, sugerindo que o principal impacto funcional dos nucleotídeos extracelulares no osso era negativo através de efeitos sobre a função dos osteoblastos. Os agonistas e antagonistas dos receptores para os subtipos de receptores P2 envolvidos no osso em remodelação começaram a ser desenvolvidos com intuito de conduzir a novas estratégias terapêuticas para o tratamento das doenças do osso.

Jørgensen et al. (2012) descrevem seu estudo que teve o intuito de determinar a associação SNPs não sinônimos do receptor P2X7 à massa óssea e na incidência de fraturas em mulheres pós-menopáusicas. Um total de 1694 mulheres (com idades entre 45-58) que participavam do Estudo de Prevenção de Osteoporose dinamarquesa foram genotipados para 12 SNPs não sinônimos do receptor P2X7. A densidade mineral óssea foi determinada no início e após 10 anos. Além disso, a incidência de fraturas vertebrais foi documentada em 10 anos. Verificou-se que a taxa de perda óssea foi claramente associada ao SNP10 (Arg307Gln) tal que os indivíduos heterozigóticos para o polimorfismo tiveram um aumento da taxa de 40% de perda óssea. Além disso, os indivíduos portadores SNP15 (Ile568Asn) tiveram aumento da perda óssea. Em contraste, o SNP13 (Gln460Arg) foi associado com a proteção contra a perda óssea. O polimorfismo SNP11 (Ala348Thr) foi associado com uma incidência de fratura vertebral inferior a 10 anos após a menopausa. Os SNPs são denominados pelo seu efeito no fenótipo como sendo: ganho de função - GOF (proteger de fraturas ósseas) ou perda de função - LOF (predispor as fraturas ósseas).

Wesselius et al. (2012) relatam que o receptor P2X7 desempenha um papel importante na liberação de citocinas durante a resposta inflamatória in vivo e que os polimorfismos que levam à perda da função do receptor podem contribuir para a diminuição da liberação de citocinas pelas células imunes. Eles investigaram se um LOF SNP conhecido, o SNP14 (Glu496Ala) levava a alterações na liberação de citocinas em resposta ao ATP. Avaliaram sangue total foi utilizado para induzir uma reação inflamatória com os estímulos dos pró-inflamatórios lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e lecitina fitohemaglutinina PHA. O grupo de estudo foi de 9 indivíduos KO e grupo controle de 7 indivíduos WT ambos para o SNP14. O ATP foi adicionado no sangue e induziu um aumento na liberação de interleucina 1 beta (IL-1 β) no grupo KO e uma diminuição no grupo WT. Os níveis diminuídos de IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e desidrogenase láctica (DHL) em resposta ao ATP foram obtidos em ambos os grupos KO e WT, entretanto foi menos pronunciado no grupo KO. É provável que o gene do receptor seja importante na liberação de citocinas durante a inflamação. Além disso, este estudo sugere que os portadores do polimorfismo de perda de função SNP14 (Glu496Ala) são protegidos contra os efeitos citotóxicos altos níveis de ATP. Em conclusão, uma diferença na liberação de citocinas induzida por ATP e morte celular foi observada entre os indivíduos KO e indivíduos WT, indicando que o polimorfismo de LOF SNP14 é susceptível de desempenhar um papel importante durante a inflamação. Portanto, o receptor P2X7 pode ser importante na etiologia e na fisiopatologia de doenças inflamatórias, bem como em condições relacionadas, como a osteoporose.

Gartland et al. (2012) descrevem a correlação da DMO, medida no início e após 6 anos de acompanhamento, com a genotipagem P2X7 em 506 mulheres pós-menopáusicas. Avaliam os LOF previamente descritos SNP1, SNP10, SNP12, SNP14, SNP15 e GOF SNP5. A associação do SNP10 (Arg307Gln) é correlacionada com menor

DMO da coluna. Outras análises mostraram que um grupo combinado de pacientes que possuem polimorfismo com perda de função tinha quase nove vezes maior alteração percentual anual na DMO lombar do que em pacientes normais. Portanto, outros LOF, que resultam em uma função reduzida ou nenhuma o receptor P2X7, também podem contribuir para a perda óssea acelerada. Certas variantes polimórficas de P2X7 podem identificar mulheres com maior risco de desenvolver osteoporose. Em conclusão, o resultado deste estudo, quando associados aos publicados por **Jørgensen et al. (2012)**, fornecem evidências de que o receptor P2RX7 está envolvido na regulação da DMO e pode, no futuro, representar uma ferramenta de diagnóstico precoce para a gestão de osteoporose.

Husted et al. (2013) avaliam 798 pacientes através da realização de genotipagem para o P2X7, DMO e RX de coluna para fraturas vertebrais. O grupo de estudo é composto 462 pacientes (360 mulheres e 102 homens) com osteoporose diagnosticada pela DMO e o grupo controle com 336 pacientes sem osteoporose (262 mulheres e 74 homens). O SNP1 é associado com aumento do risco de fratura e menor densitometria óssea em mulheres. Outros dois LOF SNPs: SNP14 (Glu496Ala) e SNP4 (Gly150Arg) também são associados com a DMO. SNP14 (Glu496Ala) é associado com a diminuição DMO L1-L4 em mulheres e diminuição da DMO de quadril em homens. O SNP4 (Gly150Arg) foi associado com a diminuição da DMO do quadril em mulheres e homens combinados. O GOF, SNP11 (Ala348Thr) foi associado com o risco de fratura reduzida e aumento da DMO em todos os locais nos homens. O SNP13 (Gln460Arg) é associado com o aumento DMO quadril em mulheres, com a exceção de SNP5 (His155Tyr) para o qual encontramos resultados conflitantes em homens e mulheres. A análise em conjunto dos SNP11 (Ala348Thr), SNP13 (Gln460Arg) e SNP14 (Glu496Ala) mostram que os efeitos na DMO e fratura foram impulsionados pelo SNP11 (Ala348Thr) em homens e pelo

SNP13 (Gln460Arg) e SNP14 (Glu496Ala) em mulheres. Portanto, eles descrevem três SNPs do P2X7 que estão associados com a osteoporose, pois que eles foram associados com a DMO e risco de fratura.

Wesselius et al. (2013) avaliaram 690 mulheres e 231 homens acima de 50 anos que foram genotipados para 15 SNPs P2X7 não sinônimo e realizaram a DMO. O SNP11 (Ala348Thr) foi associado com o aumento dos valores da DMO na coluna lombar. Os SNP14(Glu496Ala) e SNP 4 (Gly150Arg) foram associados com a diminuição dos valores de DMO. O SNP13 (Gln460Arg) foi associado com aumento dos valores da DMO em homens, tanto para os indivíduos heterozigotos como os homozigotos para o polimorfismo. Portanto, a detecção de SNPs não sinônimas dentro do P2X7 vai se estabelecendo como útil para estimar o risco de osteoporose na fase inicial, potencialmente permitindo uma melhor prevenção e tratamento da osteoporose.

Noronha-Matos et al. (2014) investigam o papel do receptor P2X7 na diferenciação osteogênica e mineralização de medula óssea com células-tronco mesenquimais e avaliaram a cultura de medula óssea da cabeça do fêmur de 18 mulheres na pós-menopausa, com idade média de 72 anos. O foco foi nos mecanismos relacionados ao cálcio intracelular em oscilações da membrana plasmática dinâmica do ATP, e o agonista de BzATP. Os resultados indicam claramente que a ativação em longo prazo do receptor P2X7 com BzATP antecipa uma diferenciação osteogênica e promove a mineralização das células tronco mesenquimais pós-menopáusicas, proporcionando, assim, novos alvos terapêuticos para perda óssea pós-menopausa.

Kvist et al. (2014) realizam uma revisão sobre o receptor P2X7 com intuito de fornecer hipóteses inovadoras baseadas em evidências sobre o papel da ATP. Relatam o receptor P2X7 é uma molécula importante na ativação da resposta imune inata, portanto

a perda óssea mediada pelo sistema imunológico pode muito ser a chave para entender perda óssea induzida por inflamação e consequentemente a osteoporose.

Wang e Gartland (2014) relatam após uma revisão sobre os receptores P2 que um progresso significativo tem sido feito recentemente no campo da sinalização purinérgica ampliando nossa compreensão do papel dos receptores P2 no sistema musculoesquelético. Em particular, os estudos dos receptores P2X7, P2Y6, P2Y12 e P2Y13 apresentam potenciais alvos farmacológicos novos para tratar doenças osteomusculares de séries tais como osteoporose. O desenho do fármaco baseado em agonistas ou antagonistas desses receptores P2 deve ser o próximo ponto focal.

Agrawal e Gartland (2015) fazem uma revisão sobre os receptores P2X7 e seu papel na formação e função das células ósseas, pois embora os osteoblastos e osteoclastos expressem P2XR7 a sua função e a sua regulação permanece complexa. Descrevem a ativação basal do receptor P2X7 como sendo osteogênica e que a estimulação sustentada inibe novos processos de formação e mineralização óssea. De maneira semelhante, a formação de osteoclastos requer ativação do receptor P2X7, mas a reabsorção óssea capacidade pode ser inibida na presença de um estímulo ATP. A dualidade da sinalização do receptor P2X7 células do osso é ainda mais complicada pela existência de variações o receptor, causado por proteínas isoformas e SNPs no gene P2X7R. Entretanto, que o avanço nos estudos dessas variantes poderia contribuir para um melhor entendimento da diversidade de ativações na mediação de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos e, as alterações ósseas em geral.

Jørgensen et al. (2015) fazem uma revisão dos estudos publicados sobre receptor P2X7 e referem o osso como um órgão altamente dinâmico, sendo constantemente modelado e remodelado, a fim de se adaptar à evolução da necessidade ao longo da vida. Relatam que há uma quantidade muito grande de evidências já documentadas a respeito

do P2X7 e a sua expressão em osteoblastos, osteoclastos e osteócitos, bem como importantes papéis funcionais na proliferação, na diferenciação e na função das células ósseas. A chave para essa evidência vem de estudos farmacológicos em células e animais. Os receptores P2X são importantes na regulação da renovação óssea e manutenção da massa óssea, representando desse modo um grande potencial como novos alvos de drogas para o tratamento de doenças ósseas.

Varley et al. (2016) realizam um estudo com pacientes mais jovens dos que publicados até então para correlacionar metabolismo ósseo e o receptor P2X7. Eles investigam a associação do gene P2X7 e a predisposição da fratura por estresse nos atletas de elite e nos recrutas militares. Os autores avaliam 210 recrutas militares (197 homens e 13 mulheres) com 43 fraturas por estresse e 518 atletas de elite (449 homens e 69 mulheres) com 125 fraturas por estresse. Esses dois grupos tinham em média 20 anos de idade e foram genotipados para SNPs funcionais dentro do P2X7. Encontram o LOF SNP14 (Glu496Ala) associado com lesão por fratura por estresse, enquanto GOF SNP 11 (Ala348Thr) é associado com uma menor ocorrência de lesões por fratura de estresse. A associação LOF SNP14 com fraturas de estresse são replicadas em atletas de elite, enquanto o GOF SNP11 também é associado a casos de fraturas de estresse múltiplo reduzidos em atletas. A associação entre polimorfismos P2X7 com prevalência de fratura de estresse é identificada como um fator de predisposição genética no desenvolvimento da lesão nesse grupo.

Habermacher et al. (2016) fazem uma revisão da literatura e fornecem um resumo dos aspectos funcionais e estudos estruturais em receptores P2X numa visão sem precedentes sobre a compreensão da operação molecular dos receptores P2X, ainda há muitas questões que são deixadas sem resposta. Em particular, qual é a estrutura do domínio intracelular e como ela contribui para a função do receptor? Como os vários

moduladores regulam a resposta ao ATP? Quais são os mecanismos da transição? E como os poros podem mudar dinamicamente sua permeabilidade aos cátions? Portanto, concluem que a elucidação das respostas a essas questões poderá definir melhor o papel funcional dos receptores P2X nos estados normal e patológico.

Pasqualetto et al. (2018) relatam que o número de receptores P2X caracterizados responsivos aos nucleotídeos extracelulares aumentou substancialmente desde os primeiros trabalhos de Burnstock em 1972. Sabe-se agora que ambos, os osteoblastos e os osteoclastos, expressam vários subtipos de receptores P2X. O aumento do número de efeitos induzidos pelos nucleotídeos relatados com efeitos no osso serve para destacar a importância desses receptores no microambiente do osso e nos processos da fisiologia do metabolismo ósseo. A remodelação óssea é regulada por fatores locais e modulada por estímulos mecânicos. A estimulação mecânica pode causar a liberação de ATP, que por sua vez é um agente que estimula a reabsorção osteoclástica em baixas concentrações e a inibe em altas concentrações. O ATP liberado em resposta ao estímulo mecânico pode atuar através de receptores de P2X7 para inibir a reabsorção osteoclástica.

4. MÉTODOS

4 MÉTODOS

O protocolo foi avaliado e aprovado pela Comissão Científica do Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) sob o número 1099, pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número protocolo 0340/15 (**Anexo A**). A pesquisa obteve apoio da FAPESP sob o número 2016/4510-1 (**Anexo B**).

Esse estudo foi realizado mediante parceria do IOT- FMUSP, Hospital do Servidor Público Estadual (HSPE) e da Chromosome Medicina Genômica.

Após a explicação do trabalho e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo C**), os voluntários com diagnóstico de fratura de tornozelo acima de 50 anos de idade submetidos ao tratamento cirúrgico foram recrutados entre os pacientes do Grupo do Pé e Tornozelo do Departamento de Ortopedia e Traumatologia do HSPE.

Os pacientes foram identificados segundo idade, gênero, índice de massa corpórea, mecanismo de trauma da fratura, tabagismo, atividade física habitual e uso de medicamento para osteoporose.

Com intuito de excluir os pacientes com osteoporose secundária, avaliaram-se os antecedentes pessoais de doenças e uso de medicamentos seguindo as orientações do *American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis* (**Camacho et al., 2016**).

Os critérios de exclusão para osteoporose secundária estão descritos no **Quadro 1**.

Quadro 1 – Critérios de exclusão para osteoporose secundária

Idade menor que 50 anos
Doenças reumatológicas e do colágeno (artrite reumatoide, espondilite anquilosante, lúpus eritematoso sistêmico, osteogênese imperfeita, Síndrome de Marfan, Síndrome de Ehlers-Danlos, Pseudoxanthoma elasticum)
Doenças endocrinológicas (acromegalia, deficiência de GH, diabetes mellitus, hipercortisolismo, hipogonadismo, hiperparatireoidismo, hipertireoidismo, hiperprolactinemia, menopausa precoce)
Doenças gastrointestinais e nutricionais (anorexia nervosa, cirrose hepática, doença celíaca, doença inflamatória intestinal, etilismo, gastrectomia, nutrição parenteral prolongada, obstrução crônica do trato biliar, síndromes de má absorção)
Uso de medicações com risco bem definido: glicocorticoides, anticonvulsivantes (fenobarbital, fenitoína e, em menor escala, carbamazepina e ácido valproico), agentes imunossupressores (ciclosporina, tacrolimo, micofenolato), anticoagulantes (heparina não fracionada e, em menor escala, heparina de baixo peso molecular, a longo prazo), agentes hormonais e anti-hormonais (medroxiprogesterona de depósito, tamoxifeno nas mulheres na pré-menopausa), inibidores da aromatase nas mulheres na pós-menopausa, agonistas do GnRH, dose supressiva de hormônio tireoidiano, pioglitazona e rosiglitazona.
Uso de medicação com risco possível: lítio, antipsicóticos, inibidores seletivos da recaptação de serotonina, topiramato e inibidores da bomba de prótons.

Um painel básico de exames para refinar a busca de osteoporose secundária foi solicitado e os resultados alterados foram considerados como critérios de exclusão devido à possibilidade de osteoporose secundária (**Camacho et al., 2016**).

Os exames solicitados para exclusão de osteoporose secundária estão descritos no **Quadro 2**.

Quadro 2 – Exames solicitados para investigação de osteoporose secundária

Glicemia de jejum
Hemograma completo
Cálcio
Fósforo
Magnésio
Fosfatase Alcalina
25-hidroxivitamina D
Creatinina
TGO (transaminase glutâmico oxalética)
TGP (transaminase glutâmico pirúvica)
gama GT (gamaglutamil transferase)
bilirrubinas
TSH
Cálcio urinário de 24 horas
Exame radiológico da coluna

A DMO foi realizada em todos os pacientes no mesmo aparelho (GE lunar®).

Os 121 pacientes acima de 50 anos com fratura de tornozelo submetidos ao tratamento cirúrgico incluídos no estudo foram divididos em dois grupos após o resultado da densitometria óssea:

- Grupo Estudo: 65 pacientes com diagnóstico de osteopenia (T score entre -1 e -2,5) ou osteoporose (T score $\leq$ -2,5);
- Grupo Controle: 56 pacientes com valores de normalidade (com T score $\geq$ -1).

Os exames de densitometria óssea de todos os pacientes foram realizados no mesmo aparelho (GE lunar®).

O estudo do polimorfismo genético foi realizado na Chromosome Medicina Genômica – São Paulo. O grupo de pesquisadores de processamento do material celular não teve conhecimento do grupo ao qual o voluntário fazia parte.

4.1 Obtenção do DNA

O DNA foi obtido a partir de esfregaço de mucosa oral por meio de escova de coleta, 10 vezes em cada bochecha. Utilizou-se 2 escovas por paciente, 1 para cada bochecha. Cada escova foi acondicionada em tubo de coleta, tipo Eppendorf, com cerca de 1 ml de solução salina a 0,9%, previamente identificada e armazenada, inicialmente em temperatura ambiente. O bochecho foi escolhido como a técnica de obtenção do material de estudo, pois constitui o método menos invasivo e mais prático de obtenção do DNA (Fernandes, 2014).

Posteriormente o material foi encaminhado à Chromosome Medicina Genômica.

O material contido na escova foi, inicialmente, agitado vigorosamente. Em seguida, com auxílio de uma pinça, a escova foi removida e a amostra foi processada.

4.2 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada automaticamente, utilizando o método QIAcube associado a kits de extração em coluna (**Qiagen, 2016**).

Essa etapa iniciou-se com a liberação do material genético da amostra estudada, seguida da estabilização dos ácidos nucleicos, remoção de inibidores de amplificação e, por último, concentração do DNA num volume útil de solução aquosa compatível com as próximas etapas do protocolo utilizado. Adicionou-se proteinase K a 200 µL da amostra total e tampão de lise. Esse tampão gerou a lise celular e a degradação das proteínas e restos das membranas com altas concentrações de sais, tais como, tiocianato de guanidina e isotiocianato de guanidina, que promoveram a adsorção do DNA à membrana de sílica. O passo seguinte foi a lavagem da membrana em condições de pH e salinas para eluir DNA em elevada concentração e bom grau de pureza. Uma amostra de 200 µL deu origem a 3 – 12 µg de DNA com uma razão de A260/A280 no intervalo 1,7 – 1,9.

4.3 Genotipagem

A população do estudo foi genotipada para os 13 exons contendo 15 SNPs não sinônimos dentro do gene P2XR7 (cromossoma 12q24) que foram selecionados com base

nos seus efeitos funcionais previamente publicados sobre o receptor P2X7 e foram encontrados na base de dados para SNPs não sinônimos (**Miga et al., 2014**).

A genotipagem foi realizada utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR). Através da reação de PCR, a polimerase de DNA sintetizou uma nova cadeia de DNA complementar à cadeia de modelo oferecida.

A partir disso, foi realizada a colocação de um iniciador (primer) para que o primeiro nucleotídeo da cadeia fosse adicionado e assim delineou-se uma região específica da sequência de modelos que foram ampliados. Em seguida, foi realizada a genotipagem quantitativa e a detecção de polimorfismos de nucleotídeos e discriminação alélica (**Deepak et al., 2007**).

4.3.1 Desenho dos primers

A genotipagem do SNP foi realizada por uma reação de extensão envolvendo dois tipos de desenho de primer: extensão de base única e específicos de alelos. A ferramenta de software Batch Primer3® foi utilizada para desenhar os primers utilizados no PCR (**You et al., 2008**).

Para a confirmação de cada um desses pares de primers que eram específicos para a zona do genoma que se pretendia amplificar, utilizou-se a ferramenta UCSC In-Silico PCR® (**Kent et al., 2002**).

Os primers foram desenhados através de reações pelos métodos de: Sanger e *Long Range* utilizando o PCR, e todos os oligonucleotídeos foram obtidos da ThermoFisherScientific® (**Nagai et al., 2001**).

A. Primer para o SNP 1

A sequência do primer utilizado no sequenciamento do SNP1 pelo método de Sanger, cobrindo a região intrônica entre o exon 1 e 2 (**Quadro 3**).

Quadro 3 – Primers utilizados no sequenciamento do SNP1 pelo método de Sanger

Segmento do gene	Primer
P2RX7_Ex1F*	AGGACTTGGCGCTTCTTGTT
P2RX7_Ex1R**	GAATGTGCACCTGAAGCTGC

* Primer Forward

** Primer Reverse

As amplificações por PCR foram realizadas com o AmpliTag Gold® Fast PCR Master Mix (Applied Biosystems®, Forester City, CA, USA), de acordo com o protocolo do fabricante em um volume total de 10µL. Para tal amplificação, foi utilizado um termociclador (Applied Biosystems®). O produto resultante foi purificado com ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, OH), de forma a degradar primers não incorporados e hidrolisar os nucleotídeos livres, de acordo com o protocolo do fabricante. Os produtos purificados foram submetidos ao sequenciamento utilizando o BigDyeTerminator v3.1 sequencing kit (Applied Biosystems®) no sequenciador AB3500 (Applied Biosystems®). Os resultados foram detectados e analisados utilizando o software Seqscape v2.7 (Applied Biosystems®) (**Quek et al., 2014**).

B. Primers para os SNPs de 2-15

Foram feitas duas reações de Long Range PCR (**Quadro 4**):

- a primeira reação cobrindo os exons 2 a 8 utilizando os primers P2RX7_Ex2F / P2RX7_Ex8R
- a segunda reação cobrindo os exons 9 a 13 utilizando os primers P2RX7_Ex9F / P2RX7_Ex13R

Quadro 4 – Primers utilizados no sequenciamento dos SNPs 2 a 15 pela reação de Long Range PCR

Segmento do gene	Primer
P2RX7_Ex2F*	CCTCCAACGCCTGCATC
P2RX7_Ex8R**	AACCAAAATTAGTCTCACCAGTTC
P2RX7_Ex9F*	ACAGCGTGAGACCCTGTC
P2RX7_Ex13R**	CAGCCCCTGCTATTGGTAAG

* Primer Forward

** Primer Reverse

Utilizou-se o kit “Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity” com concentração final de 1X (Invitrogen), nas seguintes condições: 25 µL de 1X tampão de PCR; 0,2 mM/L de cada dNTP; 0,2 µM de cada primer; 2 mM/L MgSO₄; 2,5 µL DMSO (Merck); 0,5 U de Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity e 100 ng de DNA. O programa utilizado para o Long Range PCR 1 no termociclador foi: 94°C por 2 min; 10 ciclos de 10 seg a 94°C, 15 seg a 63 e 14 min a 68°C; 25 ciclos de 10 seg a 94°C, 15 seg a 60°C e 14 min (com incremento de 20seg/ciclo) a 68°C; 7 min a 68°C. O programa utilizado para o Long

Range PCR 2 no termociclador foi: 94°C por 2 min; 10 ciclos de 10 seg a 94°C, 15 seg a 65 e 14 min a 68°C; 25 ciclos de 10 seg a 94°C, 15 seg a 63°C e 14 min (com incremento de 20 seg/ciclo) a 68°C e 7 min a 68°C. As amostras de PCR foram analisadas em gel de agarose a 2%, para verificar o sucesso da amplificação (Nagai et al., 2001).

4.3.2 Mini sequenciamento multiplex (Snapshot)

As reações de minissequenciamento empregadas para a genotipagem dos SNPs utilizaram como molde os produtos de PCR das regiões flangeadoras do SNP de interesse, coamplificadas em reações múltiplas (multiplex). Antes de iniciarmos a reação de minissequenciamento, os produtos do PCR foram tratados com ExoSAP-IT (Amershan Biosciences, Uppsala, Sweden) para a remoção do excesso de primers e os dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos) não incorporados: 3 µL do produto do PCR foi incubado com 1,5 µL de ExoSAP-IT por 15 minutos a 37°C e por mais 15 minutos à 80°C para inativação enzimática. Posteriormente, a genotipagem dos SNPs foi realizada utilizando o minissequenciamento policromático (SNaPshot™ Multiplex System, Applied Biosystems) (Fondevila et al., 2017).

O minissequenciamento multiplex foi realizado por meio de uma reação com final de 10 µL contendo 2,5 µL do produto do PCR purificado 5 µL de SNaPshot™ kit Reaction Mix, 1,5 µL de MIX de primers (5 pM de cada primer; Tabela 3) água Milli-Q qsp. A reação foi realizada adotando-se o protocolo: 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 50°C durante 5 segundos e extensão a 60°C durante 30 segundos (Lou et al., 2011).

O minissequenciamento dos primers está apresentado no **Quadro 5**.

Quadro 5 – Primers utilizados no minissequenciamento pelo SNaPshot

Posição rs	Primer
rs17525809-F-18	AGGTGAAAGAGGAGATCG
rs28360445-R-T3-23	TTTCCTTACCTCGGGACACAACC
rs28360447-F-T11-31	TTTTTTTTTTTTCCCCTATAGGAATTCAGACC
rs208294-R-T17-38	TTTTTTTTTTTTTTTTTTAGGTCTTCTGGTTCCTT CAT
rs28360451-F-T25-45	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGCTCTCTTG AACAGTGCC
rs28360452-F-T32-53	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGC CGAAACTTCACTGTGC
rs533785390-F-T40-59	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTCCACAAGACTCAGAATCCA
rs16950860-R-T45-65	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTACGGAACTGTATTGGGAC
rs28360457-F-19	GAAAACAATGTTGAGAAAC
rs1718119-R-T3-24	TTTGAGGAAGTCGATGAACACAG
rs2230911-R-T11-31	TTTTTTTTTTTGACAGCAGTTACTGGAGTAA
rs2230912-F-T19-37	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGACAACCAGAGGAGA TAC
rs3751143-R-T25-44	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTCCGGC AGCACAGC
rs1653624-R-T40-56	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTGCAGCAGCTGGGCAGG

A eletroforese dos produtos de SnaPshot purificados foi realizada no sequenciador ABI PRISM 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems), com 1,5 µL do amplicon final, 10 µL de formamida HiDi™ (Applied Biosystems) e 0,25 µL de GeneScan-120 LIZ (Applied Biosystems). Os parâmetros críticos de corrida foram: capilar de 36 cm, voltagem da injeção de 1,2 Kv, tempo de injeção de 18 segundos, voltagem da corrida de 15 Kv e tempo de corrida de 800 segundos. Os resultados foram analisados com os programas GeneMapper Software 5 (Applied Biosystems) (Lou et al., 2011).

O controle do sequenciamento foi realizado por uma segunda técnica, por sequenciamento convencional, para confirmação dos resultados obtidos. No **Quadro 6** apresenta-se a visão geral dos SNPs do estudo.

Quadro 6 – Visão geral dos 15 SNPs não sinônimos utilizados no estudo

EXON	SNP	POSIÇÃO rs	mutação do nucleotídeo	Mutação da proteína
1-2*	1	35933842	c.125+1G>T	- *
2	2	17525809	c.227T>C	p.Val76Ala
3	3	28360445	c.349C>T	p.Arg117Trp
5	4	28360447	c.448G>A	p.Gly150Arg/Ter
5	5	208294	c.463T>C	p.Tyr155Asn/Asp/His
6	6	28360451	c.556G>A	p.Glu186Lys
6	7	28360452	c.572T>C	p.Leu191Pro
7	8	533785390	c.673C>T	p.Gln225Ter
8	9	16950860	c.808C>T	p.Arg270Cys
9	10	28360457	c.920G>A	p.Arg307Gln
11	11	1718119	c.1042G>A	p.Ala348Ser / Thr
11	12	2230911	c.1070C>G	p.Thr357Ser
13	13	2230912	c.1379 ^a >G	p.Gln460Arg

continua

continuação				
EXON	SNP	POSIÇÃO rs	mutação do nucleotídeo	Mutação da proteína
13	14	3751143	c.1487 ^a >C	p.Glu496Ala
13	15	1653624	c.1703T>A	p.Ile568Asn
conclusão				

*SNP 1 encontra-se em região intrônica (entre os exons 1-2)

4.4 Análise estatística dos resultados

Após análise genética os resultados foram armazenados em uma planilha de excel e posteriormente importados para o software SPSS® 23.0 for Mac para análise estatística.

Na estatística descritiva os dados categóricos foram descritos pelo seu número absoluto de SNP's alterados e sua respectiva proporção dentro de cada SNP medido e os dados contínuos foram descritos pela média e seu respectivo desvio padrão.

A análise inferencial, foi realizada para cada SNP da amostra, que foi dividida em homozigoto selvagem (original) ou variante (heterozigoto ou homozigoto mutado), podendo haver até 2 alelos alterados por indivíduo em cada SNP e pelo número total de SNP alterados em cada indivíduo entre todos os analisados.

Para análise da inferência dos SNP's alterados ou não, foi utilizado o teste de qui-quadrado de Pearson ou o teste de exato de Fisher. Consideramos como estatisticamente significativo erro do tipo I < 0,05.

4.5 Análise da amostra

Respeitados os critérios de inclusão, a amostra foi obtida amostra foi obtida por conveniência e composta por 121 indivíduos submetidos a procedimento cirúrgico e com

diagnóstico de fratura do tornozelo e análise dos 15 SNPs não sinônimos para o receptor P2X7, divididos em grupo de estudo e grupo controle pelo resultado da DMO.

A idade da amostra, considerada como variável independente contínua e com distribuição não normal, mostra média de 56 anos no grupo controle e 65 anos no grupo de estudo (**Anexo D e E**).

5. *RESULTADOS*

5 RESULTADOS

Foram avaliados 121 pacientes com fratura de tornozelo com trauma de baixa energia, sendo 56 do grupo controle e 65 do grupo de estudo. Todos os pacientes eram sedentários, não praticavam atividade física regularmente e não utilizavam nenhum medicamento para tratamento de osteoporose. Nenhum paciente era tabagista.

Quanto ao gênero no grupo controle havia 39 (69,9%) de mulheres e 17 (30,4%) de homens e no grupo de estudo havia 55 (84,6%) de mulheres e 10 (15,4%) de homens.

Em relação à DMO, os 56 pacientes (100%) do grupo controle eram normais com T score < ou igual a -1 e dos 65 pacientes do grupo controle, 49 (75,4%) apresentavam osteopenia com T score entre -1 e -2,5 e 16 (24,6%) apresentavam osteoporose com T score < ou igual a -2,5.

A análise de normalidade e desvio padrão entre os grupos está apresentada na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Perfil epidemiológico dos grupos estudados

	Grupo Controle	DP	NORM	Grupo Estudo	DP	NORM	p entre grupos
IDADE MÉDIA	62,70	10,08	0,006	74,00	8,09	0,300	0,000
PESO MÉDIO	81,41	13,93	0,163	70,05	13,88	0,000	0,000
ALTURA MÉDIA	1,64	0,09	0,933	1,60	0,77	0,145	0,039
IMC MÉDIO	30,43	5,60	0,012	27,05	4,64	0,000	0,002
DMO L1L4 (T SCORE)	0,51	1,26	0,000	-1,52	1,31	0,048	0,000
DMO COLO (T SCORE)	-0,05	0,84	0,000	-1,56	0,65	0,613	0,000

DP=desvio padrão, IMC=índice de massa corpórea, DMO=densitometria mineral óssea e NORM=análise de normalidade

Na população do estudo (121 pacientes) a genotipagem do P2X7 para os 15 SNPs foi classificada como homozigoto selvagem (original) ou variante (heterozigoto ou homozigoto mutado). Na análise dos SNPs de forma agrupada encontramos:

- 96,7% apresentavam variante em pelo menos 1 SNP, sem significância estatística ($p=0,385$).
- 72,7% apresentavam variante em pelo menos 2 SNPs ou mais, sem significância estatística ($p=0,479$).
- 36,4% apresentavam variante em pelo menos 3 SNPs ou mais, sem significância estatística ($p=0,098$).
- 5,8% apresentavam variante em pelo menos 4 SNPs ou mais, com significância estatística ($p=0,011$).

O resumo das variantes dos SNPs de forma agrupada está demonstrado na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Visão geral das variantes dos SNPs de forma agrupada

SNPs alterados	TOTAL	Grupo Controle	Grupo Estudo	p entre os grupos
1 ou mais	96,7%	98,2%	95,4%	0,385
2 ou mais	72,7%	69,6%	75,4%	0,479
3 ou mais	36,4%	28,6%	43,1%	0,098
4 ou mais	5,8%	0,0%	10,8%	0,011

Na análise dos SNPs de forma individual encontramos:

1. **SNP1** (rs35933842, c.125+1G>T) – foi encontrada 01 (**0,9%**) variante, sendo 1 (1,7%) no grupo controle (1,7 variante: 1-1,7% de heterozigoto GT e 0

- homozigoto mutado TT) e 0 (0%) no grupo de estudo. Essa diferença não foi estatisticamente significativa no total de alterações entre os grupos (1,7%) com $p=0,341$.
2. **SNP2** (rs17525809, c.227T>C, p.Val76Ala) – foram encontradas 10 (**8,3%**) variante, sendo 3 (5,4% heterozigotos TC) no grupo controle e 7 (10,8% variantes: 6 heterozigotos TC e 1 – 3,9% homozigoto mutado CC) no grupo estudo. Essa diferença não foi estatisticamente significativa nem no total de alterações entre os grupos (5,4%) com $p= 0,281$, nem nas alterações apenas de homozigoto mutado entre os grupos (3,9%) com $p=0,351$.
 3. **SNP3** (rs28360445, c.349C>T, p.Arg117Trp) – foram encontradas 0 (**0%**) variantes, sendo 0 (0%) no grupo controle e 0 (0%) no grupo estudo. Essa diferença não foi estatisticamente significativa.
 4. **SNP4** (rs38360447, c.448G>A, p.Gly150Arg/Ter) – foram encontradas 2 (**1,7%**) variantes, sendo 0 (0%) no grupo controle e 2 (3,1% variantes: 2 heterozigotos GA e 0 homozigoto mutado AA) no grupo estudo. Essa diferença não foi estatisticamente significativa no total de alterações entre os grupos (3,1%) com $p=0,186$.
 5. **SNP5** (rs208294, c.463T>C, p.Tyr155Asn/Asp/His) – foram encontradas 83 (**70,9%**) variantes, sendo 35 (64,8%, variantes: 24 heterozigotos TC e 11-20,4% homozigotos mutados CC) no grupo controle e 48 (76,2%, variantes: 29 heterozigotos TC e 19-30,2% homozigotos mutados CC) no grupo estudo. Essa diferença não foi estatisticamente significativa nem no total de alterações entre os grupos (11,4%) com $p=0,177$, nem nas alterações apenas de homozigoto mutado entre os grupos (9,8%) com $p=0,227$.

-
6. **SNP6** (rs28360451, c.556G>A, p.Glu186Lys) - foram encontradas 0 (0%) variantes, sendo 0 (0%) no grupo controle e 0 (0%) no grupo estudo. Essa diferença não foi estatisticamente significativa.
 7. **SNP7** (rs28360452, c.572T>C, p.Leu191Pro) - foram encontradas 0 (0%) variantes, sendo 0 (0%) no grupo controle e 0 (0%) no grupo estudo. Essa diferença não foi estatisticamente significativa.
 8. **SNP8** (rs5337853902, c.673C>T, p.Gln225Ter) - foram encontradas 0 (0%) variantes, sendo 0 (0%) no grupo controle e 0 (0%) no grupo estudo. Essa diferença não foi estatisticamente significativa.
 9. **SNP9** (rs16950860, c.808C>T, p.Arg270Cys) - foram encontradas 0 (0%) variantes, sendo 0 (0%) no grupo controle e 0 (0%) no grupo estudo. Essa diferença não foi estatisticamente significativa.
 10. **SNP10** (rs28360457, c.920G>A, p.Arg307Gln) - foram encontradas 0 (0%) variantes, sendo 0 (0%) no grupo controle e 0 (0%) no grupo estudo. Essa diferença não foi estatisticamente significativa.
 11. **SNP11** (rs1718119, c.1042G>A, p.Ala348Ser / Thr) - foram encontradas 71 (58%) variantes, sendo 28 (50% variantes: 23 heterozigotos GA e 5–17,8% homozigotos mutados AA) no grupo controle e 43 (66,2% variantes: 31 heterozigotos GA e 12–27,2% de homozigotos mutados AA) no grupo estudo. Essa diferença não foi estatisticamente significativa nem no total de alterações entre os grupos (16,2%) com $p=0,072$ e nem nas alterações apenas de homozigoto mutado entre os grupos (9,4%) com $p=0,132$.
 12. **SNP12** (rs2230911, c.1070C>G, p.Thr357Ser) - foram encontradas 17 (13,8%) variantes, sendo 12 (21,4% variantes: 11 heterozigotos CG e 1–8,3% homozigoto mutado GG) no grupo controle e 5 (7,7% variantes: 5 heterozigotos CG e 0
-

homozigoto mutado GG) no grupo estudo. Essa diferença foi estatisticamente significativa no total de alterações entre os grupos (13,7%) com $p=0,031$ e não foi significativa nas alterações apenas de homozigoto mutado entre os grupos (8,3%) com $p=0,280$.

13. **SNP13** (rs2230912, c.1379A>G, p.Gln460Arg) - foram encontradas 23 (**18,7%**) variantes, sendo 8 (14,5% variantes: 8 heterozigotos AG e 0 homozigoto mutado GG) no grupo controle e 15 (23,1% variantes: 15 heterozigotos AG e 0 homozigoto mutado GG) no grupo estudo. Essa diferença não foi estatisticamente significativa no total das alterações do grupo 11,4%, com $p = 0,218$
14. **SNP14** (rs3751143, c.1487A>C, p.Glu496Ala) - foram encontradas 45 (**40,5%**) variantes, sendo 19 (33,9% variantes: 17 heterozigotos AC e 2-10,5% homozigotos mutados CC) no grupo controle e 26 (40% variantes: 26 heterozigotos AC e 0 homozigotos mutados CC) no grupo estudo. Essa diferença não foi estatisticamente significativa nem no total de alterações entre os grupos (6,1%) com $p=0,516$, nem nas alterações apenas de homozigoto mutado entre os grupos (10,5 %) com $p=0,122$.
15. **SNP15** (rs1653624, c.1703T>A, p.Ile568As) - foram encontradas 2 (**2%**) variantes, sendo 2 (4,1% variantes: 2 heterozigotos TA e 0 homozigoto mutado AA) no grupo controle e 0 (0%) no grupo estudo. Essa diferença (4,1%) não foi estatisticamente significativa, $p = 0,134$

O resumo das variantes dos SNPs de forma individual está demonstrado na **Tabela**

3.

Tabela 3 – Visão geral das variantes (somando-se heterozigoto e homozigoto mutado) dos 15 SNPs de forma individual

SNP	Variantes totais valor absoluto (valor% *)	Grupo Controle valor absoluto (valor% **)	Grupo Estudo valor absoluto (valor% **)	p entre grupos
1	1 (0,9)	1 (1,7)	0 (0,0)	0,341
2	10 (8,3)	3 (5,4)	7 (10,8)	0,281
3	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,000
4	2 (1,7)	0 (0,0)	2 (3,1)	0,186
5	83 (70,9)	35 (64,8)	48 (76,2)	0,177
6	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,000
7	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,000
8	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,000
9	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,000
10	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,000
11	71 (58,0)	28 (50,0)	43 (66,2)	0,072
12	17 (13,8)	12 (21,4)	5 (7,7)	0,031
13	23 (18,7)	8 (14,5)	15 (23,1)	0,218
14	45 (40,5)	19 (33,9)	26 (40,0)	0,516
15	2,0 (2,0)	2 (4,1)	0 (0,0)	0,134
TOTAL	254 (15,0)	108 (6,4)	146 (8,6)	

* valor% referente ao total de pacientes avaliados por SNP

** valor% referente ao total de pacientes com variantes avaliados por grupo

A análise dos SNPs de forma individual, encontramos 254 variantes (15%) em 9 SNPs que se distribuíram entre os grupos: 108 no grupo controle (89 heterozigotos e 19 homozigotos mutados) e 146 no grupo de estudo (114 heterozigotos e 32 homozigotos mutados).

Os heterozigotos foram encontrados em 9 SNPs sendo 89 no grupo controle e 114 no grupo estudo. Os homozigotos mutados foram encontrados em apenas 6 desses 9 SNPs, sendo 19 no grupo controle e 32 no grupo estudo. (**Tabela 4, Tabela 5**).

Resultados**Tabela 4** – Visão geral das variantes dos SNPs e comparação entre os Grupo Controle e o Grupo de Estudo, mostrando sua divisão na variante heterozigoto mutado

SNP	Heterozigoto valor absoluto	Heterozigoto Grupo Controle valor absoluto (valor %*)	Heterozigoto Grupo Estudo valor absoluto (valor %*)
1	1	1 (1,7)	0 (0,0)
2	9	3 (5,4)	6 (9,3)
4	2	0 (0,0)	2 (3,1)
5	53	24 (24,4)	29 (46,0)
11	54	23 (32,2)	31 (39,0)
12	16	11 (13,1)	5 (7,7)
13	23	8 (14,5)	15 (23,1)
14	43	17 (30,3)	26 (40,0)
15	2	2 (4,1)	0 (0,0)
TOTAL	203 (80,0)	89 (35,0)	114 (45,0)

* valor % referente ao total de pacientes com variantes avaliados por grupo

Tabela 5 – Visão geral das variantes dos SNPs e comparação entre os Grupo Controle e o Grupo de Estudo, mostrando sua divisão na variante homozigoto mutado

SNP	Homozigoto valor absoluto	Homozigoto Grupo Controle valor absoluto (valor %*)	Homozigoto Grupo Estudo valor absoluto (valor %*)	p entre os grupos
1	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0,000
2	1	0 (0,0)	1 (3,9)	0,351
4	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0,000
5	30	11 (20,4)	19 (30,2)	0,227
11	17	5 (17,8)	12 (27,2)	0,132
12	1	1 (8,3)	0 (0,0)	0,280
13	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0,000
14	2	2 (3,6)	0 (0,0)	0,122
15	0	0 (0,0)	0 (0,0)	0,000
TOTAL	51 (20,0)	19 (7,5)	32 (12,5)	

* valor% referente ao total de pacientes com variantes avaliados por grupo

6. DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

As mulheres na pós-menopausa com fraturas do tornozelo têm deterioração na microarquitetura óssea e consequentemente diminuição da rigidez do osso em comparação com mulheres sem história de fratura. A presença dessas mudanças fornece evidências para uma generalizada diminuição da qualidade óssea em mulheres com fraturas de tornozelo. Esses achados colocam em questão a percepção de que as fraturas do tornozelo não estão relacionadas à osteoporose. Entretanto, os estudos recentes sugerem que a fratura de tornozelo com mecanismo de trauma de baixa energia em mulheres na pós-menopausa deve ter a mesma avaliação e tratamento para as fraturas osteoporóticas clássicas (punho, coluna, braço e quadril) (Stein et al., 2011).

Apesar de a DMO ser o “padrão-ouro” para a investigação da diminuição da densidade mineral óssea (Kanis, 1994), estudos têm sido publicados apontando que o risco de fratura poderia ocorrer mesmo com densitometria normal (Compston, 2010).

A compreensão completa do processo de remodelação óssea é fundamental para avaliar o valor e a interpretação dos resultados da densitometria óssea. O processo de remodelação óssea regula o ganho e a perda de densidade mineral óssea no esqueleto adulto e influencia diretamente a força óssea (Bellido, 2014).

O desenvolvimento do tecido ósseo começa no estágio fetal, juntamente com a hematopoiese da medula e evolui após o nascimento através de processos de modelagem que permitem a formação do osso adulto. A preservação da massa esquelética é então implementada por remodelação equilibrada, o que garante uma renovação contínua do tecido para permitir que suas propriedades mecânicas, estruturais e metabólicas permaneçam inalteradas até o envelhecimento ou até as doenças interromperem esse

equilíbrio. A homeostase esquelética é cumprida por células ósseas especializadas em associação com reguladores sistêmicos e locais (**Teti, 2011**).

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo constituído por um compartimento orgânico (matriz proteica e lipídeos), um compartimento inorgânico (minerais e água), uma importante rede vascular, nervos e pela medula óssea. A proporção entre os compartimentos orgânico e inorgânico é idade-dependente, mas de forma geral 50-70% da massa óssea é composta de minerais, 20-40% de matriz proteica, 10% de água e 3% de lipídeos. A matriz proteica é a principal responsável pelas características biomecânicas do tecido ósseo (flexibilidade e absorção das forças de tensão, organização estrutural, padrão de mineralização e reabsorção óssea), a parte mineral pela rigidez, a água pela nutrição contribuindo para a manutenção do fluxo de íons e os lipídeos controlam a mineralização da matriz. A integridade fisiológica das funções biomecânicas e metabólicas do tecido ósseo é o resultado de uma contínua interação entre: osteoblasto (correspondem de 4-6% da massa óssea e sua principal função é de formação óssea), osteoclasto (correspondem de 1-2% da massa óssea e sua principal função é de reabsorção óssea), e osteócito (correspondem de 90-95% da massa óssea e sua principal função é de regular o equilíbrio dinâmico entre osteoclasto e osteoblasto) (**Clarke, 2008**).

Para manter o processo de formação e remodelamento ósseo, as diferentes células ósseas comunicam-se, em especial, por meio da produção de moléculas sinalizadoras. Apesar de o osteoclasto e o osteoblasto se regularem mutuamente por meio de secreção de substâncias, a célula que coordena o processo é o osteócito. Durante muito tempo, os osteócitos foram considerados células estáticas e inativas, mas nos últimos anos, sugeriu-se que eles representam a principal célula para vários estímulos que regulam a formação e remodelação óssea, bem como um dos principais reguladores endócrinos do metabolismo ósseo (**Boyce e Xing, 2008; Neve et al., 2012**).

A ligação entre a formação e a reabsorção óssea está no processo dentro das unidades multicelulares básicas em que a reabsorção por osteoclastos é atendida pela geração de osteoblastos precursores e sua atividade formadora de osso, que precisa ser suficiente para substituir o osso perdido. Existem muitas fontes de atividades que contribuem para a ligação em locais de remodelação, incluindo fatores de crescimento liberados da matriz, produtos solúveis e membranas de osteoclastos e seus precursores, sinais de osteócitos e de células imunes e sinalização ocorrendo dentro da linhagem dos osteoblastos. A ligação é, portanto, um processo que envolve a interação de uma ampla gama de tipos de células e mecanismos de controle. Como a remodelação óssea ocorre em muitos locais de forma assíncrona em todo o esqueleto, as atividades geradas localmente compreendem mecanismos de controle muito importantes (**Sims e Martin, 2014**).

A descoberta do sistema **RANKL** (receptor ativador de NF- κ B-ligante) / **RANK** (receptor ativador de NF- κ B) / **OPG** (osteoprotegerina), em meados da década de 1990, levou a grandes avanços na compreensão de como a modelagem e remodelação óssea são reguladas. O que se sabia muitos anos antes dessa descoberta é que as células do estroma osteoblástico regulavam a formação de osteoclastos, mas não havia entendimento de que isso seria feito através da expressão de membros da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), o RANKL e OPG, ou que essas citocinas e sinalização através do RANK teriam funções extensas além da regulação do remodelamento ósseo. A sinalização RANKL / RANK regula a formação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos na modelagem e remodelamento ósseo normal e em uma variedade de condições patológicas caracterizadas por aumento da renovação (turnover) ósseo. A OPG protege os ossos da reabsorção excessiva por ligação ao RANKL, impedindo que ele se ligue ao RANK.

Assim, a concentração relativa de RANKL e OPG no osso é um importante determinante da massa e força óssea **(Boyce e Xing, 2008)**.

A via RANK/RANKL/OPG foi identificada como principal mediadora da osteoclastogênese. Essa interação promove diferenciação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos. Estudos demonstram que a relação RANK/OPG cria um ambiente pró-osteoclastogênico em torno de um microdano (após o dano inicial há formação óssea reparadora em 14 dias) **(Boyce e Xing, 2008)**.

Os osteócitos respondem a estímulos mecânicos produzindo e secretando várias moléculas de sinalização, como o óxido nítrico (NO) e a prostaglandina E2 (PGE2), que iniciam o remodelamento ósseo local. Além disso, eles podem controlar a formação óssea, modulando a via de sinalização da proteína do site de integração relacionado ao Wg (wingless que significa sem asas (o gene da drosófila), essa proteína é mais conhecida como WTN). Osteócitos também podem atuar como órgãos endócrinos liberando o fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF23) e fosfoproteína ácida da matriz dentinária (DMP-1), glicofosfoproteína da matriz extracelular (MEPE) e endopeptidase neutra reguladora de fosfato (PHEX) que regulam o metabolismo do fosfato **(Neve et al., 2012)**.

A regulação dos osteoblastos ocorre mediante a secreção dos moduladores PGE2 e NO que agem ativando a via da WNT. Essa via ocorre pela ligação a seus receptores de membrana pela proteína secretada relacionada ao receptor frizzled 1 (SFRP1) e pela proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade 5 ou 6 (LPR5 ou LPR6) que levam à ativação de mecanismos celulares que liberam a proteína β catetina. Essa proteína migra para o núcleo da célula e estimula a transcrição gênica que resulta na produção de múltiplos genes. Assim a β catenina age na diferenciação de células mesenquimais e sua diferenciação para osteoblastos com importante papel pelo aumento da expressão da OPG e, portanto, na relação OPG/RANKL levando à redução da

osteoclastogênese. A PG2 e o NO ativam a via WNT enquanto esclerostina (Scl), a proteína secretada relacionada ao dickkopf (DKK1) e agem inibindo-a (**Boyce e Xing, 2008**).

O remodelamento ósseo compreende duas fases: reabsorção inicial com posterior formação óssea. Durante essa transição os osteoclastos liberam substâncias que parecem ativar os osteoblastos. Os mecanismos que determinam a transição da reabsorção para a formação óssea ainda são alvo de intensa investigação.

Devido à remodelação óssea, cerca de 500mg de cálcio são liberados do osso e incorporados novamente ao longo do dia. Os receptores de paratormônio (PTH) e a vitamina $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ são estimulados quando as concentrações séricas de cálcio diminuem e estão presentes apenas nos osteoblastos. O PTH em combinação com a $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ aumentam a expressão do RANKL que ativam o RANK (localizado nos precursores de osteoclastos) estimulando a ativação, a migração e a fusão dos osteoclastos que geram reabsorção óssea e liberam cálcio sérico. O PTH também diminuiu a formação de OPG que deixa de se ligar ao RANKL impedindo a ativação do RANK (localizado nos precursores de osteoclastos). O cálcio, quando aumentado, inativa a secreção de calcitonina (presente nos osteoclastos) e inativa a reabsorção óssea (**Figura 2**).

Figura 2 – Processo de remodelação óssea

Fonte: Autor

Com esses conceitos atuais de fisiologia do metabolismo ósseo entendemos que o processo é o mesmo em todos os indivíduos, entretanto o que diferencia a qualidade óssea em última instância?

A dinâmica de aquisição de massa óssea e a manutenção de sua homeostase durante toda a fase da vida são processos regulados pela contínua e complexa interação entre fatores hormonais, genéticos e ambientais. O fator que pode ser determinante de provavelmente está associado ao genoma humano, visto que mutações em certas proteínas podem causar fraqueza no osso por atuar em sua fisiologia descrita acima (Clarke, 2008).

Os SNPs constituem um elemento-chave para compreendermos a variabilidade genética humana e sua associação com diversas doenças (1000 Genomes Project Consortium, 2015).

O receptor P2X7 é descrito na literatura envolvido na fisiologia do metabolismo ósseo como pró-osteogênico. Os efeitos inibidores mediados pelos receptores de P2X7 podem resultar em menor número de osteoclastos, proporcionando um mecanismo para a supressão da reabsorção óssea (**Gartland et al., 2003abc**). Quando há um polimorfismo do receptor P2X7 com perda de função (LOF) isso levará a um aumento da reabsorção óssea com consequente aumento do risco de fraturas, assim como o ganho de função (GOF) levará a uma supressão da reabsorção óssea com consequente diminuição do risco de fraturas.

A maioria dos estudos que correlacionam P2X7 com o metabolismo ósseo estão associados a mulheres europeias e americanas na pós-menopausa (**Ohlendorff et al., 2007; Nissen et al., 2009; Gartland et al., 2012; Jørgensen et al., 2012; Husted et al., 2013; Wesselius et al., 2013; Noronha-Matos et al., 2014**). Nosso estudo avaliou uma população diferente da maioria dos estudos publicados até então, pois foi realizado no Brasil. Em relação ao gênero, tivemos prevalência de 94 pacientes (77,7%) do sexo feminino (39 no grupo controle e 55 no grupo de estudo) e 27 pacientes (22,3%) do sexo masculino (17 no grupo controle e 10 no grupo de estudo), com $p=0,048$. Apesar da prevalência estatisticamente significativa do gênero feminino, isso se manteve quando os grupos foram avaliados em separado, no grupo controle tivemos 30,4% do gênero masculino e 69,9% feminino, e no grupo de estudo 15,4% masculino e 84,6% feminino. Portanto, os grupos são homogêneos e podem ser comparados entre si.

Os estudos citados acima avaliam as fraturas osteoporóticas de coluna e ou quadril, entretanto elas são fraturas tardias sinalizadoras da osteoporose. Na revisão da literatura apresentamos vários estudos que sugerem que a fratura de tornozelo no idoso é a fratura mais precoce indicativa de osteoporose, precedendo as fraturas de punho, quadril e coluna, mas isso ainda não foi comprovado (**Compston, 2010; Armstrong et al., 2012**).

Portanto, nosso estudo avaliou os pacientes portadores da fratura considerada a mais precoce preditiva de osteoporose, a fratura de tornozelo.

A literatura descreve alguns fatores de risco para fratura de tornozelo com trauma de baixa energia, dentre eles: tabagismo, IMC elevado, atividade física (em excesso ou falta) e diabetes mellitus (**Hasselmann et al., 2003; Urruela e Egol, 2011; Olsen et al., 2013**).

Em nossa casuística, todos os pacientes eram sedentários (não praticavam atividade física regularmente), não utilizavam nenhum medicamento para tratamento de osteoporose, nenhum paciente era tabagista e nenhum era diabético. Portanto, esses riscos para a fratura de tornozelo foram excluídos. Com relação ao IMC, o grupo controle apresentou uma média de 30,43 e o grupo de estudo uma média de 27,05, sem significância estatística entre os grupos, portanto não está correlacionado com o risco de fratura em questão.

Portanto, os grupos desse estudo eram homogêneos e a única diferença entre eles, com significado estatístico, foi em relação à DMO (visto que foi a partir dos resultados dela que se dividiu os 2 grupos). Os resultados da DMO foram: 56 pacientes (100%) do grupo controle com valores de normalidade (T score ≥ -1) e dos 65 pacientes do grupo controle, 49 (75,4%) apresentavam osteopenia com osteopenia (T score entre -1 e -2,5) e 16 (24,6%) apresentavam osteoporose (T score $\leq -2,5$).

Devido a isso, o grupo controle apresentou uma idade média de 62,7 anos e o de estudo de 74 anos, entretanto isso não interfere na análise estatística do DNA e é semelhante a outros estudos já publicados como o de (**Husted et al., 2013**), em que o grupo controle, com DMO normal, tinha uma idade média de 57 anos e o grupo de estudo com DMO alterada, tinha uma idade média de 64 anos.

Apesar de o grupo controle apresentar DMO normal, observamos que, com relação à análise dos SNPs variantes, não houve diferença estatística com o grupo de estudo. Esse dado corrobora a hipótese dos autores que sugeriram que a fratura de tornozelo no idoso é a fratura mais precoce indicativa de osteoporose mesmo com DMO normal (**Compston, 2010; Armstrong et al., 2012**) e com o fato de que na correção cirúrgica da fratura de tornozelo com trauma de baixa energia há uma dissociação clínico cirúrgica, ou seja, o paciente tem uma DMO normal, entretanto há dificuldade técnica para fixação da fratura devido à má qualidade óssea (**Johnell e Kanis, 2006; Kanis et al., 2013**).

Essa constatação se torna muito importante para os especialistas de pé e tornozelo visto que eles se tornam o elo inicial entre a cirurgia ortopédica e a alteração na densidade mineral óssea, e assim podem ter a possibilidade de identificar esses pacientes. E, por conseguinte, orientá-los ao tratamento relacionado à perda óssea e com isso diminuir o número de fraturas osteoporóticas de maior morbidade como quadril e coluna nesses pacientes. Essa ação tem impacto significativo na saúde pública, uma vez que, além de melhorar a qualidade de vida desses pacientes (impacto social) de forma preventiva diminuindo morbidade e mortalidade, atua também na diminuição de custos (impacto econômico) relacionados às internações, cirurgias, materiais de síntese e ou próteses e reabilitação das fraturas osteoporóticas subsequentes: punho, quadril e coluna. Vale a pena lembrar que em todo o mundo estimou-se cerca de nove milhões de fraturas osteoporóticas, sendo 25.000 fraturas por dia e uma a cada três segundos (**Johnell e Kanis, 2006; Kanis et al., 2013**).

Nas fraturas de tornozelo de baixa energia divididas em grupos pela estratificação da DMO (controle DMO normal e estudo DMO alterada) foi avaliado o P2X7 para tentar estabelecer correlação com a alteração do metabolismo ósseo determinada pela genética.

Para melhor entendimento, discutiremos a análise dos SNPs de forma agrupada e de forma individualizada.

A análise estatística agrupada demonstrou que se o gene tiver 4 ou mais SNPs com variantes dos 15 possíveis ele tem significância estatística e, portanto, ele está alterado com repercussão clínica relacionada ao polimorfismo, ou seja, aumento da reabsorção óssea com consequente aumento do risco de fraturas. Também observamos que quanto mais variantes se associam, maior a probabilidade da variante ter influência sobre o grupo de estudo, principalmente quando somados. Isso é concordante com a literatura, pois **(Gartland et al., 2012)** relatam em seu estudo que 4 polimorfismos do P2X7 combinados têm 9 vezes mais capacidade de induzir a perda óssea do que quando isolados.

A análise estatística individual dos SNPs demonstrou 255 variantes (15%) em 9 SNPs. Comparamos os nossos resultados dos SNPs onde encontramos variantes com os já publicados através da menor frequência global do alelo (Global MAF). Global MAF relata a menor frequência de alelo para cada SNP incluído em uma população global padrão e está sendo fornecido para distinguir o polimorfismo comum das variações raras, é ele é o segundo valor mais do alelo. Em outras palavras, se houver 3 alelos, com frequências de 0,50, 0,49 e 0,01, o MAF será relatado como 0,49. A população global padrão atual é de 1000 Genomes de dados de genótipo de fase 3 de 2500 indivíduos divulgados em todo o mundo **(The Genomes Project, 2015)**. Os valores de comparação do Global MAF do nosso estudo estão expressos no quadro 7.

Quadro 7 – Global MAF e casuística do estudo para os SNPs variantes

SNP	Global MAF %	Estudo Atual %
1	0,3	0,9
2	4,9	8,3
4	0,7	1,7
5	47,0	70,9
10	0,4	0,0
11	32,0	58,0
12	16,0	13,8
13	6,9	18,7
14	20,0	40,5
15	0,5	2,0

Fonte: (The Genomes Project, 2015)

Os valores do Global MAF para o P2X7 são de estudos em populações homogêneas, vale a pena ressaltar que nosso estudo é em população heterogênea (população brasileira).

O SNP 1 (0,9%) é relatado como LOF (**Husted et al., 2013**). Esse SNP variante tem prevalência mundial de 0,3%. Em nossa casuística, houve uma alteração, somente no grupo de controle, mas não foi estatisticamente significativa $p=1,00$. Devido ao pequeno número de alterações, perde-se a força de análise, mas pode estar correlacionado com perda de função, o que estaria de acordo com a literatura.

SNP 2 apresentou em nossa casuística 10 (8,3%) alterações, em ambos os grupos, mas não foi estatisticamente significativa $p=0,337$. Esse SNP variante tem prevalência mundial de 4,9%. Devido ao pequeno número de alterações perde-se a força de análise, mas pode estar correlacionado com perda de função.

O SNP 4 é relatado como LOF (**Husted et al.; Wesselius et al., 2013**). Esse SNP variante tem prevalência mundial de 0,7%. Em nossa casuística houve 2 (1,7%) alterações, somente no grupo de estudo, mas não foi estatisticamente significativa

$p=0,499$. Devido ao pequeno número de alterações, perde-se a força de análise, mas pode estar correlacionado com perda de função, o que estaria de acordo com a literatura.

O SNP 5 é relatado como LOF (**Husted et al., 2013**). Esse SNP variante tem prevalência mundial de 47%. Em nossa casuística houve 83 (70,9%) alterações, em ambos os grupos, mas não foi estatisticamente significativa $p=0,221$. Devido ao pequeno número de alterações, perde-se a força de análise, entretanto como nossa casuística é de mais mulheres, esse polimorfismo pode sugerir perda de função em mulheres ou talvez não tenha influência no metabolismo ósseo por ser muito frequente em nossa população (70,9% e na mundial é de 47%).

O SNP 10 é relatado como LOF (**Gartland et al., 2012; Jørgensen et al., 2012**). Esse SNP variante tem prevalência mundial de 0,4%. Em nossa casuística não houve nenhuma alteração, apesar de ser rara, nossa população do estudo é toda de fratura com trauma de baixa energia o que sugere que este SNP funcional não tem influência na população brasileira.

O SNP 11 é relatado como GOF (**Jørgensen et al., 2012; Husted et al., 2013; Wesselius et al., 2013; Varley et al., 2016**). Esse SNP variante tem prevalência mundial de 32%. Em nossa casuística houve 72 (58%) alterações, em ambos os grupos, mas não foi estatisticamente significativa $p=0,066$. Entretanto, nossa população do estudo é toda de fratura com trauma de baixa energia, o que sugere que esse SNP funcional não tem influência de ganho de função na população brasileira.

O SNP 12 apresentou em nossa casuística 17 (13,8%) alterações, em ambos os grupos, e foi estatisticamente significativa $p=0,038$. Esse SNP variante tem prevalência mundial de 16%. Nossa população do estudo é toda de fratura com trauma de baixa energia sugerindo que esse SNP funcional tem influência na perda de função na população do estudo.

O SNP 13 é relatado como GOF (**Jørgensen et al., 2012; Husted et al., 2013; Wesselius et al., 2013; Varley et al., 2016**). Esse SNP variante tem prevalência mundial de 6,9%. Em nossa casuística houve 23 (18,7%) alterações, em ambos os grupos, mas não foi estatisticamente significativa $p=0,252$. Entretanto, nossa população do estudo é toda de fratura com trauma de baixa energia o que sugere que esse SNP funcional não tem influência de ganho de função na população brasileira.

O SNP 14 é relatado como LOF (**Ohlendorff et al., 2007; Husted et al., 2013; Wesselius et al., 2013; Varley et al., 2016**). Esse SNP variante tem prevalência mundial de 20%. Em nossa casuística houve 45(40,5%) alterações, em ambos os grupos, mas não foi estatisticamente significativa $p=0,564$. Devido ao pequeno número de alterações, perde-se a força de análise, mas pode estar correlacionado com perda de função, o que estaria de acordo com a literatura.

O SNP 15 é relatado como LOF (**Jørgensen et al., 2012**). Esse SNP variante tem prevalência mundial de 0,5%. Em nossa casuística houve 2 (2%) alterações, somente no grupo de controle, mas não foi estatisticamente significativa $p=0,224$. Devido ao pequeno número de alterações, perde-se a força de análise, mas pode estar correlacionado com perda de função, o que estaria de acordo com a literatura.

O poder do estudo foi adequado para detectar efeitos de polimorfismos comuns em P2X7 nos pacientes portadores de fratura de tornozelo, mas o poder de detectar a intensidade dos efeitos para os polimorfismos raros foi limitado pelo número pequeno de nossa amostra.

A literatura mundial refere que os SNPs 1, 4, 14 e 15 são relatados como LOF, ou seja, predisõem a perda óssea. Apesar de nossa casuística não ter sido estatisticamente significativa, devido ao pequeno número de alterações, não podemos certificar, mas sim

sugerir que a população do nosso estudo estaria de acordo com a literatura, visto que nossa população do estudo é toda de fratura com trauma de baixa energia.

A literatura mundial refere que o SNP 5 é relatado como LOF, ou seja, predispõe a perda óssea. Apesar de nossa casuística não ter sido estatisticamente significativa ($p=0,221$), não podemos certificar, mas sim sugerir que a população do nosso estudo estaria de acordo com a literatura. Em contrapartida, surge uma questão que deve ser discutida, pois a nossa população do estudo é toda de fratura com trauma de baixa energia e a prevalência desse polimorfismo na população estudada (70,9%) é muito maior que na população mundial (47%), o que nos sugere que esse SNP não tenha influência no metabolismo ósseo na população do estudo. Para confirmar isso precisaríamos da frequência desse SNP na população brasileira normal (ou seja, sem fraturas).

A literatura mundial refere que os SNPs 11 e 13 são relatados como GOF, ou seja, protegem da perda óssea. Apesar de nossa casuística não ter sido estatisticamente significativa ($p=0,06$ para SNP 11 e $0,252$ para SNP 13) não podemos certificar, mas sim sugerir que a população do nosso estudo não estaria de acordo com a literatura. Visto que nossa população do estudo é toda de fratura com trauma de baixa energia, o que sugere que esse SNP seria perda de função nessa população.

A literatura mundial não cita a expressão do RNA para o SNP 12, portanto não sabemos se ele é perda ou ganho de função, e em nossa casuística foi estatisticamente significativa ($p=0,038$). Esse SNP variante tem prevalência mundial de 16% e em nosso estudo tivemos de 13,8%. Como nossa população do estudo é toda de fratura com trauma de baixa energia, sugere que esse SNP funcional seria perda de função na população brasileira. Para confirmar isso precisaríamos validar esses resultados através da expressão do RNA desse SNP.

Podemos ressaltar como limitação do nosso estudo o fato de termos nos concentrado principalmente em polimorfismos não sinônimos que não cobrem toda a variação genética em P2X7, portanto, não podem ser excluídos polimorfismos adicionais incluindo polimorfismos regulatórios comuns que podem contribuir para a influência genética do P2X7 na osteoporose. Outra limitação seria o número pequeno de participantes quando comparado com a literatura mundial que variou de 210 no grupo de militares (Varley et al., 2016) a 1764 do grupo de mulheres dinamarquesas na pós-menopausa (Ohlendorff et al., 2007).

Em contrapartida, um dos pontos fortes do nosso estudo é ser o primeiro a avaliar um grupo de pacientes do Brasil, sendo que os demais avaliaram basicamente a população do norte da Europa (em especial a Dinamarca) (Ohlendorff et al., 2007; Nissen et al., 2009; Jørgensen et al., 2012; Husted et al., 2013; Wesselius et al., 2013; Noronha-Matos et al., 2014). Além de avaliar uma população diferente, sabemos que a população do norte da Europa é mais homogênea geneticamente em comparação à população brasileira, que é bastante heterogênea do ponto de vista genético devido à nossa miscigenação. Portanto, quando avaliamos os polimorfismos isso torna nossa população uma base boa de estudo e com um significado que os resultados podem ser utilizados não apenas para ser o referencial para nosso país e sim para a maioria dos países. Outro ponto forte do nosso estudo é que a osteoporose secundária foi excluída e, portanto, excluímos fatores que poderiam confundir a avaliação da perda óssea.

Em última análise, o receptor de nucleotídeos P2X7 é um canal iônico controlado por ATP que desempenha um papel importante na função das células ósseas. Uma vez que a perda óssea devido à reabsorção mediada por osteoclastos representa um dos principais problemas não resolvidos em desordens osteopênicas, a identificação de

moléculas capazes de induzir apoptose de osteoclastos é de grande interesse para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (**Penolazzi et al., 2005**).

Em nosso estudo atingimos o objetivo inicial, ou seja, avaliamos os polimorfismos funcionais em P2X7 e identificamos que eles estão associados a perda óssea e ao risco de osteoporose em pacientes com fraturas de tornozelo acima de 50 anos de idade.

7. CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, o polimorfismo do SNP 12 em P2X7 está associado à perda óssea e ao risco de osteoporose em pacientes com fraturas de tornozelo acima de 50 anos de idade.

8. *ANEXOS*

Anexo A – Aprovação do protocolo de pesquisa do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP – FMUSP)

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 26/08/2015, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 340/15 intitulado: “ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO RECEPTOR P2X7 COM A DENSIDADE MINERAL ÓSSEA E FRATURAS MALEOLARES EM PACIENTES IDOSOS” apresentado pelo Departamento de ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Prof.Dr.Tulio Diniz Fernandes

Pesquisador (a) Executante: Dra.Kelly Cristina Stéfani

CEP-FMUSP, 26 de Agosto de 2015.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo B – Termo de outorga do auxílio FAPESP, Processo 2016/04510-1

Para uso exclusivo da FAPESP
 Processo: 2016/04510-1
 Data impressão: 20/09/2016 10:45:39
 Folha: _____
 Volume: _____
 Rubrica: _____

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIOS
 PROCESSO 2016/04510-1

Pelo presente instrumento, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com sede na Rua Pio XI, nº 1.500, Alto da Lapa, São Paulo, Capital, inscrita no CNPJ/MF sob nº 43.828.151/0001-45, doravante denominada OUTORGANTE, por meio de seu Conselho Técnico-Administrativo, nos termos do Artigo 14, letra "b", da Lei Estadual nº 5.918, de 18 de outubro de 1960, concede ao OUTORGADO, a seguir qualificado, Auxílio para a realização do Projeto de Pesquisa a seguir especificado, nas instalações e com o apoio da INSTITUIÇÃO SEDE, de acordo com as especificações, cláusulas e condições descritas a seguir e nos Anexos, que passam a ser parte integrante deste Termo.

1.OUTORGADO:	TULIO DINIZ FERNANDES CPF: 074.059.408-70 RG: 6162658-SSP/SP
2.Correspondência:	A/C VALQUIRIA MENDES, Rua Doutor Ovídio Pires de Campos, 333 - 3 ANDAR - SALA B 305, Cerqueira César, São Paulo/SP, CEP 05403-010 maria.emerick@hc.fm.usp.br
3.Instituição Sede:	Faculdade de Medicina/FM Universidade de São Paulo/USP
4.Projeto de Pesquisa:	Associação do Polimorfismo do Receptor P2x7 com a Densidade Mineral Óssea e Fraturas Maleolares em Pacientes Idosos
5.Linha de Fomento:	Programas Regulares / Auxílios a Pesquisa / Projeto de Pesquisa / Projeto de Pesquisa - Regular
6.Área/Subárea:	Medicina Cirurgia
7.Coordenação:	Saúde I
8.Periodo da Vigência:	01/10/2016 a 30/09/2018
9.Relatórios Científicos:	30/09/2017, 30/10/2018
10.Prestações de Contas:	30/09/2017, 30/10/2018

Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO RECEPTOR P2X7 COM A DENSIDADE MINERAL ÓSSEA E FRATURAS MALEOLARES EM PACIENTES IDOSOS

PESQUISADOR: DRA. KELLY CRISTINA STÉFANI

CARGO/FUNÇÃO: MÉDICA DO GRUPO DE PÉ E TORNOZELO DO HSPE

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 82.117

UNIDADE DO HCFMUSP: IOT

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 1 ANO

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

1 – Desenho do estudo e objetivo(s) “essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa: “ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO RECEPTOR P2X7 COM A DENSIDADE MINERAL ÓSSEA E FRATURAS MALEOLARES EM PACIENTES IDOSOS.”

2 – Será feita uma coleta da saliva para estudo do DNA nela contido para correlacionar com o risco de osteoporose durante a entrevista dos voluntários pelo pesquisador responsável.

3 – Será realizada uma densitometria óssea no Hospital do Servidor Público Estadual para classificação de osteoporose seguindo os critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde em 1994.

4 – Não há nenhum risco da coleta da saliva e da execução da densitometria óssea.

5 – Trata-se de estudo experimental testando a hipótese de que pacientes idosos que sofreram fratura de tornozelo possuem densidade mineral óssea alterada e, portanto, possuem risco de novas fraturas. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício da avaliação do polimorfismo do receptor P2X7 para tratamento preventivo de osteopenia e osteoporose em pacientes idosos, diminuindo assim a incidência de fraturas nesse grupo e assim suas comorbidades associadas.

6 – Não há procedimentos alternativos.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Kelly Cristina Stéfani que pode ser encontrada no endereço Avenida Ibirapuera, 1777 Telefone(s) 4573-8271. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP): **Av. Dr. Arnaldo, 251 - Cerqueira César - São Paulo - SP -21º andar – sala 36- CEP: 01246-000** Tel: 3893-4401/4407. E-mail: cep.fm@usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

“Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO RECEPTOR P2X7 COM A DENSIDADE MINERAL ÓSSEA E FRATURAS MALEOLARES EM PACIENTES IDOSOS”

Eu discuti com a Dra. Kelly Crsitina Stéfani sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

Anexo D – Pacientes do grupo controle

Número	RG	IDADE	PESO	ALTURA	IMC	Tscore L1-L4	Tscore COLO FÊMUR	DMO
1	1270039	75	72	1,50	32,0	-0,4	-0,9	Normal
2	2118883	74	71	1,50	31,6	1,5	-0,9	Normal
3	1034756	64	73	1,64	27,1	-0,6	-0,4	Normal
4	1592455	77	85	1,66	30,8	2,9	-0,3	Normal
5	1293667	72	82	1,86	23,7	0,9	-0,9	Normal
6	1250474	67	82	1,74	27,1	0,0	1,1	Normal
7	1180605	79	83	1,72	28,1	-0,9	-0,7	Normal
8	1158620	79	63	1,46	29,6	0,4	0,8	Normal
9	1446570	70	75	1,56	30,8	-0,5	-0,2	Normal
10	1519227	25	70	1,63	26,3	0,4	0,4	Normal
11	1125996	69	89	1,63	33,5	-0,3	-0,4	Normal
12	1300187	70	98	1,65	36,0	1,4	0,2	Normal
13	1453740	71	85	1,67	30,5	0,4	0,4	Normal
14	1009506	67	62	1,53	26,5	-0,2	-0,8	Normal
15	1421143	67	99	1,69	34,7	1,8	0,3	Normal
16	1800971	79	94	1,60	36,7	-0,4	-0,9	Normal
17	1526781	71	89	1,75	29,1	1,8	-0,9	Normal
18	1299724	76	76	1,63	28,6	-0,2	-0,7	Normal
19	1105808	65	78	1,55	32,5	0,2	0,0	Normal
20	1344549	73	98	1,80	30,2	4,4	-0,9	Normal
21	2155271	72	80	1,64	29,7	0,2	-0,3	Normal
22	2071639	64	70	1,68	24,8	-0,4	-0,5	Normal
23	1487451	61	65	1,67	23,3	-0,6	-0,8	Normal
24	1513306	56	93	1,67	33,3	1,1	-0,3	Normal
25	1142972	53	68	1,57	27,6	3,5	1,1	Normal
26	1719019	53	70	1,60	27,3	1,2	1,0	Normal
27	1560653	62	95	1,58	38,1	-0,1	0,6	Normal
28	2111449	67	71	1,71	24,3	0,6	-0,5	Normal
29	1404842	61	104	1,66	37,7	0,0	-0,7	Normal
30	1417857	53	57	1,54	24,0	0,5	-0,4	Normal
31	1862088	67	88	1,60	34,4	-0,2	0,2	Normal
32	1446959	62	68	1,70	23,5	-0,9	0,0	Normal
33	1275395	55	75	1,69	26,3	1,3	1,0	Normal
34	1030830	52	83	1,57	33,7	1,5	1,2	Normal
35	1151251	71	96	1,50	42,7	-0,3	-0,2	Normal
36	12553691	60	80	1,65	29,4	-0,3	-0,1	Normal
37	1199131	51	70	1,71	23,9	0,4	0,6	Normal
38	1221464	52	74	1,72	25,0	0,5	-0,3	Normal
39	2222314	53	78	1,60	30,5	-0,1	-0,4	Normal
40	2172829	54	67	1,65	24,6	-0,3	-0,5	Normal
41	1041528	59	61	1,69	21,4	1,3	1,4	Normal
42	2204197	61	81	1,56	33,3	-0,9	-0,9	Normal
43	1620396	61	110	1,60	43,0	0,1	-0,8	Normal
44	1715803	51	105	1,63	39,5	-0,1	-0,1	Normal
45	1046830	83	104	1,59	41,1	3,9	-0,5	Normal

continua

Anexos

continuação								
Número	RG	IDADE	PESO	ALTURA	IMC	Tscore L1-L4	Tscore COLO FÊMUR	DMO
46	2158577	58	76	1,55	31,6	-0,9	-0,4	Normal
47	1123734	66	85	1,76	27,4	-0,9	-0,3	Normal
48	1194625	56	68	1,72	23,0	2,8	3,9	Normal
49	1373361	56	56	1,48	25,6	2,5	0,2	Normal
50	1130254	58	110	1,65	40,4	-0,8	-0,5	Normal
51	1118205	58	82	1,75	26,8	0,6	-0,7	Normal
52	1318627	53	85	1,65	31,2	1,6	0,6	Normal
53	1818950	56	68	1,56	27,9	-0,6	0,8	Normal
54	1362077	55	92	1,75	30,0	-0,9	-0,9	Normal
55	1294105	59	90	1,80	27,8	1,0	-0,2	Normal
56	1069375	53	110	1,57	44,6	0,1	0,3	Normal
conclusão								

Anexo E – Pacientes do grupo de estudo

Número	RG	IDADE	PESO	ALTURA	IMC	Tscore L1-L4	Tscore colo fêmur	DMO
1	1427968	69	67	1,53	28,6	-2,2	-1,9	Osteopenia
2	1522630	71	58	1,53	24,8	-1,3	-1,8	Osteopenia
3	1826802	77	66	1,62	25,1	-3,2	-2,2	Osteoporose
4	1403775	74	42	1,36	22,7	-3,6	-1,9	Osteoporose
5	1906326	72	50	1,50	22,2	-2,9	-1,5	Osteoporose
6	1081752	68	67	1,58	26,8	-2,4	-1,2	Osteopenia
7	2161253	65	63	1,65	23,1	-1,8	-0,6	Osteopenia
8	1171885	78	62	1,62	23,6	-4,5	-1,9	Osteoporose
9	1911670	62	75	1,54	31,6	-0,9	-1,7	Osteopenia
10	1839380	69	64	1,53	27,3	-1,6	-0,8	Osteopenia
11	1799064	65	72	1,73	24,1	-0,1	-1,8	Osteopenia
12	1146576	59	65	1,52	28,1	-3,5	-1,6	Osteoporose
13	1166231	86	65	1,65	23,9	-2,2	-1,5	Osteopenia
14	1355093	80	80	1,55	33,3	1,7	-1,5	Osteopenia
15	2067815	69	67	1,68	23,7	-0,9	-1,6	Osteopenia
16	1668394	84	75	1,50	33,3	0,2	-2,0	Osteopenia
17	1283215	71	73	1,68	25,9	-1,3	-2,5	Osteoporose
18	1172981	71	68	1,62	25,9	-1,5	-1,4	Osteopenia
19	2232374	76	74	1,59	29,3	-2,1	-1,2	Osteopenia
20	2064789	79	85	1,65	31,2	-3,3	-1,4	Osteoporose
21	1884666	67	62	1,61	23,9	-2,1	-1,1	Osteopenia
22	1432644	84	67	1,47	29,4	-3,3	-2,7	Osteoporose
23	1140671	75	61	1,53	26,1	-0,7	-0,5	Osteopenia
24	1252600	86	71	1,58	28,4	-3,6	-3,3	Osteoporose
25	1357791	67	80	1,65	29,4	-1,2	-0,1	Osteopenia
26	132797	79	55	1,55	22,9	-1,0	-2,2	Osteopenia
27	1360542	66	99	1,69	34,7	0,3	-1,2	Osteopenia
28	1238820	84	83	1,62	31,6	-2,4	-1,6	Osteopenia
29	1343482	83	74	1,65	27,2	-1,0	-1,2	Osteopenia
30	1671813	65	73	1,56	30,0	-1,4	-0,9	Osteopenia
31	1542177	65	83	1,67	29,8	-1,0	-1,7	Osteopenia
32	2000848	71	80	1,65	29,4	-1,5	-1,0	Osteopenia
33	1077200	65	78	1,65	28,7	-2,2	-1,2	Osteopenia
34	1697327	74	56	1,52	24,2	-0,9	-2,5	Osteoporose
35	1623472	88	74	1,68	26,2	-1,3	-2,6	Osteoporose
36	1394511	71	58	1,55	24,1	-0,9	-1,6	Osteopenia
37	1318582	74	70	1,62	26,7	-1,6	-1,4	Osteopenia
38	1236239	78	76	1,68	26,9	-1,3	,2,2	Osteopenia
39	2014304	62	85	1,67	30,5	-1,7	-0,6	Osteopenia
40	1185134	74	67	1,54	28,3	-1,4	-1,4	Osteopenia
41	1402289	90	57	1,50	25,3	-1,9	-1,8	Osteopenia
42	1287562	77	62	1,50	27,6	-1,2	-1,2	Osteopenia
43	1313695	87	91	1,70	31,5	1,7	-1,5	Osteopenia
44	1466695	76	80	1,55	33,3	-3,7	-2,3	Osteoporose
45	2173323	78	65	1,55	27,1	-3,1	-2,4	Osteoporose

continua

Anexos

								continuação
Número	RG	IDADE	PESO	ALTURA	IMC	Tscore L1-L4	Tscore colo fêmur	DMO
46	1207566	69	58	1,56	23,8	-2,0	-1,5	Osteopenia
47	1277915	88	80	1,60	31,3	-0,8	-2,1	Osteopenia
48	1408062	81	80	1,73	26,7	-0,8	-1,0	Osteopenia
49	1731559	75	56	1,53	23,9	-1,1	-2,7	Osteoporose
50	1831158	73	71	1,65	26,1	-2,4	-1,4	Osteopenia
51	1373933	79	74	1,60	28,9	-2,0	-2,1	Osteopenia
52	112356	82	60	1,68	21,3	-2,2	-2,3	Osteopenia
53	1795049	72	85	1,69	29,8	-0,9	-1,5	Osteopenia
54	1838916	70	86	1,77	27,5	-0,6	-1,0	Osteopenia
55	1092434	73	68	1,70	23,5	-1,9	-0,9	Osteopenia
56	1229058	74	70	1,65	25,7	-2,5	-1,8	Osteoporose
57	2040766	68	76	1,70	26,3	0,4	-1,4	Osteopenia
58	2015818	71	65	1,55	27,1	-1,1	-1,3	Osteopenia
59	1604188	88	75	1,60	29,3	-1,5	-1,4	Osteopenia
60	2134989	74	60	1,56	24,7	-3,1	-2,6	Osteoporose
61	1547750	66	62	1,59	24,5	0,0	-1,4	Osteopenia
62	1532976	68	73	1,65	26,8	-1,4	-1,5	Osteopenia
63	1453254	90	61	1,58	24,4	2,6	-2,3	Osteopenia
64	1523286	65	110	1,65	40,4	0,1	-1,2	Osteopenia
65	2121448	53	83	1,75	27,1	-2,3	-0,4	Osteopenia
								conclusão

9. REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Altshuler D, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, Hurles ME, McVean GA. Genomes Project C, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010;467(7319):1061-73.

1000 Genomes Project Consortium, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74.

Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther*. 1994;64(3):445-75.

Agrawal A, Gartland A. P2X7 receptors: role in bone cell formation and function. *J Mol Endocrinol*. 2015;54(2):R75-88.

Armstrong ME, Cairns BJ, Banks E, Green J, Reeves GK, Beral V. Different effects of age, adiposity and physical activity on the risk of ankle, wrist and hip fractures in postmenopausal women. *Bone*. 2012;50(6):1394-400.

Baim S, Wilson CR, Lewiecki EM, Luckey MM, Downs RW, Jr., Lentle BC. Precision assessment and radiation safety for dual-energy X-ray absorptiometry: position paper of the International Society for Clinical Densitometry. *J Clin Densitom*. 2005;8(4):371-8.

Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif Tissue Int.* 2014;94(1):25-34.

Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008;473(2):139-46.

Buell GN, Talabot F, Gos A, Lorenz J, Lai E, Morris MA, et al. Gene structure and chromosomal localization of the human P2X7 receptor. *Receptors Channels.* 1998;5(6):347-54.

Burnstock G. Overview. Purinergic mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;603:1-17

Burnstock G. Purinergic nerves and receptors. *Prog Biochem Pharmacol.* 1980;16:141-54.

Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.* 1972;24(3):509-81.

Camacho PM, Petak SM, Binkley N, Clarke BL, Harris ST, Hurley DL, et al. American association of clinical endocrinologists and american college of endocrinology clinical practice guidelines for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis - 2016--executive summary. *Endocr Pract.* 2016;22(9):1111-8.

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

Collo G, Neidhart S, Kawashima E, Kosco-Vilbois M, North RA, Buell G. Tissue distribution of the P2X7 receptor. *Neuropharmacology*. 1997;36(9):1277-83.

Compston J. Osteoporosis: social and economic impact. *Radiol Clin North Am*. 2010;48(3):477-82.

Court-Brown CM, Bugler KE, Clement ND, Duckworth AD, McQueen MM. The epidemiology of open fractures in adults. A 15-year review. *Injury*. 2012;43(6):891-7.

Court-Brown CM, McBirnie J, Wilson G. Adult ankle fractures--an increasing problem? *Acta Orthop Scand*. 1998;69(1):43-7.

Deepak S, Kottapalli K, Rakwal R, Oros G, Rangappa K, Iwahashi H, et al. Real-time PCR: revolutionizing detection and expression analysis of genes. *Curr Genomics*. 2007;8(4):234-51.

Egol KA, Tejwani NC, Walsh MG, Capla EL, Koval KJ. Predictors of short-term functional outcome following ankle fracture surgery. *J Bone Joint Surg Am*. 2006;88(5):974-9.

Fernandes TD. *Tendinopatia do tendão do músculo tibial posterior*: análise da associação do haplótipo dos polimorfismos funcionais das metaloproteinases 1 e 8 com as alterações da composição tecidual dos colágenos tipos I, III e V na matriz extracelular [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Fogel GR, Morrey BF. Delayed open reduction and fixation of ankle fractures. *Clin Orthop Relat Res.* 1987(215):187-95.

Fondevila M, Borsting C, Phillips C, de la Puente M, Consortium EN, Carracedo A, et al. Forensic SNP genotyping with SNaPshot: Technical considerations for the development and optimization of multiplexed SNP assays. *Forensic Sci Rev.* 2017;29(1):57-76.

Gartland A, Buckley KA, Bowler WB, Gallagher JA. Blockade of the pore-forming P2X7 receptor inhibits formation of multinucleated human osteoclasts in vitro. *Calcif Tissue Int.* 2003a;73(4):361-9.

Gartland A, Buckley KA, Hipkind RA, Bowler WB, Gallagher JA. P2 receptors in bone--modulation of osteoclast formation and activity via P2X7 activation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2003b;13(2-4):237-42.

Gartland A, Buckley KA, Hipkind RA, Perry MJ, Tobias JH, Buell G, et al. Multinucleated osteoclast formation in vivo and in vitro by P2X7 receptor-deficient mice. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2003c;13(2-4):243-53.

Gartland A, Skarratt KK, Hocking LJ, Parsons C, Stokes L, Jørgensen NR, et al. Polymorphisms in the P2X7 receptor gene are associated with low lumbar spine bone mineral density and accelerated bone loss in post-menopausal women. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(5):559-64.

Greenfield DM, Eastell R. Risk factors for ankle fracture. *Osteoporos Int.* 2001;12(2):97-103.

Habermacher C, Dunning K, Chataigneau T, Grutter T. Molecular structure and function of P2X receptors. *Neuropharmacology.* 2016;104:18-30.

Hasselman CT, Vogt MT, Stone KL, Cauley JA, Conti SF. Foot and ankle fractures in elderly white women. Incidence and risk factors. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85(5):820-4.

Husted LB, Harsløf T, Stenkjær L, Carstens M, Jørgensen NR, Langdahl BL. Functional polymorphisms in the P2X7 receptor gene are associated with osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2013;24(3):949-59.

Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporos Int.* 2006;17(12):1726-33.

Jørgensen NR, Husted LB, Skarratt KK, Stokes L, Tofteng CL, Kvist T, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the P2X7 receptor gene are associated with postmenopausal bone loss and vertebral fractures. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(6):675-81.

Jørgensen NR, Syberg S, Ellegaard M. The role of P2X receptors in bone biology. *Curr Med Chem.* 2015;22(7):902-14.

Kanis JA, Adachi JD, Cooper C, Clark P, Cummings SR, Diaz-Curiel M, et al. Standardising the descriptive epidemiology of osteoporosis: recommendations from the Epidemiology and Quality of Life Working Group of IOF. *Osteoporos Int.* 2013;24(11):2763-4.

Kanis JA. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int.* 1994;4(6):368-81

Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet.* 2002;359(9321):1929-36.

Kannus P, Palvanen M, Niemi S, Parkkari J, Jarvinen M. Increasing number and incidence of low-trauma ankle fractures in elderly people: Finnish statistics during 1970-2000 and projections for the future. *Bone.* 2002;31(3):430-3.

Kannus P, Parkkari J, Niemi S, Palvanen M. Epidemiology of osteoporotic ankle fractures in elderly persons in Finland. *Ann Intern Med.* 1996;125(12):975-8.

Ke HZ, Qi H, Weidema AF, Zhang Q, Panupinthu N, Crawford DT, et al. Deletion of the P2X7 nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption. *Mol Endocrinol.* 2003;17(7):1356-67.

Kellis M, Wold B, Snyder MP, Bernstein BE, Kundaje A, Marinov GK, et al. Defining functional DNA elements in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(17):6131-8.

Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res*. 2002;12(6):996-1006.

Korcok J, Raimundo LN, Ke HZ, Sims SM, Dixon SJ. Extracellular nucleotides act through P2X7 receptors to activate NF-kappaB in osteoclasts. *J Bone Miner Res*. 2004;19(4):642-51.

Kvist TM, Schwarz P, Jørgensen NR. The P2X7 receptor: a key player in immune-mediated bone loss? *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:954530.

Li J, Meyer R, Duncan RL, Turner CH. P2X7 nucleotide receptor plays an important role in callus remodeling during fracture repair. *Calcif Tissue Int*. 2009;84(5):405-12.

Lou C, Cong B, Li S, Fu L, Zhang X, Feng T, et al. A SNaPshot assay for genotyping 44 individual identification single nucleotide polymorphisms. *Electrophoresis*. 2011;32(3-4):368-78

Miga KH, Newton Y, Jain M, Altemose N, Willard HF, Kent WJ. Centromere reference models for human chromosomes X and Y satellite arrays. *Genome Res*. 2014;24(4):697-707.

Naemsch LN, Dixon SJ, Sims SM. Activity-dependent development of P2X₇ current and Ca²⁺ entry in rabbit osteoclasts. *J Biol Chem*. 2001;276(42):39107-14.

Nagai H, Murakami Y, Yokoyama K, Tamiya E. High-throughput PCR in silicon based microchamber array. *Biosens Bioelectron*. 2001;16(9-12):1015-9.

NCBI Resource Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D7-17.

Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteocytes: central conductors of bone biology in normal and pathological conditions. *Acta Physiol (Oxf)*. 2012;204(3):317-30.

Nissen N, Madsen JS, Bladbjerg EM, Beck Jensen JE, Jørgensen NR, Langdahl B, et al. No association between hip geometry and four common polymorphisms associated with fracture: the Danish osteoporosis prevention study. *Calcif Tissue Int*. 2009;84(4):276-85.

Noronha-Matos JB, Coimbra J, Sá-e-Sousa A, Rocha R, Marinhos J, Freitas R, et al. P2X₇-induced zeiosis promotes osteogenic differentiation and mineralization of postmenopausal bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *FASEB J*. 2014;28(12):5208-22.

North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*. 2002;82(4):1013-67.

Ohlendorff SD, Tofteng CL, Jensen JE, Petersen S, Civitelli R, Fenger M, et al. Single nucleotide polymorphisms in the P2X7 gene are associated to fracture risk and to effect of estrogen treatment. *Pharmacogenet Genomics*. 2007;17(7):555-67.

Olsen JR, Hunter J, Baumhauer JF. Osteoporotic ankle fractures. *Orthop Clin North Am*. 2013;44(2):225-41.

Orriss IR, Burnstock G, Arnett TR. Purinergic signalling and bone remodelling. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10(3):322-30.

Pasqualetto G, Brancale A, Young MT. The Molecular Determinants of Small-Molecule Ligand Binding at P2X Receptors. *Front Pharmacol*. 2018;9:58.

Penolazzi L, Bianchini E, Lambertini E, Baraldi PG, Romagnoli R, Piva R, et al. N-Arylpiperazine modified analogues of the P2X7 receptor KN-62 antagonist are potent inducers of apoptosis of human primary osteoclasts. *J Biomed Sci*. 2005;12(6):1013-20.

Qiagen. *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook*: for DNA purification from whole blood, plasma, serum, buffy coat, lymphocytes, dried blood spots (QIAamp DNA Mini Kit only), body fluids, cultured cells, swabs, and tissue (QIAamp DNA Mini Kit only). 5ed. Venlo, Netherlands: Qiagen; 2016; p.1-70.

Quek K, Nones K, Patch AM, Fink JL, Newell F, Cloonan N, et al. A workflow to increase verification rate of chromosomal structural rearrangements using high-throughput next-generation sequencing. *Biotechniques*. 2014;57(1):31-8.

Rockwood CA, Green D, Bucholz R. *Fraturas em adultos*. 7ed. São Paulo: Manole; 2013. p. 1975-2021.

Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep*. 2014;3:481.

Siris ES, Miller PD, Barrett-Connor E, Faulkner KG, Wehren LE, Abbott TA, et al. Identification and fracture outcomes of undiagnosed low bone mineral density in postmenopausal women: results from the National Osteoporosis Risk Assessment. *Jama*. 2001;286(22):2815-22.

Stein EM, Liu XS, Nickolas TL, Cohen A, Thomas V, McMahon DJ, et al. Abnormal microarchitecture and stiffness in postmenopausal women with ankle fractures. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(7):2041-8.

Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*. 1996;272(5262):735-8.

Teti A. Bone development: overview of bone cells and signaling. *Curr Osteoporos Rep*. 2011;9(4):264-73.

Urruela A, Egol K. Foot and ankle fractures in the elderly patient. *Aging Health*. 2011; 7(4):591-605.

Varley I, Greeves JP, Sale C, Friedman E, Moran DS, Yanovich R, et al. Functional polymorphisms in the P2X7 receptor gene are associated with stress fracture injury. *Purinergic Signal*. 2016;12(1):103-13.

Wang N, Gartland A. Targeting P2 receptors--current progress in treating musculoskeletal diseases. *Curr Opin Pharmacol*. 2014;16:122-6.

Wesselius A, Bours MJ, Arts IC, Theunisz EH, Geusens P, Dagnelie PC. The P2X(7) loss-of-function Glu496Ala polymorphism affects ex vivo cytokine release and protects against the cytotoxic effects of high ATP-levels. *BMC Immunol*. 2012;13:64.

Wesselius A, Bours MJ, Henriksen Z, Syberg S, Petersen S, Schwarz P, et al. Association of P2X7 receptor polymorphisms with bone mineral density and osteoporosis risk in a cohort of Dutch fracture patients. *Osteoporos Int*. 2013;24(4):1235-46.

Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Database issue):D5-12.

You FM, Huo N, Gu YQ, Luo MC, Ma Y, Hane D, et al. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinformatics*. 2008;9:253.