MAYARA SGARBI SEMEGHINI

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM LARGA ESCALA
DE CÉLULAS OSTEOLÁSTICAS DA CALVÁRIA E DA MEDULA ÓSSEA
DE RATAS OVARECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para a obtenção
do título de Mestre no Programa de
Reabilitação Oral.

Área de concentração: Biologia Oral

Orientadora: Prof^a Dr^a Karina Fittipaldi
Bombonato Prado

Ribeirão Preto

2014

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO DO TEOR TOTAL OU PARCIAL
DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto

Semeghini, Mayara S

Avaliação da expressão gênica em larga escala de células osteoblásticas da calvária e da medula óssea de ratas ovariectomizadas. Ribeirão Preto, 2014.

128 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Oral.

Orientadora: Bombonato-Prado, Karina F

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mayara Sgarbi Semeghini

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre.

Área de Concentração: Biologia Oral

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

1) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esse trabalho

À toda a minha família, principalmente aos meus pais Rosana e Luciano, meus irmãos Caio Augusto e Lucas e minha avó Nair. Obrigada por todo amor e carinho, incentivo e apoio incondicional. Obrigada por sempre acreditarem em mim! Vocês são tudo em minha vida!

AMO VOCÊS!

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que colaboraram e participaram, direta ou indiretamente, da realização deste trabalho e da minha formação profissional.

Agradeço especialmente à minha orientadora, Prof^a Dr^a Karina Fittipaldi Bombonato Prado, pela sua dedicação, seriedade e comprometimento com o que faz. Obrigada pela confiança em mim depositada, pela paciência e incentivo de todo dia, fazendo com que eu superasse as dificuldades enfrentadas. Obrigada por tudo!

Ao docente Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos pela disponibilização e auxílio para a realização dos experimentos em seu laboratório.

A todo pessoal do Laboratório de Imunogenética Molecular do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, especialmente às pós-graduandas Amanda Freire de Assis Riccardi e Janaína Dernowsek pela dedicação e paciência comigo. Vocês foram essenciais para a realização desse trabalho!

Ao técnico Luiz Gustavo de Souza do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica pela ajuda nas cirurgias das ratas. Muito obrigada!

Ao técnico do laboratório de Cultura de Células, Roger Rodrigo Fernandes e as técnicas do laboratório de Biologia Molecular, Fabíola Singaretti de Oliveira e Milla Sprone Tavares Ricoldi por terem me ensinado técnicas que utilizei nesse trabalho e por toda a ajuda que me deram.

Todos os colegas do Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Patologia Básica da FORP pelas alegrias, ensinamentos e colaborações.

Agradecimento

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Pelo financiamento desta pesquisa

Processo número 2012/15889-0 (Bolsa de Mestrado)

Processo número 2012/13330-6 (Auxílio de Pesquisa)

“Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto. A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o bastante para aprender.”

Clarice Lispector

RESUMO

SEMEGHINI, MS. **Avaliação da expressão gênica em larga escala de células osteoblásticas da calvária e da medula óssea de ratas ovariectomizadas.** Ribeirão Preto, 2014. 128 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Oral). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Resumo

A remodelação óssea é um processo fisiológico que mantém a integridade do esqueleto através da substituição do osso antigo por uma matriz óssea jovem. No entanto, na osteoporose a formação óssea, comparada à reabsorção, fica prejudicada em virtude da queda do número de osteoblastos e redução de suas atividades, levando a uma perda da microarquitetura do tecido ósseo, tornando-o frágil e com suscetibilidade à fratura. O objetivo deste trabalho foi comprovar diferenças comportamentais em células osteoblásticas provenientes da medula óssea e da calvária de ratas induzidas à osteoporose por meio de expressão gênica em larga escala. Foram utilizadas 18 ratas *Wistar* divididas em grupos controle e ovariectomizadas. Após 150 dias da cirurgia, as ratas de ambos os grupos foram sacrificadas para coleta dos fêmures e fragmentos da calvária. As células recolhidas a partir da medula óssea e calvária foram cultivadas em placas de 24 poços (n=5) para avaliação da proliferação e viabilidade celular e em garrafas de cultura para a extração do RNA total dessas células. Em seguida, o RNA total foi quantificado e sua integridade analisada por meio do sistema de eletroforese microfluídica. Foi realizada a identificação da modulação de genes e avaliação dos microRNAs envolvidos na inibição gênica por meio de cDNA *microarray*. As células da medula óssea do grupo controle (MC) mostraram uma diminuição significativa na proliferação quando comparado com às células do grupo controle da calvária (CC) em todos os períodos ($p < 0,05$). Por outro lado, as células da medula óssea de

ratas ovariectomizadas (MO) revelaram um aumento significativo na taxa de proliferação após 7 e 10 dias ($p < 0,01$) em comparação às células da calvária de ratas ovariectomizadas (CO). A viabilidade celular foi maior em todos os períodos estudados dos grupos CC e CO em relação aos grupos MC e MO ($p < 0,05$). Os dados de *microarray* foram normalizados utilizando-se quantil e após análise estatística por teste-t não pareado com $p\text{-value} \leq 0,005$ e posterior *fold change* $\geq 2,0$, foram evidenciados 5447 mRNAs diferencialmente expressos nas células da calvária e 4399 mRNAs nas células da medula óssea. Os dados de miRNAs foram normalizados utilizando-se também o quantil e após análise estatística por teste-t moderado com $p\text{-value} \leq 0,05$ e posterior *fold change* ≥ 1.5 , foram evidenciados 84 miRNAs diferencialmente expressos nas células de calvária e 55 miRNAs nas células da medula óssea. No grupo de genes reprimidos da CC destacam-se Notch1, Dlx5, Fgf1, Il6 e Fgfr2 como reguladores da proliferação celular e as Caspases 6 e 12 como resposta a substâncias orgânicas. Já no grupo de genes induzidos da CC encontramos os genes Gli1 e Bmp7 como reguladores da proliferação celular, Gli1, Bmp3 e Mmp2 no processo biológico de desenvolvimento ósseo e Lrp1, Mmp2 e a família Tgf β 1, 2 e 3 no envelhecimento, entre outros. Dentre os genes reprimidos do grupo da MO encontram-se o Csf1, Sparc e Tnf como reguladores da proliferação celular e Anxa5, Col1a1, Spp1, Sparc, Tnf e Mmp2 no processo biológico de resposta a substâncias orgânicas e no grupo de genes induzidos os genes Notch1, Bmp4, Dlx5 e Stat6 como reguladores da proliferação celular e os genes Alpl, Bmp4 e Casp6 no processo de resposta a substâncias orgânicas, entre outros. Dentre os miRNAs encontrados, membros da família 30 (miR-30a, 30c e 30d) apresentaram-se induzidos tanto na CO quanto na MO, sendo que estes miRNAs atuam como reguladores negativos da diferenciação

osteoblástica. Já o miR-17 que está relacionado com a regulação positiva da osteogênese apresentou-se reprimido tanto na CO quanto na MO. O miR-542-3p suprime a diferenciação osteogênica e promove a apoptose dos osteoblastos reprimindo o gene Bmp7 e a sua via de sinalização. Esse miRNA está induzido tanto no grupo da CO quanto na MO. Esses dados confirmam que nas ratas ovariectomizadas há uma menor atividade osteoblástica e maior atividade osteoclástica. Os dados encontrados no trabalho sugerem uma diferença na expressão gênica não só das células diferenciadas da calvária, mas também aquelas ainda presentes na medula óssea, influenciando, assim, a formação adequada de tecido ósseo em uma situação de osteoporose.

Palavras-chave: Osteoporose, *Microarray*, miRNA, Calvária, Medula Óssea.

ABSTRACT

SEMEGHINI, MS. **Large scale gene expression evaluation of osteoblastic cells from calvaria and bone marrow of ovariectomized rats.** Ribeirão Preto, 2014. 128f. Dissertação (Mestrado em Biologia Oral). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Abstract

Bone remodeling is a physiological process which maintains skeleton integrity replacing old bone by a young bone matrix. In some diseases such as osteoporosis bone formation is impaired due to the decrease in the number of osteoblasts and reduction of their activities leading to a loss of bone tissue microarchitecture, making it fragile and susceptible to fracture. The objective of this study was to evaluate behavioral differences in osteoblast-like cells from calvaria and bone marrow of rats induced to osteoporosis by ovariectomy through large-scale gene expression analysis. Eighteen Wistar rats were used and divided into control and ovariectomized groups. After 150 days of surgery, the rats of both groups were sacrificed for collection of femurs and calvaria fragments. The cells collected from bone marrow and calvaria were grown in 24-well plates ($n = 5$) for cell proliferation and viability analysis, as well as grown in culture bottles for total RNA extraction of these cells. The RNA was quantified and its integrity assessed by gel electrophoresis in a microfluidic system. Identification of gene modulation as well as microRNAs involved in gene inhibition was performed by cDNA microarray. Bone marrow cells from the control group (MC) showed a significant decrease in proliferation compared with cells from the calvaria control group (CC) in all periods ($p < 0.05$). On the other hand, bone marrow cells of ovariectomized rats (MO) revealed a significant increase in the proliferation rate after 7 and 10 days ($p < 0.01$) compared to calvaria cells of ovariectomized rats (CO). Cell viability was higher in all periods of CC and CO groups compared to MC and MO groups ($p < 0.05$). Microarray data were normalized

using quantile and after statistical analysis by unpaired t-test with p-value ≤ 0.005 and subsequent fold change ≥ 2.0 , 5.447 differentially expressed mRNAs were detected in calvaria cells and 4.399 mRNAs in bone marrow cells. The miRNAs data were also normalized using the quantile and after statistical analysis by moderate t-test with p-value ≤ 0.05 and subsequent fold change ≥ 1.5 , 84 miRNAs differentially expressed in calvaria cells were detected and 55 miRNAs in bone marrow cells. In CC group, there may be highlighted repressed genes such as Notch1, Dlx5, Fgf1, Fgfr2 and Il6 as regulators of cell proliferation and caspases 6 and 12 in response to organic substances. The same group showed induced genes such as Gli1 and Bmp7 genes as regulators of cell proliferation, Gli1, Bmp3 and Mmp2 involved in the biological process of bone development and Lrp1, Mmp2 and Tgf β 1, 2 and 3 family linked to aging. Among the genes repressed in the MO group are Csf1, Sparc and Tnf as regulators of cell proliferation and Anxa5, Col1a1, Spp1, Sparc, Tnf and Mmp2 associated to biological process of response to organic substances. In the group of induced genes of MO group we found Notch1, Bmp4, Dlx5 and Stat6 as regulators of cell proliferation and Alpl, Bmp4 and Casp6 genes related to the process of response to organic substances. Among the miRNAs found, members of 30 family (miR-30a, 30c and 30d) were induced in the CO and MO groups and these miRNAs act as negative regulators of osteoblastic differentiation. The miR-17 is associated with upregulation of osteogenesis and it is repressed in both ovariectomized groups. MiR-542-3p suppresses osteogenic differentiation and promotes osteoblast apoptosis repressing Bmp7 gene and its signaling pathway. This miRNA was induced in the CO and MO group. These data confirm that in ovariectomized rats there is a decrease in osteoblastic activity and increased osteoclastic activity. The data found in the present investigation suggest a difference in gene expression not only of differentiated cells

from calvaria but also those still present in the bone marrow, thus affecting the proper formation of bone tissue in a situation of osteoporosis.

Keywords: Osteoporosis, Microarray, miRNA, Calvaria, Bone Marrow.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 Dinâmica do tecido ósseo e remodelação óssea	19
1.2 Células do tecido ósseo	21
1.3 Osteoporose: conceito, epidemiologia e etiologia	22
1.4 Modelo animal utilizado	25
1.5 Células tronco-mesemquimais	26
1.6 Transcriptoma	27
1.7 Métodos de análise do transcriptoma	29
1.8 microRNAs: descoberta e conceito	32
1.9 microRNA, osteogênese e osteoporose	34
2. HIPÓTESE	38
3. OBJETIVOS	40
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	42
5. MATERIAL E MÉTODOS	44
5.1 Animais utilizados	44
5.2 Protocolo experimental para a osteoporose- Grupo tratado	44
5.3 Grupo controle- Sham	49
5.4 Sacrifício dos animais e coleta do material	49
5.4.1 Cultura de células mesenquimais da medula óssea de ratas	50
5.4.2 Cultura de células da calvária de ratas	51
5.5 Ensaio bioquímico	52
5.5.1 Proliferação celular	52
5.5.2 Viabilidade celular	53
5.6 Extração de RNA total	53
5.7 Avaliação da integridade do RNA total	54
5.8 Oligo <i>microarrays</i>	56
5.8.1 mRNAs <i>microarrays</i>	56

5.8.1.1	Marcação e purificação.....	57
5.8.1.2	Hibridação das amostras e lavagem das lâminas.....	59
5.8.1.3	Leitura das lâminas e extração dos dados brutos.....	60
5.8.2	microRNA microarrays.....	60
5.8.2.1	Marcação das amostras.....	61
5.8.2.2	Hibridação das amostras e lavagem das lâminas.....	62
5.8.2.3	Leitura das lâminas e extração dos dados brutos.....	63
5.8.3	Análise dos dados de microarrays.....	63
5.9	Reações de transcrição reversa.....	64
5.10	Confirmação dos dados de microarray por PCR em tempo real (qPCR)	64
5.11	Análise estatística dos dados de PCR quantitativa..... em tempo real	66
6.	RESULTADOS.....	68
6.1	Ensaio bioquímico.....	68
6.1.1	Proliferação celular.....	68
6.1.2	Viabilidade celular.....	70
6.2.	Avaliação da integridade das amostras de RNA.....	71
6.3.	Análise dos RNAs mensageiros diferencialmente expressos.....	73
6.4	Análise dos miRNAs diferencialmente expressos.....	94
6.5.	Análise de Venn.....	100
6.6	Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	101
7.	DISCUSSÃO.....	104
8.	CONCLUSÃO.....	115
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dinâmica do tecido ósseo e remodelação óssea

O tecido ósseo é constituído de tecido conjuntivo especializado composto por células (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) e por uma matriz óssea que possui a característica essencial de sofrer mineralização. A matriz óssea é composta por uma fração inorgânica e outra orgânica. A fração inorgânica ou não proteica representa cerca de 50% do seu peso, sendo composta principalmente por íons de fosfato e cálcio. Outros íons como bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato também estão presentes, porém, em menores quantidades. O cálcio e fosfato estão depositados no tecido ósseo sob a forma de cristais que, aos estudos de difração ao Raio X mostram ter a estrutura da hidroxiapatita. Estes cristais se alojam ao longo das fibras colágenas e são envolvidos por substância fundamental amorfa. A porção orgânica da matriz óssea é composta por 95% de fibras colágenas, constituídas de colágeno tipo I e por pequena quantidade de proteoglicanos e glicoproteínas. A associação de hidroxiapatita (parte inorgânica) com fibras colágenas (parte orgânica) é responsável pela dureza e resistência do tecido ósseo (Junqueira & Carneiro, 2008).

A mineralização da matriz confere a este tecido uma extrema dureza, permitindo o desempenho de importantes funções de sustentação e proteção. Por sua vez, a matriz colágena proporciona uma certa maleabilidade fornecendo algumas possibilidades de extensão e flexão. Constituintes principais do esqueleto, os ossos servem de suporte para partes moles, protegem os órgãos vitais, alojam a medula óssea, além de proporcionarem apoio aos músculos esqueléticos para a movimentação (Judas e cols., 2012).

Apesar do seu aspecto aparentemente inerte, o osso é composto por estruturas altamente dinâmicas que crescem, remodelam-se e mantêm-se ativas durante toda a vida do indivíduo (Costa e cols., 2005). Esta permanente reorganização do tecido ósseo é realizada por diversas células ósseas que assumem várias formas e funções e que, no seu conjunto, constituem a série osteoblástica e a série osteoclástica, responsáveis pela constante formação, reabsorção, reparação, remodelação e manutenção da microarquitetura óssea (Judas e cols., 2012).

A remodelação óssea é um processo fisiológico que mantém a integridade do esqueleto através da substituição do osso antigo por uma matriz óssea jovem (Marie & Kassem, 2011). Para isso, a substituição óssea requer ações coordenadas entre os osteoclastos, para remover a matriz óssea, e os osteoblastos, para substituí-la, como também a interação de forças mecânicas, hormônios sistêmicos, citocinas, prostaglandinas e fatores de crescimento produzidos localmente. Estes últimos, sintetizados majoritariamente pelas próprias células ósseas ou pelas células do microambiente envolvido são liberados sequencialmente à medida que a remodelação vai ocorrendo e atuam de uma forma autócrina ou parácrina, sendo provável que medeiem, pelo menos parcialmente, os efeitos dos estímulos mecânicos e hormonais (Canalis e cols., 1988).

Uma importante característica da sequência da remodelação óssea é a sua especificidade de localização. O processo de remodelação, que ocorre numa determinada área, não tem ligação cronológica direta com a remodelação observada em qualquer outra área. Este fato leva a admitir que a remodelação óssea está, sobretudo, sob o controle de fatores locais, gerados no microambiente de cada unidade ou área específica de remodelação (Judas e cols., 2012).

O processo de remodelação óssea orienta-se fundamentalmente para um objetivo mecânico, que engloba não só uma adaptação e otimização da estrutura óssea às solicitações mecânicas, como também a remoção de áreas danificadas, assim como de um objetivo metabólico, participando da homeostasia do cálcio plasmático (Judas e cols., 2012).

1.2 Células do tecido ósseo

Os osteócitos são as células mais abundantes do tecido ósseo (cerca de 95%). Os osteoblastos ao cumprirem sua função de formadores de osso, tornam-se osteócitos, os quais inicialmente estão circundados por tecido osteóide, que é o tecido ainda não mineralizado e por fim tornam-se osteócitos maduros envoltos em matriz mineral. São células de extrema importância na manutenção da matriz óssea (Bonewald e cols., 2011). Já os osteoblastos são células típicas do tecido conjuntivo, oriundas de células mesenquimais indiferenciadas e que produzem a parte orgânica da matriz óssea, sintetizando pró-colagênio tipo I, proteínas da matriz extracelular, fosfatase alcalina e osteocalcina. Possuem ainda a capacidade de armazenar fosfato de cálcio, participando na mineralização da matriz (Junqueira & Carneiro, 2008). Os osteoclastos são células originárias do tecido hematopoiético, sendo derivados de colônias de células formadoras de macrófagos. As lacunas cavadas na matriz óssea pelos osteoclastos recebem o nome de lacunas de Howship (Sommerfeldt & Rubin, 2001).

Figura 1. A remodelação óssea inicia-se quando os osteoclastos reabsorvem osso mineral e matriz. As células mononucleares preparam a superfície reabsorvida para os osteoblastos, que vão gerando nova matriz enquanto se diferenciam. A mineralização da matriz e a diferenciação de alguns osteoblastos em osteócitos completa o ciclo de remodelação (Adaptado de KAPINAS & DELANY, 2011).

1.3 Osteoporose: conceito, epidemiologia e etiologia

A queda da mortalidade, em especial a infantil, a redução da fecundidade e o aumento da expectativa de vida têm resultado no envelhecimento da população e no aumento das taxas de doenças crônico-degenerativas, dentre as quais a osteoporose (Frazão & Naveira, 2006).

Com a senilidade, a formação óssea, comparada à reabsorção, fica prejudicada em virtude da queda do número de osteoblastos e redução de suas atividades. Essas disfunções podem ser explicadas pelas mudanças decorrentes do processo de envelhecimento, como as alterações nos fatores de crescimento e hormonais. A consequência é um declínio na formação óssea, tanto do osso trabecular como do osso cortical, com redução da massa óssea (Khosla & Riggs, 2005; Russell e cols., 2006). Este desequilíbrio no processo de renovação óssea pode gerar o aparecimento da osteoporose, onde ocorre a perda da microarquitetura do tecido ósseo, reduzindo sua densidade e tornando-o frágil, com suscetibilidade à fratura (South-Paul, 2001).

A osteoporose é uma doença silenciosa e o impacto econômico e na saúde do indivíduo resulta do maior risco à fratura de ossos que esses indivíduos apresentam. A incidência mundial de fraturas osteoporóticas em 2000 foi estimada em 9 milhões, com fraturas de quadril contribuindo para 1,6 milhões. Em 2050, o número de fraturas de quadril em todo o mundo deverá aumentar para 6,3 milhões (Lee J & Vasikaran, 2012). Cerca de 15 a 20% dos pacientes com fratura de quadril morrem devido à fratura ou suas complicações durante a cirurgia, ou mais tarde por embolia ou problemas cardiopulmonares em um período de 3 meses e 1/3 do total de fraturados morrerão em 6 meses. Os restantes, em sua maioria, ficam com graus variáveis de incapacidade.

Esta doença tem acentuada incidência sobre os brasileiros (número que supera os 10 milhões) e cerca de 2000 pessoas morrem anualmente em consequência de complicações de fraturas devido a esta doença (Revista Veja - 30 de janeiro de 2008). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), cerca de 15 milhões de brasileiros apresentavam-se propensos a osteoporose em 2000, sendo estimado que em 2020 esse número atinja 18 milhões de indivíduos (Araújo, 2006).

Fatores genéticos, nutricionais e comportamentais são de fundamental importância na etiologia desta doença (Raisz, 2005). Segundo critérios da Organização Mundial de Saúde, OMS, aproximadamente um terço das mulheres de raça branca, com idade superior aos 65 anos, tem osteoporose. Os hábitos dietéticos como baixo consumo de cálcio e vitamina D, abuso de álcool e tabaco, o estilo de vida sedentário e o uso crônico de glicocorticóides para tratamento de doenças sistêmicas também são fatores de risco desta patologia (Downey & Siegel, 2006; Sandhu & Hampson, 2011).

Embora a osteoporose seja uma doença de etiologia multifatorial, a deficiência de estrógeno após a menopausa é a causa mais comum do surgimento da osteoporose em mulheres (Becker, 2008). O estrógeno desempenha um papel importante na regulação da homeostase óssea. Os efeitos do estrógeno na estrutura esquelética são mediados através da ligação a dois ERs (*estrogen receptors*) diferentes, os quais são codificados pelos genes de ER α e ER β . Ambos os receptores são altamente expressos em osteoblastos, osteócitos e células osteoprogenitoras da medula óssea (Xu e cols., 2010). O estrógeno desempenha papel fundamental no crescimento e na manutenção da homeostase do esqueleto (Ralston, 2010; Weitzmann & Pacifici, 2006). A sua deficiência leva a um aumento da perda de massa óssea, menor densidade mineral (BMD), aumento do risco de fratura e aumento da formação de osteoclastos, expandindo o espaço de remodelação e aumentando consequentemente a área de reabsorção sobre a superfície trabecular (Ho-Pham e cols., 2013).

Estudos demonstram que a deficiência de estrógeno pós-menopausa pode estimular a produção de vários fatores parácrinos pelos osteoblastos, como IL1, IL6 e TNF α , os quais estão envolvidos na osteoclastogênese aumentando a reabsorção óssea (Maruotti e cols., 2012). A interleucina 6 (IL6) é uma citocina produzida pelos osteoblastos e pelas células da medula óssea, importante no processo catabólico do osso e que tem sua expressão inibida pelo estrógeno. Ela é um dos fatores responsáveis pelo aumento da reabsorção óssea quando da deficiência desse esteróide (Ribeiro e cols., 2003).

A osteoporose pós-menopausa foi descrita pela primeira vez em 1940 pelo endocrinologista Fuller Albright, que a definiu como sendo uma condição de formação óssea prejudicada devido à deficiência de estrógeno (Albright e cols.,

1940), uma vez que este hormônio regula a remodelação óssea por modular a produção de citocinas e fatores de crescimento a partir da medula e células ósseas (Pacifici, 1996). De fato, segundo Simon (2007), células ósseas como os osteoblastos e osteoclastos estão sob o controle de hormônios sistêmicos e citocinas; a deficiência de estrógeno afeta os níveis de citocinas específicas que circulam no organismo, aumentando sua concentração, o que favorece a reabsorção óssea por aumentar o recrutamento, a diferenciação e a ativação de células osteoclásticas (Horowitz, 1993; Manolagas & Jilka, 1995).

O estrógeno regula, nos osteoblastos, a expressão dos genes que codificam o colágeno tipo I, a fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina e osteonectina. Ele aumenta a diferenciação dos osteoblastos e exerce efeito estimulatório sobre a síntese e mineralização da matriz óssea. Além disso, o estrógeno estimula a apoptose dos osteoclastos e mantém os osteócitos viáveis, havendo na sua deficiência aumento da taxa de apoptose dessas células (Ribeiro e cols., 2003). Portanto, torna-se indiscutível a importância e o papel do estrógeno na manutenção da massa óssea e sua deficiência causando uma grande desordem na remodelação do esqueleto.

1.4 Modelo animal utilizado

Um modelo para osteoporose que tem sido bastante utilizado é o de ratas ovariectomizadas bilateralmente. Tal fato é comprovado na literatura e de acordo com Frost & Jee em 1992, as ratas proporcionam um modelo de estudo muito útil de osteopenia humana e de alguns outros problemas esqueléticos humanos importantes, pois há uma resposta similar entre ratas e humanos quanto às influências mecânicas, hormonais e de drogas. Um estudo realizado em tíbia de

ratas mostrou que, cinco semanas após ovariectomia bilateral, houve perda óssea e aceleração do metabolismo esquelético (Wronski e cols., 1985). Cinco meses após a ovariectomia bilateral e alimentação à vontade, ratas Sprague-Dawley apresentaram redução na densidade de mineralização no osso alveolar da mandíbula, na maxila e nos ossos parietais e frontal (Rawlinson e cols., 2009).

1.5 Células tronco-mesenquimais

O conceito de células-tronco surgiu a partir de experimentos pioneiros realizados no início dos anos 1960 por Ernest A. McCulloch e James E. Till que observaram a presença de colônias hematopoiéticas no baço de camundongos irradiados e que haviam recebido transplante de medula. Essas colônias eram derivadas de uma única célula, a célula-tronco.

Outros estudos, realizados nas décadas de 1970 e 1980 pelo grupo de pesquisa de Alexander Friedenstein ampliaram o potencial de uso das CTMs (células-tronco mesenquimais), demonstrando sua capacidade de auto-renovação e diferenciação. Na época, devido à semelhança morfológica com fibroblastos em cultura, foram denominadas unidades formadoras de colônia fibroblástica (UFC-F). Nas décadas seguintes, extensas pesquisas foram desenvolvidas para desvendar o potencial terapêutico das CTMs.

As células-tronco mesenquimais são definidas pela sua capacidade de auto-renovação, proliferação e diferenciação em uma variedade de células e linhagens celulares, como osteoblastos, adipócitos, condrócitos, hepatócitos e miócitos (Manolagas, 2000).

Elas podem ser isoladas não apenas da medula óssea, mas também da maioria dos tecidos adultos, incluindo o tecido adiposo, fígado, fluido amniótico,

pulmão, músculo esquelético e rim. No entanto, uma das vantagens de se utilizar a medula óssea é a facilidade com que estas células são cultivadas. Mesmo que apenas uma pequena percentagem de células na medula óssea sejam de fato CTMs, elas podem ser facilmente isoladas devido sua afinidade e aderência ao plástico, sendo que uma pequena quantidade de CTM pode multiplicar-se em milhões de células de acordo com as condições adequadas de cultivo (Pinto-Filho e cols., 2013).

Extensos protocolos foram e continuam sendo descritos para a cultura de células-tronco numa variedade de animais, como ratos, camundongos e cães, assim como seres humanos (Drzewiecki e cols., 2011).

Assim sendo, essas células apresentam elevado potencial osteogênico e podem ser elegíveis para o reparo e manutenção do tecido ósseo, sendo muito atrativas para a engenharia tecidual, medicina regenerativa e terapia gênica. Entretanto, mudanças no seu comportamento podem ser causadas por fatores como a osteoporose, afetando a sua habilidade de auto-renovação e diferenciação (Veronesi e cols., 2011).

1.6 Transcriptoma

Em analogia ao termo *genoma* o qual se refere a toda informação hereditária de um organismo que está codificada em seu DNA, criou-se o termo *transcriptoma* para se referir ao conjunto de RNAs, ou seja, transcritos presentes em uma célula/tecido em um dado momento, pois dependendo do estágio de desenvolvimento, estado fisiológico e tipo de tecido haverá um transcriptoma diferente. São incluídos no conceito de transcriptoma os RNAs mensageiros (mRNA) responsáveis pela codificação da síntese de proteínas, e portanto, os mais

importantes no estudo da expressão do genoma, os RNAs transportadores (tRNA) e os RNAs ribossômicos (rRNA) apesar de não serem codificadores de proteínas (Yabuta, 2012).

Durante todo o processo de diferenciação celular e tecidual, um conjunto diversificado de proteínas é mobilizado como resultado da expressão diferencial de seus respectivos genes. Portanto, pode-se dizer que durante o desenvolvimento o primeiro ponto de controle molecular é a expressão gênica ao nível do conjunto de mRNA. Hoje, sabe-se que o transcriptoma das células e tecidos é reflexo da razão entre a biossíntese de mRNA (transcrição) e sua degradação, muitas vezes causada pelos miRNAs (microRNAs) (Sevignani e cols., 2006).

O foco principal das pesquisas genômicas é compreender quais são os papéis funcionais dos diferentes genes e de quais processos biológicos eles participam, identificar todos os mRNAs expressos em um dado organismo ou tecido e comparar o perfil de expressão gênica em diferentes condições ambientais, estados patológicos, fisiológicos ou de desenvolvimento (Yabuta, 2012).

Conhecer a abundância da transcrição gênica em vários tecidos, fases de desenvolvimento e sob várias condições é importante para responder a estas questões. Embora o mRNA não seja o produto final de um gene, a transcrição é o primeiro passo na sua regulação e as informações sobre os níveis de transcrição são necessárias para se entender as redes reguladoras de genes. Além disso, a medição dos níveis de mRNA atualmente é consideravelmente mais barato e pode ser feita de uma forma mais rentável que medições diretas dos níveis de proteína. A correlação entre a quantidade de mRNA e de proteína na célula pode não ser direta, no entanto, a ausência de mRNA em uma célula pode implicar em um nível não muito alto da respectiva proteína, assim, pelo menos, estimativas qualitativas sobre

o proteoma podem ser baseadas na informação do transcriptoma (Lagos-Quintana, 2001).

1.7 Métodos de análise do transcriptoma

Várias técnicas para o estudo do transcriptoma estão disponíveis, como por exemplo, a análise *In Silico*, a qual requer conhecimento da sequência gênica, e as análises experimentais, como RT-PCR e SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), no entanto, essas técnicas possuem desvantagens quando o objetivo é analisar a expressão em larga-escala, o que pode ser solucionado por meio das tecnologias de *microarrays* (Yabuta, 2012).

Ao medir os níveis de transcrição de genes de um organismo sob diversas condições, em diferentes estágios de desenvolvimento e em tecidos diferentes, podemos criar “perfis de expressão gênica” que caracterizam o funcionamento dinâmico de cada gene no genoma. Podemos imaginar os dados de expressão representados numa matriz (matriz de expressão gênica) com linhas que representam genes, e colunas que representam várias amostras (por exemplo, tecidos diferentes, fases de desenvolvimento e tratamentos), e cada célula contém um número que caracteriza o nível de expressão de um determinado gene na amostra em particular.

Construir uma base de dados dessas matrizes nos ajuda a compreender a regulação gênica, vias metabólicas e de sinalização, os mecanismos genéticos da doença e a resposta a tratamentos medicamentosos. Por exemplo, se a sobre-expressão de certos genes está correlacionada com um determinado câncer, pode-se explorar quais outras condições afetam a expressão destes genes e quais outros genes têm perfis de expressão similares. Pode-se também investigar quais

compostos (drogas potenciais) reduzem o nível de expressão desses genes (Brazma & Vilo, 2001).

Atualmente, a análise de *microarray* pode ser realizada através da utilização de plataformas diferentes por meio de chips que contém todo o genoma da espécie de interesse (humanos, ratos, camundongos) ou ainda todos os miRNAs relatados até o presente momento. Em *microarrays* padrão, as sondas são sintetizadas e depositadas a uma superfície sólida por meio de ligação covalente a uma matriz química (via epóxi-silano, amino-silano, lisina, poliacrilamida). A superfície sólida pode ser de vidro ou um chip de silício, caso em que eles são coloquialmente conhecidos como um *AFFY chips* quando um chip *AFFYMETRIX* é usado. Plataformas de *microarrays* como *Illumina* (Illumina, San Diego, CA, USA) usam micro esferas de sílica cobertas com centenas de cópias de um oligonucleotídeo específico, que agem como sequências de capturas em um dos ensaios. Essas micro esferas são depositadas em micro cavidades em substratos de fibra óptica ou lâminas de sílica. Alternativamente, os *microarrays* da *Agilent* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) podem ser construídos pela síntese direta de sondas de oligonucleotídeos em lâminas de vidro previamente preparadas por um sistema de impressão, conhecido por *SurePrint* (Yabuta, 2012). Este processo de síntese *in situ* possibilita a deposição de oligonucleotídeos, base a base, com extrema precisão utilizando arquivos de mRNAs ou de miRNAs provenientes de bancos de dados. Portanto, esse tipo de análise foi o escolhido para o estudo do transcriptoma das células osteoblásticas do nosso trabalho.

A regulação da atividade de osteoblastos e osteoclastos tem sido um grande foco de experimentos de *microarrays* há alguns anos e tem fornecido novos ensaios sobre os mecanismos de formação e reabsorção óssea. A atividade dos

osteoblastos e osteoclastos é regulada por uma variedade de biomateriais específicos, fatores de transcrição, fatores de diferenciação de crescimento e citocinas (Xu e cols., 2010).

Existem poucos trabalhos na literatura indicando as modificações que a osteoporose pode provocar em células osteoblásticas e suas células progenitoras. Uma investigação realizada por D'Amelio e colaboradores em 2011 na cabeça do fêmur e na medula óssea de mulheres com fragilidade óssea demonstrou que células da medula são responsáveis pela produção de citocinas associadas à osteoclastogênese como o RANKL, enquanto que inibidores osteoblásticos como SOST e DKK1 são produzidos principalmente por células ósseas, sugerindo uma relação íntima das duas regiões na regulação do metabolismo ósseo. Um estudo feito por Benisch e colaboradores (2012) indicou que alterações intrínsecas nas CTMs estão envolvidas na patofisiologia da osteoporose. Análises por *microarray* detectaram diferenças significativas entre CTMs de doadores idosos com e sem osteoporose, sugerindo que a osteoporose provoca distintas mudanças transcricionais que diferem das mudanças relacionadas à idade nos doadores sem osteoporose.

Por estas razões, o conhecimento sobre alterações comportamentais provocadas pela osteoporose em células mesenquimais provenientes da medula óssea e em células osteoblásticas já diferenciadas pode ser útil para que novos medicamentos e novas tecnologias possam ser utilizados para evitar a progressão da doença.

1.8 MicroRNAs: descoberta e conceito

O primeiro miRNA, lin-4, foi descoberto por Lee e colaboradores em 1993. Eles descobriram que o lin-4 agia regulando negativamente o nível da proteína lin-14, levando a uma diminuição temporal dessa proteína a partir do primeiro estágio larval. Usando clones de *C. elegans* para isolar o gene, eles descobriram que esse gene não codificava uma proteína, mas sim um par de pequenos RNAs, um com 22 e outro com 61 nucleotídeos, aproximadamente, contendo sequências complementares a uma sequência repetida na região 3' UTR do mRNA lin-14, sugerindo que o lin-4 regulava a tradução do lin-14 através de um mecanismo antisense (Lee e cols., 1993).

Após sete anos, outro gene heterocrônico, o let-7, foi descoberto por codificar um RNA com 21 nucleotídeos. Reinhart e cols (2000) descobriram que a diminuição da atividade do gene let-7 causava uma reiteração dos destinos das células larvais durante a fase adulta, enquanto que o aumento da dose de gene let-7 levava a uma expressão precoce.

Devido à função comum, associada ao processo de desenvolvimento, o lin-4 e o let-7 ficaram conhecidos como pequenos RNAs temporais (stRNAs – small temporal RNAs) (Pasquinelli e cols., 2000).

Um ano após a descoberta do let-7, homólogos desses RNAs foram encontrados em humanos e outras espécies. Entretanto, esses novos RNAs não eram expressos em diferentes estágios de desenvolvimento, mas sim encontrados em tipos celulares específicos. Assim, o termo microRNA (miRNA) foi introduzido para se referir aos stRNAs e todos os outros pequenos RNAs com características semelhantes, mas funções desconhecidas (Bartel & Chen, 2004; Lagos-Quintana e cols., 2001; Lau e cols., 2001; Lee & Ambros, 2001).

Hoje, os miRNAs são definidos como pequenos RNAs não-codificantes (aproximadamente 22 nucleotídeos) que agem no nível pós-transcricional, usualmente regulando a repressão da tradução de seus mRNAs alvos através do pareamento de bases na região 3' UTR. Foi sugerido que os miRNAs regulam a expressão gênica de mais de 50% dos genes codificadores de proteínas em humanos e podem coordenadamente regular um grupo de genes codificadores de proteínas com funções relacionadas. Crescentes evidências indicam que esses miRNAs desempenham papel regulador fundamental em diversos processos patológicos e fisiológicos e estão mostrando grande potencial como possíveis novos biomarcadores e alvos terapêuticos para várias doenças, como osteoporose, câncer, artrite reumatóide e diabetes (An e cols., 2014).

O banco de dados de miRNAs conhecido como miRBase (www.mirbase.org) traz um registro em 12/06/2014, de 1.872 miRNAs encontrados em humanos (*homo sapiens*) e 449 em ratos (*rattus norvegicus*). Porém, como nova e importante peça do processo de regulação gênica, novos miRNAs são validados a cada dia.

Mais de 20.000 trabalhos sobre miRNAs já foram publicados desde sua descoberta há mais de vinte anos, e um subconjunto respeitável destes (> 600) concentrou-se nos papéis dos miRNAs nos tecidos ósseos e cartilagosos. Muitos trabalhos tem estudado as diferentes funções dos miRNAs no desenvolvimento do esqueleto e doenças, incluindo o seu papel regulatório no crescimento, diferenciação e função de osteoblastos e osteoclastos, assim como condrócitos e outros tipos de células mesenquimais, como adipócitos e mioblastos (Van Wijnen e cols., 2013).

1.9 MicroRNA, osteogênese e osteoporose

A expressão gênica é regulada pós-transcricionalmente. Os níveis de atividade e proteína celular podem ser reguladas por meio de modificações, incluindo a fosforilação e degradação mediada por ubiquitina, e também por miRNAs, que são considerados um mecanismo epigenético chave para o controle da expressão de genes. Eles fornecem uma nova dimensão do controle pós-transcricional por inibição direta da tradução do mRNA, representando um nível sofisticado de regulação do gene que coordena um amplo espectro de processos biológicos.

Centenas de miRNAs tem sido funcionalmente ligados ao desenvolvimento de tecidos específicos, por exemplo, pele, músculos, nervos, gordura, cartilagem e osso, alguns caracterizados por mediar o controle do ciclo celular, apoptose e sobrevivência, enquanto outros miRNAs também estão presentes em várias doenças, células cancerosas e progressão patológica de tumores sólidos e leucemias. No entanto, o controle dos miRNA de processos biológicos vai além de simples modelos invocando alvos de um único gene, sendo uma área muito envolvente de investigação. Mais modelos complexos devem incorporar os dois fatos principais de um miRNA: ter como alvo centenas de mRNAs e atuar seletivamente em diferentes tecidos, enquanto que um mRNA pode ter vários sítios de ligação para diferentes miRNAs. Estas duas propriedades fundamentais preveem que os miRNAs funcionam como poderosos gestores moleculares que atuam controlando várias redes de regulação gênicas simultaneamente (Lian e cols., 2012).

Recentemente, uma série de estudos tem demonstrado o importante papel dos miRNAs na regulação da massa óssea. A primeira evidência veio dos estudos em células de cartilagem de ratos *knockout* para endoribonuclease Dicer, a qual é necessária para a produção de miRNAs maduros funcionais, que exibiu graves

defeitos esqueléticos durante o desenvolvimento ósseo e cartilaginoso (Kobayashi e cols., 2008).

Estudos mais recentes têm focado na regulação da diferenciação osteoblástica ou osteoclástica por miRNAs. Durante a diferenciação osteoblástica induzida por BMP2 de células mesenquimais C2C12, 22 miRNAs foram significativamente downregulados. Entre eles, o miR-133 e miR-135 inibiram a diferenciação de osteoprogenitores atenuando as vias Runx2 e Smad5 (Li e cols., 2008). Inose e cols. (2009) revelaram que a superexpressão de miR-206 desenvolveu um fenótipo de baixa massa óssea com prejudicada diferenciação osteoblástica tendo como alvo a Connexin43. Além disso, pesquisadores mostraram que o miRNA-204 tem como alvo Runx2 em células-tronco mesenquimais da medula óssea, inibindo, assim, a diferenciação dos osteoblastos, enquanto que reciprocamente estimula a adipogênese de células progenitoras mesenquimais (Huang e cols., 2010). Outro miRNA, miR-2861, que é conservado entre espécies, demonstrou ter como alvo o HDAC5 aumentando a diferenciação osteoblástica. Além disso, mutação homozigótica no pré-miR-2861 que bloqueia a expressão do miR-2861 mostrou causar osteoporose primária em duas adolescentes da mesma família (Li e cols., 2009). Outro estudo mostrou que o miR-182 funciona como um inibidor do FoxO1 antagonizando a proliferação e diferenciação de osteoblastos, com um subsequente efeito negativo sobre a osteogênese.

Segundo An e cols., (2014), a transfecção do inibidor do miR-127 aumentou a diferenciação osteoblástica em células UAMS-32, enquanto que o precursor do miR-136 inibiu a diferenciação dos osteoblastos e ambos os precursores aumentaram a diferenciação osteoclástica em macrófagos da medula óssea, indicando que esses miRNAs regulam negativamente a massa óssea. Huang e cols., (2010)

demonstraram que o miR-204 e seu homólogo miR-211 agem como importantes reguladores negativos endógenos do RUNX2, inibindo a osteogênese e promovendo a adipogênese de células progenitoras mesenquimais e células-tronco da medula óssea. Outro exemplo, o miR-542-3p mostrou suprimir a diferenciação osteogênica e promover a apoptose de osteoblastos através da repressão de BMP-7, além disso, o silenciamento desse miRNA levou a um aumento da formação óssea, resistência óssea e melhorou a microarquitetura trabecular em ratas controle e ovariectomizadas (Kureel e cols., 2014). Em relação à diferenciação osteoclástica, o miR-223 demonstrou reprimir o IFN- γ , um supressor da osteoclastogênese, resultando na expressão aumentada do receptor de M-CSF, necessário para a osteoclastogênese (Sugatani & Hruska, 2009).

Portanto, como pudemos ver, os miRNAs contribuem para cada passo da osteogênese: do desenvolvimento ósseo embrionário a manutenção do tecido ósseo adulto, regulando o crescimento, diferenciação e atividade funcional das células que constituem o tecido ósseo (Lian e cols., 2012).

HIPÓTESE

2. HIPÓTESE DO TRABALHO

Existem poucos trabalhos na literatura indicando as modificações que a osteoporose pode provocar em células osteoblásticas e suas células progenitoras. Sendo assim, a hipótese deste trabalho é a de que em condição de osteoporose, não só as células diferenciadas, mas também aquelas ainda presentes na medula óssea possam apresentar diferenças comportamentais em sua expressão gênica, influenciando a formação adequada de tecido ósseo.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Comprovar diferenças comportamentais em células osteoblásticas provenientes da medula óssea e da calvária de ratas induzidas à condição de osteoporose por meio de expressão gênica, com a identificação da modulação de genes por meio de cDNA *microarray* e avaliação dos microRNAs (miRNAs) associados a atividades de proliferação e diferenciação celular.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Avaliar as atividades de proliferação e viabilidade das células osteoblásticas;
- 2) Identificar perfis específicos de expressão de RNAs mensageiros (transcriptoma dos mRNAs) nas células osteoblásticas da calvária e medula óssea de ratas ovariectomizadas, utilizando a tecnologia de *microarrays* genoma completo;
- 3) Identificar perfis específicos de expressão de miRNAs (transcriptoma dos miRNAs ou miRNoma) nas células osteoblásticas da calvária e medula óssea de ratas ovariectomizadas, utilizando a tecnologia de miRNA *microarrays*.

*DELINEAMENTO
EXPERIMENTAL*

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais utilizados

Para a realização do trabalho, fez-se necessária a aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) desta Universidade (protocolo 12.1.1286.56.0.) Foram utilizadas 18 ratas *Wistar*, sendo 9 ratas do grupo controle e 9 ratas do grupo tratado, pesando aproximadamente 300g. Os animais foram procedentes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto e foram mantidas em número de três animais por caixa de polietileno, com temperatura ambiente controlada entre máxima de 24°C e mínima de 23°C e com *timer* programado para doze horas de iluminação diária. Os animais receberam ração e água “ad libitum” e a limpeza de suas caixas com troca da maravalha foi realizada três vezes por semana.

5.2 Protocolo experimental para osteoporose - Grupo Tratado

Os animais foram ovariectomizados bilateralmente. Primeiramente eles foram pesados e então anestesiados, via intramuscular, com a solução anestésica de xilazina (Dopaser, Hertape Calier S.A., Juatuba, MG, Brasil) como sedativo, analgésico e relaxante muscular; e cetamina (Ketamina Agener, Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brasil) como anestésico geral, na proporção de 75mg/Kg de cetamina e de 10mg/Kg de xilazina. Também foi feita a aplicação em ambos os olhos dos animais, durante a cirurgia, de uma gaze estéril embebida em soro fisiológico a 0,9% com o objetivo de prevenir o ressecamento das córneas.

Após a anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia das regiões laterais, sendo feita a assepsia dos locais a serem incisionados com álcool iodado (PVPI). Foram realizadas incisões cutâneas bilaterais, sendo o tecido muscular divulsionado para a exposição dos ovários e excisão dos mesmos (Figuras 2 e 3), como descrito por Kalu (1991). A sutura dos tecidos foi realizada com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) de modo a fechar devidamente as margens do retalho (Figura 4). Em seguida, cada animal recebeu, via intramuscular, uma única dose de 24.000UI/Kg de penicilina (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte-Fort Dodge®, Campinas, SP, Brasil) e uma dose de 1,1 mg/Kg de flunixin meglumina (Banamine Pet Injetável, Schering-Plough Coopers Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Os animais foram mantidos em número de três por caixa, por cento e cinquenta dias, em observação constante.

Figura 2. Exposição do ovário e pinçamento para hemostasia antes da remoção do órgão. Este procedimento foi realizado bilateralmente.

Figura 3. Ovário removido.

Figura 4. Aspecto da sutura após ovariectomia.

A comprovação do sucesso do procedimento de ovariectomia foi feita pelo exame do ciclo estral e exame macroscópico dos cornos uterinos. Duas semanas após a cirurgia, os animais foram submetidos ao exame do ciclo estral, por meio da coleta de líquido vaginal por um período de 5 dias consecutivos. Para o desenvolvimento desta técnica de observação foi introduzido, com o auxílio de uma borracha de conta-gotas acoplada a uma ponteira pequena, uma dose de solução

salina (cerca de 1mL) no interior da vagina da rata. Após a introdução a solução foi rapidamente aspirada e seu conteúdo transferido para uma lâmina de vidro e imediatamente observado em microscopia óptica. Este procedimento foi realizado bem no início da manhã, por volta das 7 horas.

A literatura mostra que esta técnica é ideal para investigar as mudanças ocorridas no ciclo reprodutivo. O período do ciclo estral das ratas dura de 4 a 5 dias. Este ciclo pode ser dividido em quatro fases: metaestro, diestro, proestro e estro. Cada uma das fases se caracteriza por apresentar um tipo de célula predominante que pode ser facilmente observado nos esfregaços da vagina, assim como o nível de hormônios sexuais presentes no animal. Na fase metaestro, observam-se leucócitos e algumas células epiteliais anucleadas remanescentes. Nesta fase inicia-se o aumento da secreção de estrógeno e o primeiro pico de progesterona. Na fase diestro observam-se basicamente leucócitos e algumas células epiteliais nucleadas, sendo marcado pelo final do primeiro pico de progesterona e baixos níveis de estrógeno. Na terceira fase, proestro, o número de células epiteliais nucleadas aumenta enquanto os leucócitos praticamente desaparecem, ocorrendo neste momento o pico de secreção de estrógeno e o segundo pico de progesterona, enquanto na fase estro são visualizadas basicamente células epiteliais queratinizadas da camada córnea e o nível de estrógeno retorna aos valores basais (Hoar; Hickman, 1975; Marcondes et al., 2002). Sendo assim, os animais que foram submetidos à ovariectomia permaneceram sempre na fase diestro, enquanto aqueles nos quais foi realizada somente a simulação, não houve qualquer alteração em seu ciclo estral (Figura 5).

Figura 5. À esquerda, coleta do fluido vaginal; à direita, fotomicrografia do fluido vaginal não corado, em rata em diestro, com predominância de leucócitos.

Durante o processo de sacrifício dos animais, foi possível avaliar, também, o efeito da ovariectomia, por meio do exame macroscópico dos cornos uterinos. Para a realização desta análise foi necessário, antes do sacrifício dos animais, incisionar a região abdominal para localização das respectivas estruturas. Nos animais ovariectomizados os cornos uterinos apresentaram-se finos, atróficos e anêmicos (Figura 6).

Figura 6. À esquerda, cornos uterinos de aspecto normal e presença do ovário. À direita, cornos uterinos atrofiados confirmando o sucesso da ovariectomia.

5.3 Grupo Controle- Sham

Os animais do grupo controle foram submetidos apenas ao estresse da cirurgia, tendo os ovários expostos ao ambiente e recolocados, em seguida, no interior do abdômen (Figura 7). Assim como os animais do grupo tratado, estes foram anestesiados antes do procedimento cirúrgico e medicados, após a cirurgia, com dose única de 24.000UI/Kg de penicilina (Fort Dodge), via intramuscular, e uma dose de 1,1 mg/Kg de flunixin meglumina (Schering-Plough Coopers Brasil), sendo observados, rotineiramente, por 150 dias.

Figura 7. Cirurgia do grupo “sham” com exposição do ovário e recolocação do mesmo no interior do abdômen.

5.4 Sacrifício dos animais e coleta de material

As ratas foram sacrificadas com *overdose* de anestésico cetamina e xilazina após 150 dias da cirurgia de ovariectomia e foi, então, realizada a coleta dos fêmures e da calvária para a realização das duas culturas celulares como descrito a seguir.

5.4.1 Cultura de células mesenquimais da medula óssea de ratas

Os experimentos com cultura de células foram realizados no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. A cultura de células mesenquimais obtidas da medula óssea de fêmures das ratas foi realizada como descrito por (Maniatopoulos et al., 1988). Os fêmures foram retirados e transportados até o laboratório em meio de transporte α -MEM (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 720 μ L de fungizona (Gibco) e 3 mL de gentamicina (Gibco). No fluxo laminar, os fêmures foram submetidos à anti-sepsia (clorexidina a 2,5% e álcool a 70% por 1 minuto cada). Posteriormente, foi realizada a remoção de tecidos moles restantes nos fêmures por meio de lâmina de bisturi intercalada com a permanência dos mesmos em meio de transporte/lavagem por 15 minutos (três vezes). As epífises foram cortadas e a medula óssea extraída do fêmur por meio de irrigação das diáfises com meio de cultura.

As células foram mantidas em frascos de 75 cm² (Corning, Corning, NY, EUA) com meio total suplementado (MTS), contendo α -MEM (Gibco), 10% de soro fetal bovino (Gibco), dexametasona 10^{-7} (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 5 μ g/mL de ácido ascórbico (Gibco), 0,3 μ g/mL de fungizona (Gibco), 50 μ g/mL de gentamicina (Gibco) e 2,16 g/mL de β -glicerofosfato.

Após atingirem subconfluência, as células foram liberadas enzimaticamente dos frascos de cultura pela adição de solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM (Gibco), 1,3 mg/mL de collagenase tipo II (Gibco) e tripsina a 0,25% (Gibco) e colocadas em presença de quantidade suficiente de meio de cultura para interromper a ação enzimática. Posterior à centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos para obtenção do precipitado celular, as células foram homogeneizadas em meio de cultura MTS e uma alíquota de 100 μ L desta solução, adicionada à porção igual de

corante azul de tripan 0,1% (Sigma) foi utilizada para contagem celular por meio de um contador de células automático (Countess automated cell counter tm, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A primeira passagem celular foi utilizada para realização dos experimentos.

As células foram cultivadas no mesmo meio de cultura descrito acima (MTS), na concentração de 8×10^4 células por garrafa de cultura. As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de dióxido de carbono e 95% de ar atmosférico. Durante o tempo de cultivo, as células foram acompanhadas por meio de observação em microscópio de luz invertido (Axiovert 25, Zeiss, Alemanha) sendo os meios de cultura trocados a cada 3 ou 4 dias.

As culturas celulares foram divididas em dois grupos experimentais: controle (células de ratas sem a indução da osteoporose) e tratado (células de ratas ovariectomizadas).

5.4.2 Cultura de células da calvária de ratas

Fragmentos de calvária das ratas foram obtidos dos mesmos animais. As células foram isoladas e cultivadas de acordo com métodos descritos por (Mailhot & Borke, 1998) e (Maniopoulos e cols.,1988), com protocolo já estabelecido em nosso laboratório.

Os fragmentos foram triturados, transferidos para um tubo de centrifuga estéril para digestão através da adição de collagenase tipo II (Gibco) na concentração de 1mg/mL e colocados em banho de água a 37°C sob agitação constante. Após 15 minutos de digestão, o sobrenadante foi removido e transferido para outro tubo de centrifuga contendo metade de volume de meio de cultura. Este procedimento de

digestão com collagenase foi realizado três vezes. O sobrenadante da primeira digestão foi descartado e os das últimas duas digestões foram centrifugados a 2000 rpm por 5 minutos. Os sobrenadantes, resultantes da centrifugação, foram removidos e as células e fragmentos, ressuspensos em MTS e colocados em garrafas de cultura de 75 cm². Ao atingirem confluência, as células foram removidas dos frascos de cultura por meio de EDTA 1 mM (Gibco) e tripsina 0,25% (Gibco), contadas utilizando o contador automático (Invitrogen) e a primeira passagem foi utilizada para cultivo em garrafas de cultura a uma densidade celular de 8×10^4 células por garrafa. Durante todo o período de cultura, as células foram mantidas em ambiente úmido com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico, e o meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. As culturas de células osteoblásticas foram divididas também em dois grupos experimentais: controle (células de ratas sem a indução da osteoporose) e tratado (células de ratas ovariectomizadas).

5.5 Ensaio Bioquímicos

5.5.1 Proliferação Celular

Ao final de 3, 7 e 10 dias, as células dos grupos experimentais foram lavadas três vezes com solução de PBS (Gibco) aquecida a 37°C e depois adicionados 1,0 mL por poço da solução de tripsina e EDTA, levadas para a incubadora por 5 minutos para posterior transferência para vials de 2,0 mL. A esta solução foi adicionado 500 µL de meio suplementado para inativação da tripsina. Em seguida, 100 µL da suspensão de células mais 100 µL de azul de tripan foram homogeneizados, dos quais 10 µL foram inseridos em slides para contador de células automático (Invitrogen). A proliferação celular foi expressa como número de células $\times 10^4$ por poço.

5.5.2 Viabilidade Celular

Aos 3, 7 e 10 dias de cultura, a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} (Sigma). Após remoção do meio de cultura, as células foram incubadas com solução de MTT em meio de cultura por 4 horas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Passado esse período, o meio de cultura foi retirado dos poços e, em seguida, adicionado 1 mL de solução de isopropanol ácido (Merck, Darmstadt, Alemanha) em cada poço sob agitação por 5 minutos, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 150 µL foram retiradas dos poços e transferidas para uma placa de 96 poços para medida colorimétrica em espectrofotômetro (µQuant, Bio-tek Instruments, Winooski, VT, EUA) a 570 nm.

5.6 Extração de RNA Total

Para a extração de RNA total das células osteoblásticas da calvária e medula óssea utilizamos o *mirVana™ miRNA Isolation Kit* (Ambion®, Austin, TX, USA).

Após atingirem subconfluência, o meio de cultura foi removido das garrafas e estas então foram lavadas 3 vezes com PBS. Após remoção total do PBS, adicionou-se 600 µl de solução de lise (*Lysis/Binding Solution*) agitando-se vigorosamente com a ajuda de um vórtex para a lise completa das células. Em seguida, adicionou-se 60 µl de *Homogenate Additive* e após agitação por 15 segundos, as amostras ficaram em gelo picado por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 600 µl de *Acid-Phenol:Chloroform* e agitou-se no vórtex por 60 segundos. O lisado foi então centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente para a separação das fases aquosa e orgânica. A fase aquosa foi

cuidadosamente transferida para um novo tubo ao qual foram adicionados, 1,25x do volume recuperado, de etanol 100% a temperatura ambiente. Para cada amostra foi utilizada uma coluna em um tubo coletor no qual 700 µl da mistura lisado/etanol foram pipetados na coluna e centrifugados por 15 segundos a 10.000 x g. O líquido foi descartado e o procedimento repetido até que toda mistura fosse filtrada. Em seguida, aplicou-se 700 µL *miRNA Wash Solution 1* a coluna e centrifugou-se por 10 segundos a 10.000 x g. O líquido foi descartado e 500 µL *Wash Solution 2/3* foram aplicados a coluna e centrifugados por 10 segundos a 10.000 x g. Repetiu-se este último passo e após descartar o líquido, centrifugou-se por 1 minuto para remoção de resíduos líquidos no filtro. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor e a ela foram adicionados 100 µl de água DEPC pré-aquecida (95°C). Centrifugou-se por 30 segundos para eluição do RNA o qual foi então conservado a -80°C.

As quantificações das amostras de RNA total foram feitas utilizando o aparelho *NanoVue Plus Spectrophotometer* (GE Healthcare, United Kingdom) em diferentes comprimentos de onda: 230, 260, 280 e 320.

5.7 Avaliação da integridade do RNA Total

A qualidade das amostras de RNA total foi determinada por meio de eletroforese microfluídica utilizando o aparelho *Bioanalyzer 2100 Agilent* e com os *RNA 6000 Nano Chips* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Figura 8. Aparelho Bioanalyzer 2100 Agilent e RNA 6000 Nano Chips utilizados na eletroforese microfluídica.

Antes de iniciar o preparo do gel para a eletroforese, todos os reagentes, que até o momento estavam armazenados em freezer, foram mantidos por 30 minutos a temperatura ambiente. Decorrido o tempo, iniciou-se o preparo do gel pipetando 550 μ l do RNA 600 Nano Gel em uma coluna com filtro e centrifugou-se por 10 minutos a 1.500 x g a temperatura ambiente. Uma alíquota de 65 μ l foi colocada num tubo eppendorf de 0,5 ml e adicionou-se 1 μ l de RNA 6000 *Nano Dye* e após agitação por 10 segundos, centrifugou-se por 10 minutos a 13.000 x g a temperatura ambiente. Em seguida, iniciou-se o preparo do RNA 6000 Nano Chip o qual foi colocado no *priming station* com os ajustes corretos. Primeiramente pipetou-se 9 μ l da mistura gel/dye na região G indicada no chip e com o auxílio de uma seringa acoplada ao *priming station* distribuiu-se o gel por todo o chip. Em seguida, pipetou-se 9 μ l das misturas nos demais pontos indicados com a letra G. Pipetou-se 1 μ l do marcador na posição indicada e 5 μ l do RNA 6000 *Nano Marker* em cada posição relacionada as amostras assim como na posição do marcador. Por ultimo, 1 μ l de cada amostra foi adicionado nos respectivos poços marcados de 1 a 12 e com a ajuda de um aparelho tipo vórtex IKA MS 3 (Manca, Hong Kong, China) agitou-se o chip

horizontalmente por 1 minuto a 2200 rpm antes da leitura. Com a ajuda do *Agilent 2100 Expert Software* obteve-se o resultado (eletroforograma e densitometria dos géis).

5.8 OLIGO MICROARRAYS

5.8.1 mRNAs *microarrays*

Os *microarrays* genoma completo da Agilent no formato 4x44k são preparados pelo processo *SurePrint* (Sistema de Impressão), no qual 44.000 oligos de 60 mer são sintetizados *in situ* em lâminas de vidro especialmente preparadas. Este processo de síntese *in situ* possibilita a fixação de oligonucleotídeos, sintetizando-os base a base com extrema precisão utilizando arquivos de sequências de RNA mensageiros (mRNA) provenientes de bancos de dados.

Figura 9. Agilent *microarrays* genoma completo no formato 4x44K contendo oligonucleotídeos sintetizados com base nas sequências de RNAs mensageiros.

5.8.1.1 Marcação e purificação

A amplificação e a marcação das amostras com o fluorocromo foram feitas com o *Quick Amp Labeling Kit One-Color* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). O primeiro passo envolveu a diluição do *Agilent One-Color Spike Mix*. A solução foi aquecida a 37°C em banho-maria por 5 minutos, homogeneizada por meio de agitação em vórtex e depois brevemente centrifugada antes do uso. Em seguida, foram feitas diluições seriadas segundo recomendações do fabricante levando em consideração a quantidade inicial de RNA total. Para nossas amostras utilizamos 500 ng de RNA total num volume final de 5,3 µl. A primeira diluição (1:20) foi feita utilizando-se 2 µl do *Agilent One-Color Spike Mix* e 38 µl do *Dilution Buffer*. Após homogeneização em vórtex, retirou-se 2 µl dessa primeira diluição e adicionou-se 48 µl do *Dilution Buffer*, obtendo-se assim a segunda diluição (1:25). Para a terceira diluição (1:10) foram utilizados 4 µl da segunda diluição mais 36 µl do *Dilution Buffer*. Feitas as diluições, iniciou-se o protocolo de amplificação e marcação das amostras adicionando 500 ng de RNA total a um tubo de 1,5 mL e depois 1,2 µl de *T7 Promoter Primer*. Em seguida, adicionou-se água livre de nucleases a 5 µl da terceira diluição do *Agilent One-Color Spike Mix* obtendo um volume final de 11,5 µl. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 10 minutos e depois em gelo por mais 5 minutos. Durante o período de incubação, o *cDNA Master Mix* foi preparado com 18 µl de *5x First Strand Buffer* (pré-aquecido a 80°C por 4 minutos), 9 µl de 0,1M DTT, 4,5 µl de 10mM dNTP mix, 4,5 µl de MMLV-RT e 2,3 µl de *RNaseout* sendo distribuído um volume de 8,5 µl do mix em cada tubo de amostra. Após homogeneização as amostras foram incubadas a 40°C em banho-maria por 2 horas. Ao final deste período, as amostras foram transferidas para banho-maria a

65°C e incubadas por mais 15 minutos. Depois foram colocadas em gelo picado por mais 5 minutos.

Imediatamente antes do uso foi preparado o *Transcription Master Mix* contendo 68,9 µl de água livre de nucleases, 90 µl de *4x Transcription Buffer*, 27 µl de 0,1M DTT, 36 µl de NTP mix, 28,8 µl de 50% PEG (pré-aquecido a 40°C por 1 minuto), 2,3 µl de *RNaseout*, 2,7 µl de *Inorganic Pyrophosphatase*, 3,6 µl de *T7 RNA Polymerase* e 10,8 de *Cyanine 3-CTP*. Cada tubo de amostra recebeu 60 µl desse *Transcription Master Mix* e após homogeneização foram incubados a 40°C em banho-maria por mais 2 horas.

O próximo passo envolve a purificação do RNA amplificado e marcado. Para tal procedimento foi utilizado o *Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Um passo inicial de limpeza do RNA foi realizado adicionando 3,5x o volume da reação (280 µl) do tampão RA1 em cada amostra. Em seguida, em cada tubo foram adicionados 280 µl de etanol 100% (equivalente também a 3,5x o volume da reação) com posterior homogeneização.

A purificação do RNA foi realizada através de mini colunas RNAspin aplicando o volume total (640 µl) de cada amostra na coluna seguida de centrifugação de 30 segundos de 8000 x g. Cada coluna foi transferida então para um tubo coletor. Os passos de dessalinização da membrana sílica, digestão do DNA, lavagem e secagem da membrana sílica recomendados pelo kit não foram realizados. A purificação foi retomada a partir da segunda lavagem aplicando-se 600 µl do tampão RA3 em cada coluna seguida da centrifugação de 1 minuto a 11000 x g. O líquido foi descartado e para a terceira lavagem foram utilizados 250 µl do tampão RA3, seguida da centrifugação por 2 minutos a 11000 x g. O último passo do kit envolveu

a eluição do RNA em alta concentração adicionando-se 40 µl de água livre de nucleases seguido de centrifugação por 1 minuto a 11000 x g.

Em seguida o RNA foi quantificado em um espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000 UV-VIS* (NanoDrop Technologies) calculando-se a massa de RNA. Além disso, foi determinada a incorporação do fluorocromo cianina (Cy3) nas amostras (pmol Cy3/ul). O valor da incorporação total dividido pela massa total fornece um valor que serve como referência para o prosseguimento do passo de hibridação dos *microarrays*.

Anterior ao passo de hibridação, as amostras passaram por um processo de fragmentação utilizando o *Fragmentation mix* para *microarrays* Agilent 4x44K. Cada amostra contendo 1,65 µg de RNA amplificado e marcado (cRNA) recebeu 11 µl de *10X Blocking Agent* (preparado com a adição de 500 µl de água livre de nucleases e aquecido a 37°C por 4 minutos). Nesse momento o volume da reação não deve ser superior a 52,8 µl sendo necessário completar cada amostra com o volume de água livre de nucleases correspondente. Por último adicionou-se 2,2 µl de *25x Fragmentation Buffer* em cada tubo sendo o volume final da reação de 55 µl. Em seguida as amostras foram incubadas a 60°C em banho-maria por 30 minutos. Enquanto ocorria a incubação, as câmaras de hibridação contendo as lâminas da Agilent foram preparadas para receber as amostras.

5.8.1.2 Hibridação das amostras e lavagem das lâminas

Após a incubação adicionou-se 55 µl do *2x GEx Hybridization Buffer HI-RPM* em cada tubo e após homogeneização as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 13000 x g. Um volume de 100 µl de cada amostra foi utilizado para o processo de hibridação em forno a 65°C com rotação de 10 rpm por 17 horas.

Em cada lâmina Agilent 4x44K estão 4 *arrays* contendo todo o genoma do rato. As marcações dos 4 grupos experimentais (medula controle e tratada, calvária controle e tratada) foram realizadas em triplicata. Portanto, um total de 3 lâminas foram utilizadas neste trabalho.

Após a hibridação, as lâminas passaram por um processo de lavagem na seguinte ordem: tampão 1 (*GE Wash Buffer 1*- 0,005% Triton X-102) por 1 minuto a temperatura ambiente, tampão 2 (*GE Wash Buffer 2*- 0,005% Triton X-102) por 1 minuto a 37°C. Ambas as lavagens foram feitas em um agitador com o uso de barras magnéticas. Em seguida as lâminas foram colocadas em solução de acetonitrila por 10 segundos a temperatura ambiente e por último na solução *Stabilization and Drying* por 30 segundos a temperatura ambiente para prevenir a degradação da cianina 3 (Cy3) pelo ozônio do ar ambiente.

5.8.1.3 Leitura das lâminas e extração dos dados brutos

Após serem retiradas da solução, as lâminas foram imediatamente levadas para leitura (*scannig*) evitando o impacto dos oxidantes ambientais. Foi utilizado o *DNA Microarray Scanner* (Agilent Technologies) e os dados foram extraídos com o *Agilent Feature Extraction Software*.

5.8.2 microRNA *microarrays*

Os *microarrays* de miRNAs Agilent 8x15k utilizados neste trabalho também são preparados pelo processo *SurePrint* (Sistema de Impressão), no qual aproximadamente 15000 oligos são depositados uniformemente em lâminas de vidro previamente preparadas. Este processo de síntese *in situ* possibilita a deposição de

oligonucleotídeos base a base, de 40-60 mer de comprimento (o que inclui a sequência de miRNA e uma cauda extra), com extrema precisão, resultando em alta pureza e alta fidelidade das sondas de miRNAs.

Figura 10. Agilent *microarrays* de miRNAs no formato 8x15K contendo oligonucleotídeos sintetizados com base nas sequências de miRNAs.

5.8.2.1 Marcação das amostras

O processo de marcação foi feito com o *miRNA Complete Labeling and Hyb Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) no qual foram utilizados 100 ng de RNA total. O primeiro passo envolveu a diluição do RNA total para 50 ng/ μ L em água livre de nucleases. Posteriormente adicionou-se 2 μ L (100 ng) dessa diluição em um tubo de 0,5 mL e conservou-se no gelo enquanto foi preparado o *CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) Master Mix*, que foi feito sem a marcação do *Spike-In*. A reação por amostra do *CIP Master Mix* continha: 0,4 μ L de 10x *Calf Intestinal Phosphatase Buffer*, 1,1 μ L de água livre de nucleases e 0,5 μ L de *Calf Intestinal Phosphatase*, sendo o volume final de cada amostra de 4 μ L.

O passo seguinte envolveu a defosforilação das amostras. Todos os tubos foram colocados a 37°C em banho-maria por 30 minutos. Em seguida, para

desnaturação das amostras foram adicionados 2,8 µl de DMSO 100% deixando a 100°C em banho-maria por 8 minutos. Após esse tempo, os tubos foram colocados imediatamente em um banho frio feito de uma mistura de água e gelo.

Após a desnaturação das amostras, o *Ligation Master Mix* foi preparado. Nesse mix utilizou-se por amostra: 1 µl de *10x T4 RNA Ligase Buffer* (aquecido previamente a 37°C para dissolução do precipitado), 3 µl de *Cyanine3-pCp* e 0,5 µl de *T4 RNA Ligase* (mantida a temperatura ambiente durante o preparo da reação). Após a adição do mix, os tubos contendo um volume final de 11,3 µl passaram por rápida centrifugação e levados para incubação a 16°C em termociclador por 2 horas.

Após a incubação as amostras foram submetidas a secagem à vácuo a uma temperatura entre 45°C e 55°C, no aparelho *SC110A SpeedVac® Plus Concentrator* (Savant Instruments, Holbrook, NY, USA), por aproximadamente 1 hora, sendo fundamental que estivessem totalmente secas e sem resíduos de DMSO.

Na etapa que antecede a hibridação, as amostras foram ressuspensas em 18 µl de água livre de nucleases e em seguida pipetou-se 4,5 µl de *10x Blocking Agent* (preparado com a adição de 125 µl de água livre de nucleases e aquecido a 37°C por 4 minutos) e 22,5 µl de *2x HI-RPM Hybridization Buffer*, resultando num volume de 45 µl. Após serem misturadas gentilmente, as amostras foram incubadas a 100°C por 5 minutos e imediatamente transferidas para o gelo por 5 minutos.

5.8.2.2 Hibridação das amostras e lavagem das lâminas

Enquanto ocorria a incubação, as câmaras de hibridação contendo as lâminas da Agilent foram preparadas para receber as amostras. Para o processo de hibridação foram adicionados 50 µl de cada amostra para hibridação em forno a 55°C, a uma rotação de 20 rpm por 20 horas.

Em cada lâmina Agilent 8x15k de microRNA *microarray* estão 8 *arrays* contendo todas as sequências conhecidas de microRNAs de rato. As marcações dos 4 grupos experimentais (medula controle e tratada, calvária controle e tratada) foram realizadas em quadruplicata. Portanto, para o presente trabalho foram utilizadas duas lâminas.

Após a hibridação, as lâminas foram submetidas à imersão em *GE Wash Buffer 1* (com 0,005% de Triton X-102) a temperatura ambiente, para liberação da lâmina em meio líquido, evitando o ressecamento e exposição ao ozônio do ar capaz de degradar a cianina.

Em seguida foram realizadas duas lavagens: a primeira no tampão 1 (*GE Wash Buffer 1*- 0,005% Triton X-102) a temperatura ambiente por 5 minutos e a segunda no tampão 2 (*GE Wash Buffer 2*- 0,005% Triton X-102) por 5 minutos a 37°C. A adição do Triton reduz a possibilidade de artefatos nos *arrays*.

5.8.2.3 Leitura das lâminas e extração dos dados brutos

Após serem retiradas da solução, as lâminas foram imediatamente levadas para leitura (*scanning*). Foi utilizado o *DNA Microarray Scanner* (Agilent Technologies) e os dados foram extraídos com o *Agilent Feature Extraction Software*.

5.8.3 Análise dos dados de *microarrays*

Após os dados terem sido extraídos com o uso do *Agilent Feature Extraction Software*, os arquivos gerados no programa foram analisados na plataforma de bioinformática Agilent GeneSpring 12.6 GX.

5.9 Reações de transcrição reversa

Reações de transcrição reversa foram realizadas com 2 µg de RNA total proveniente das amostras de células da medula óssea e calvária controle e tratadas, 1 µL de oligo (dT) e 1 µL de DNTP mix 10 nM em um volume de 12 µL, segundo instruções do fabricante. As amostras permaneceram a 65°C durante 5 minutos e então colocadas imediatamente no gelo e foi dado um spin, para que se evitasse a evaporação da amostra através da abertura do tubo. Em seguida, acrescentou-se 4 µL de *Buffer 5X First Strand*, 2 µL de DTT e 1 µL de RNAsin e deixou-se por 2 minutos a 42°C. Adicionou-se 1 µL da enzima *Superscript II RNase H Reverse Transcriptase* (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), resultando em um volume final de 20 µL. A reação permaneceu a 42°C por 50 minutos, seguidos de 15 minutos a 70°C.

5.10 Confirmação dos dados de *microarray* por PCR em tempo real (qPCR)

Após os experimentos realizados, foram adquiridos *primers* de genes importantes que atuam de alguma forma no controle da osteogênese, validando assim os experimentos de array. Os *primers* utilizados foram desenhados com auxílio do software Primer3 disponível em (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) cujos parâmetros foram ajustados para que todos apresentassem temperatura de anelamento (*annealing*) a 63°C (tabela I). O gene da β -actina foi utilizado como controle endógeno.

Tabela I. Primers utilizados para confirmação dos dados de *microarray* por PCR em tempo real.

Gene	Gene ID	Sequências <i>sense</i> e <i>antisense</i>
Notch1	25496	5' ACTGTGACAGCCAGTGCAAC 3' 5' GCCATCACTGAAGTGGTCCT 3'
Anxa5	25673	5' AGATGATGTGGTGGGGGATA 3' 5' AATGCCTGAGCATCCAGTTC 3'
Col5a1	85490	5' AAAGCCAAGAAAGGCAGTCA 3' 5' CTTCCCTGTGTGGTCCTCAT 3'
Spp1	25353	5' GATCGATAGTGCCGAGAAGC 3' 5' TGAAACTCGTGGCTCTGATG 3'
Sp7	300260	5' CTGCAACTGGCTTTTCTGTG 3' 5' GTAAAGCGCTTGGAGCAGAG 3'
Dkk1	293897	5' TTAGTGTGGGGAAGGTCTGG 3' 5' GTCCATCGCATTTAGGCTGT 3'
β-actina	81822	5' TTGCTGACAGGATGCAGAAG 3' 5' CAGTGAGGCCAGGATAGAGC 3'

As reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foram realizadas utilizando o reagente SYBR Green (Applied Biosystems) em placas de 48 poços, com ciclagem padrão de aproximadamente 2 horas. O aparelho utilizado foi o StepOne (Applied Biosystems), juntamente com o software de leitura de mesmo nome (versão 2.1- Applied Biosystems).

O processo constitui-se de duas etapas. A primeira delas constitui-se da avaliação da especificidade dos produtos de PCR por meio de uma análise de uma curva de dissociação. Para isso, foi realizada uma quantificação absoluta de cada par de primers, inclusive dos genes constitutivos, utilizando diluições seriadas (1, 1:10, 1:100 e 1:1000) de cDNA para calcular a eficiência da reação e,

consequentemente dos *primers*. A reação consiste de amplificação seguida de dissociação. A segunda etapa é a reação quantitativa propriamente dita. Para tal, foi realizada a quantificação relativa para avaliar a expressão gênica em cada amostra e compará-las entre si. A reação final consiste de 20 μL : 7,4 μL de água livre de nucleases, 0,8 μL de cada *primer*, 10 μL da solução de SYBR Green e 1 μL de cDNA (sintetizado como já descrito acima).

O protocolo de ciclagem térmica foi: 1x 95°C por 10 minutos (*Holding stage*), 40x a 95°C por 15 segundos para a desnaturação e 1x 60°C por 1 minuto para o anelamento (*Cycling stage*) e obtenção da Curva de Melting (*Melting curve stage*). A curva é obtida após três passos, sendo o primeiro a 95°C por 15 segundos, o segundo a 60°C por 1 minuto e o terceiro a 95°C por 15 segundos.

Os resultados foram analisados com base no valor de CT (cycle threshold – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação atinge um dado limiar que permite a análise quantitativa da expressão do gene avaliado.

5.11 Análise estatística dos dados de PCR quantitativa em tempo real

A avaliação da expressão dos transcritos por PCR quantitativa em tempo real ocorre por meio de uma análise diferente daquela empregada nos dados de *microarrays*. Os valores de quantificação relativa são calculados utilizando-se a comparação de genes constitutivos. Para análise estatística dos dados, foram utilizados Testes-T em cada par de condições por meio do software estatístico *GraphPad Prism 5.0* (<http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm>).

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Ensaio Bioquímicos

6.1.1. Proliferação celular

Ao final de 3 dias, a proliferação celular foi similar nos grupos de células provenientes da calvária de ratas controle (CC) e com osteoporose (CO), não havendo diferença significativa entre elas, enquanto que as células originárias da medula de ratas com osteoporose (MO) apresentaram uma menor proliferação quando comparado ao seu grupo controle (MC) com $p < 0,01$. Nos períodos experimentais de 7 e 10 dias, observou-se que o grupo CO apresentou menor proliferação celular quando comparado ao grupo CC ($p < 0,01$); o que não ocorreu na medula óssea, onde o grupo MO mostrou um aumento na proliferação quando comparado ao grupo MC ($p < 0,01$).

Ao comparar os grupos controles (CCxMC), notou-se maior proliferação nas células da calvária ao longo dos períodos experimentais ($p < 0,05$). Tal padrão não foi observado nas células da medula, que demonstraram uma queda na proliferação ao atingir o 10º dia de cultura. Ainda pode ser observado que nos grupos de células da medula óssea, MO mostrou maior proliferação que o grupo CO aos 7 e 10 dias ($p < 0,05$).

Figura 11 - Avaliação da proliferação celular de células osteoblásticas provenientes da calvária e medula óssea de ratas controle e com osteoporose aos 3, 7 e 10 dias de cultura celular. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com $p < 0,05$.

Proliferação celular			
		Kruskal Wallis	Mann Whitney
3 dias	MC x MO	0,000	0,000
	CC x CO		0,908
	MC x CC		0,012
	MO x CO		0,000
7 dias	MC x MO	0,000	0,325
	CC x CO		0,000
	MC x CC		0,000
	MO x CO		0,001
10 dias	MC x MO	0,000	0,000
	CC x CO		0,000
	MC x CC		0,000
	MO x CO		0,000

6.1.2. Viabilidade celular (MTT)

No ensaio colorimétrico (MTT), o comportamento foi diferente entre as células dos grupos CC e CO durante os períodos experimentais ($p < 0,05$). Enquanto o grupo CC apresentou um pico aos 7 dias de cultura, o grupo CO demonstrou um aumento na viabilidade no decorrer dos períodos de cultura. Entre os grupos MC e MO, exceto aos 7 dias, a viabilidade celular foi maior no grupo com osteoporose que no grupo controle ($p < 0,01$).

Diferenças significantes foram notadas ao comparar os grupos controles (CCxMC) e com osteoporose (COxMO), onde as células provenientes da calvária apresentaram maior viabilidade que as células diferenciadas da medula óssea ($p < 0,05$) em todos os períodos de cultura.

Figura 12- Viabilidade celular de células osteoblásticas provenientes da calvária e medula óssea de ratas controle e com osteoporose aos 3, 7 e 10 dias de cultura celular, avaliada por meio de ensaio colorimétrico (MTT). Teste estatístico de Kruskal-Wallis com $p < 0,05$.

Viabilidade celular (MTT)			
		Kruskal Wallis	Mann Whitney
3 dias	MC x MO	0,001	0,009
	CC x CO		0,028
	MC x CC		0,009
	MO x CO		0,009
7 dias	MC x MO	0,001	0,009
	CC x CO		0,009
	MC x CC		0,009
	MO x CO		0,016
10 dias	MC x MO	0,001	0,530
	CC x CO		0,009
	MC x CC		0,009
	MO x CO		0,009

6.2. Avaliação da integridade das amostras de RNA

As amostras de RNA total provenientes de células osteoblásticas da calvária e medula óssea de ratas controle e ovariectomizadas foram analisadas por eletroforese microfluídica utilizando o aparelho *Agilent 2100 Bioanalyzer*. A integridade das amostras pode ser observada pela imagem do gel virtual (Figura 13), e da densitometria, nas quais podem ser vistas as frações de RNAr 28S, RNAr 18S, RNAs 4-5S e também de RNAs de baixo peso molecular exibindo perfil de boa integridade (Figura 14).

Figura 13. Eletroforese microfluídica (Agilent RNA Nano Chips 6000) das amostras de RNA estudadas, mostrando as bandas de RNAr 28S, RNAr 18S e RNAs 4-5S. O retângulo em vermelho indica as quatro amostras estudadas: medula OVX, medula Ctrl, calvária OVX e calvária Ctrl, respectivamente.

Figura 14. Densitometria da eletroforese microfluídica (Agilent RNA Nano Chips 6000) das amostras de RNA estudadas, mostrando os respectivos picos das frações de RNAr 28S, RNAr 18S e RNAs 4-5S (da direita para a esquerda de cada densitometria).

A figura acima mostra o número RIN (*RNA Integrity Number*) de cada amostra. O grupo das células da MO apresentou baixo número RIN (6,10), no entanto, analisando os gráficos referentes a esse grupo foi possível identificar os picos correspondentes aos padrões de bandas de RNAr 28S, RNAr 18S, RNAr 5S e RNAt 4S, e concluímos que não haveria problema em usar essa amostra para os ensaios de *microarray*. O mesmo ocorre com o grupo das células da CO o qual não foi possível calcular o número RIN, no entanto, analisando seus gráficos chegamos à conclusão de que não haveria problema em usar esta amostra, pois não apresentava RNA degradado.

6.3. Análise dos RNAs mensageiros diferencialmente expressos

Após os dados terem sido extraídos com o uso do *Agilent Feature Extraction Software*, os arquivos gerados no programa foram analisados na plataforma de

bioinformática Agilent GeneSpring 12.6 GX. Visando um maior entendimento e clareza nos resultados, nossa análise foi dividida em duas etapas. Primeiro foram analisados os genes diferencialmente expressos entre as células da calvária de ratas controle e tratada. Os dados foram normalizados utilizando-se quantil e após análise estatística por teste-t não pareado com $p\text{-value} \leq 0.005$ e posterior *fold change* > 2.0 , foram evidenciados 5.447 mRNAs diferencialmente expressos (Figura 15). Dividindo os genes em induzidos e reprimidos e utilizando o banco de dados do *David Functional Annotation* (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) como ferramenta, e após escolha de um *p-value cutt off* $< 0,05$, foram selecionados apenas os processos biológicos de interesse para o estudo. Entre eles estão os grupos de genes pertencentes aos processos biológicos de *regulação da proliferação celular* (Tabela III) e *resposta a substâncias orgânicas* (Tabela IV) para os genes reprimidos e *envelhecimento* (Tabela V), *desenvolvimento ósseo* (Tabela VI) e *regulação da proliferação celular* (Tabela VII) para os genes induzidos. Na segunda etapa foram analisados os genes diferencialmente expressos entre as células derivadas da medula óssea de ratas controle e tratada. Após a análise estatística (teste-t não pareado com $p\text{-value} \leq 0.005$ e *fold change* > 2.0) foram evidenciados 4.399 mRNA diferencialmente expressos (Figura 16). Da mesma forma como feito para os genes diferencialmente expressos da calvária, com base no banco de dados *David* (*p-value cutt off* < 0.05), os genes relacionados aos seguintes processos biológicos foram selecionados para estudos posteriores: *resposta a substâncias orgânicas* (Tabela VIII) e *regulação da proliferação celular* (Tabela IX) para o grupo de genes reprimidos, e *regulação da proliferação celular* (Tabela X) e *resposta a substâncias orgânicas* (Tabela XI) para o grupo de genes induzidos.

Figura 15. Matriz de expressão de 5447 mRNA de células da calvária de ratas controle e ovariectomizadas. A correlação de Pearson foi utilizada como medida de similaridade. O vermelho representa indução, o verde repressão e o preto não modulação.

Tabela III. Genes reprimidos do grupo da calvária controle pertencentes ao processo biológico de *regulação da proliferação celular*.

ID	Gene Name
Bcl6	B-cell CLL/lymphoma 6
Cd40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
Dbp	D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein
Dnaja3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 3
E2f7	E2F transcription factor 7
Egln3	EGL nine homolog 3 (C. elegans)
Eid2	EP300 interacting inhibitor of differentiation 2
Fcgr2b	Fc fragment of IgG, low affinity Iib and IIa, receptor (CD32)
Gli2	GLI family zinc finger 2
Jak3	Janus kinase 3
Kiss1r	KISS1 receptor
Klf5	Kruppel-like factor 5
Marcks1	MARCKS-like 1
Nkx2-8	NK2 homeobox 8
Nkx2-5	NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila)
Notch1	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)
Ptk2b	PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta
Rerg	RAS-like, estrogen-regulated, growth-inhibitor
Sox4	SRY (sex determining region Y)-box 4
Tgif1	TGFB-induced factor homeobox 1
Wisp2	WNT1 inducible signaling pathway protein 2
Adora1	adenosine A1 receptor
Aif1	allograft inflammatory factor 1
Apln	Apelin
Axin2	axin2
Cav2	caveolin 2
Cxcl12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)
Clu	Clusterin
F2r	coagulation factor II (thrombin) receptor
Cyp27b1	cytochrome P450, family 27, subfamily b, polypeptide 1
Cyp7b1	cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide 1
Dpt	Dermatopontin
Dlx5	distal-less homeobox 5
Edn1	endothelin 1
Epo	Erythropoietin
Eif2ak1	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 1
Fgf1	fibroblast growth factor 1
Fgf17	fibroblast growth factor 17
Fgfr2	fibroblast growth factor receptor 2
Flt1	fms-related tyrosine kinase 1
Flt3	fms-related tyrosine kinase 3
Flt4	fms-related tyrosine kinase 4

Foxp3	forkhead box P3
Fosl1	fos-like antigen 1
Glp1r	glucagon-like peptide 1 receptor
Gpc3	glypican 3
Ghrh	growth hormone releasing hormone
Hnf4a	hepatocyte nuclear factor 4, alpha
Irs2	insulin receptor substrate 2
Insl3	insulin-like 3
Igf1	insulin-like growth factor 1
Igfbp3	insulin-like growth factor binding protein 3
Il6	interleukin 6
Krt4	keratin 4
Kdr	kinase insert domain protein receptor
Kifap3	kinesin-associated protein 3
Lta	lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
Mmp7	matrix metalloproteinase 7
Mitf	microphthalmia-associated transcription factor
Muc2	mucin 2, oligomeric mucus/gel-forming
Myc	myelocytomatosis oncogene
Ngf	nerve growth factor (beta polypeptide)
Osr2	odd-skipped related 2 (Drosophila)
Osmr	oncostatin M receptor
Ovol2	ovo-like 2 (Drosophila)
Pparg	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
Plcd3	phospholipase C, delta 3
Pdgfb	platelet-derived growth factor beta polypeptide
Pml	promyelocytic leukemia
Prkca	protein kinase C, alpha
Ptpn6	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6
Ptprv	protein tyrosine phosphatase, receptor type, V
Rac2	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2
Rara	retinoic acid receptor, alpha
Rbp4	retinol binding protein 4, plasma
Runx3	runt-related transcription factor 3
Nos2	nitric oxide synthase 2
Gtbbp4	GTP binding protein 4
S1pr1	sphingosine-1-phosphate receptor 1
Syk	spleen tyrosine kinase
Sod2	superoxide dismutase 2, mitochondrial
Tac1	tachykinin 1
Txnip	thioredoxin interacting protein
Tlr4	toll-like receptor 4
Tgfbr1	transforming growth factor, beta receptor 1
Tgm2	transglutaminase 2, C polypeptide
Ube2a	ubiquitin-conjugating enzyme E2A, RAD6 homolog (S. cerevisiae)
Uts2r	urotensin 2 receptor

Kras	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Vegfc	vascular endothelial growth factor C
Vash2	vasohibin 2
Zap70	zeta-chain (TCR) associated protein kinase
Zmiz1	zinc finger, MIZ-type containing 1

Tabela IV. Genes reprimidos do grupo da calvária controle pertencentes ao processo biológico de resposta a substâncias orgânicas.

ID	Gene Name
Pfkfb1	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1
Akap1	A kinase (PRKA) anchor protein 1
Abcb1b	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B
Abcb4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4
Abcg1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1
Atp7b	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide
Ddah1, Bcl10	B-cell CLL/lymphoma 10; dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1
Cd83	CD83 molecule
Derl3	Der1-like domain family, member 3
Epha3	Eph receptor A3
Fkbp1b	FK506 binding protein 1b
Hnf1b	HNF1 homeobox B
Meis2	Meis homeobox 2
Nkx2-5	NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila)
Ptk2b	PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta
Rerg	RAS-like, estrogen-regulated, growth-inhibitor
Sh2b2	SH2B adaptor protein 2
Sin3a	SIN3 homolog A, transcription regulator (yeast)
Sp100	SP100 nuclear antigen
Taf2	TAF2 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor
Vgf	VGF nerve growth factor inducible
LOC360228	WDNM1 homolog
Acta2	actin, alpha, cardiac muscle 1; smooth muscle alpha-actin
Acvr1c	activin A receptor, type IC
Acs1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1
Adcy10	adenylate cyclase 10 (soluble)
Adcy5	adenylate cyclase 5
Adcy7	adenylate cyclase 7
Adcy8	adenylate cyclase 8 (brain)
Adipoq	adiponectin, C1Q and collagen domain containing
Aldh1a1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1
Aif1	allograft inflammatory factor 1
Apoa5	apolipoprotein A-V
Apom	apolipoprotein M
Aqp2	aquaporin 2 (collecting duct)

Birc5	baculoviral IAP repeat-containing 5
Creb3l2	cAMP responsive element binding protein 3-like 2
Cdh1	cadherin 1
Car4	carbonic anhydrase 4
Casp12	caspase 12
Casp6	caspase 6
Ctsc	cathepsin C
Ccl5	chemokine (C-C motif) ligand 5
Cxcl12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)
Cxcl16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16
Chat	choline acetyltransferase
Chrn4	cholinergic receptor, nicotinic, beta 4
F2r	coagulation factor II (thrombin) receptor
F12	coagulation factor XII (Hageman factor)
C1qb	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide
C5ar1	complement component 5a receptor 1
Cfb	complement factor B
Cdo1	cysteine dioxygenase, type I
Cyp2j4	cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 4
Cyp2b2	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 2
Cyp2d1	cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 1
Cyp27b1	cytochrome P450, family 27, subfamily b, polypeptide 1
Cyp7b1	cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide 1
Drd5	dopamine receptor D5
Ern1	endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1
Ephx1	epoxide hydrolase 1, microsomal
Eif2ak3	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3
Eif4ebp2	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2
Flt3	fms-related tyrosine kinase 3
Fosl1	fos-like antigen 1
Gcgr	glucagon receptor
Glp1r	glucagon-like peptide 1 receptor
Grm2	glutamate receptor, metabotropic 2
Gys2	glycogen synthase 2
Cga	glycoprotein hormones, alpha subunit
Csf2ra	granulocyte-macrophage colony stimulating receptor alpha
Ghr	growth hormone receptor
Hnf4a	hepatocyte nuclear factor 4, alpha
Herpud1	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1
Hsd11b2	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2
Irs2	insulin receptor substrate 2
Igf1	insulin-like growth factor 1
Il6	interleukin 6
Irak2	interleukin-1 receptor-associated kinase 2
Irak3	interleukin-1 receptor-associated kinase 3

Khk	ketohexokinase
Lbp	lipopolysaccharide binding protein
Lta	lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
Mapt	microtubule-associated protein tau
Muc4	mucin 4, cell surface associated
Myc	myelocytomatosis oncogene
Mb	Myoglobin
Ngf	nerve growth factor (beta polypeptide)
Nnat	Neuronatin
Nr1h3	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3
Osmr	oncostatin M receptor
Oxt	oxytocin, prepropeptide
Pparg	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
Pde3b	phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited
Pfkl	phosphofructokinase, liver
Plat	plasminogen activator, tissue
Pdgfb	platelet-derived growth factor beta polypeptide
Pdcd7	programmed cell death 7
Prlh	prolactin releasing hormone
Pml	promyelocytic leukemia
Ptgds	prostaglandin D2 synthase (brain)
Prkca	protein kinase C, alpha
Rcan1	regulator of calcineurin 1
Rara	retinoic acid receptor, alpha
Rbp4	retinol binding protein 4, plasma
Ryr2	ryanodine receptor 2, cardiac
Cd36	similar to CD36 antigen; similar to fatty acid translocase/CD36
RGD1565355	similar to fatty acid translocase/CD36
Slc22a6	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 6
Slc6a3	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, dopamine), member 3
Srd5a2	steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 2
Star	steroidogenic acute regulatory protein
Tac1	tachykinin 1
Tac2	tachykinin 2
Txnip	thioredoxin interacting protein
Thbd	Thrombomodulin
Tlr4	toll-like receptor 4
Tlr6	toll-like receptor 6
Tgfbr1	transforming growth factor, beta receptor 1
Tap2	transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
Th	tyrosine hydroxylase
Kras	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Vps4b	vacuolar protein sorting 4 homolog B (S. cerevisiae)

Tabela V. Genes induzidos do grupo da calvária controle pertencentes ao processo biológico de *envelhecimento*.

ID	Gene Name
Fos	FBJ osteosarcoma oncogene
Casp9	caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase
Ctnna1	catenin (cadherin associated protein), alpha 1
Fads1	fatty acid desaturase 1
Fosl2	fos-like antigen 2
Gstm2	glutathione S-transferase mu 2
Igfbp2	insulin-like growth factor binding protein 2
Ilk	integrin linked kinase
Lonp1	lon peptidase 1, mitochondrial
Lrp1	low density lipoprotein-related protein 1 (alpha-2-macroglobulin receptor)
Mmp2	matrix metalloproteinase 2
Msh2	mutS homolog 2 (E. coli)
Pik3r1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)
Pdcd4	programmed cell death 4
Ptgs1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1
Serpine1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1
Gpx4	glutathione peroxidase 4
Slc1a2	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2
Serp1	stress-associated endoplasmic reticulum protein 1
Tgfb1	transforming growth factor, beta 1
Tgfb2	transforming growth factor, beta 2
Tgfb3	transforming growth factor, beta 3
Kras	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Rela	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
Vcam1	vascular cell adhesion molecule 1

Tabela VI. Genes induzidos do grupo calvária controle pertencentes ao processo biológico de *desenvolvimento ósseo*.

ID	Gene Name
Gli1	GLI-Kruppel family member GLI1
Gnas	GNAS complex locus
Ihh	Indian hedgehog
Sbds	Shwachman-Bodian-Diamond syndrome homolog (human)
Wwtr1	WW domain containing transcription regulator 1
Bmp3	bone morphogenetic protein 3
Col10a1	collagen, type X, alpha 1
Col11a1	collagen, type XI, alpha 1
Fgfr2	fibroblast growth factor receptor 2
Fn1	fibronectin 1
Fhl2	four and a half LIM domains 2
Hist2h4	histone cluster 2, H4

Insig2	insulin induced gene 2
Mmp2	matrix metalloproteinase 2
Mef2c	myocyte enhancer factor 2C
Pex7	peroxisomal biogenesis factor 7
Ptn	Pleiotrophin
Insig1	insulin induced gene 1
Sort1	sortilin 1
Stc1	stanniocalcin 1
Thra	thyroid hormone receptor alpha
Tgfb1	transforming growth factor, beta 1
Tgfb2	transforming growth factor, beta 2
Tgfb3	transforming growth factor, beta 3

Tabela VII. Genes induzidos do grupo calvária controle pertencentes ao processo biológico de *regulação da proliferação celular*.

ID	Gene Name
Dhcr7	7-dehydrocholesterol reductase
Adam17	ADAM metalloproteinase domain 17
Btg3	B-cell translocation gene 3
Cnbp	CCHC-type zinc finger, nucleic acid binding protein
Cd9	CD9 molecule
Cd47	Cd47 molecule
Cd81	Cd81 molecule
Fgfr1	Fibroblast growth factor receptor 1
Gli1	GLI-Kruppel family member GLI1
Ihh	Indian hedgehog
Mdm4	Mdm4 p53 binding protein homolog (mouse)
Ptk2b	PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta
Rerg	RAS-like, estrogen-regulated, growth-inhibitor
Tbx18	T-box18
Thy1	Thy-1 cell surface antigen
B4galt1	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1
Anp32b	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member B
Adk	adenosine kinase
Akr1b1	aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase)
Becn1	beclin 1, autophagy related
Bmp7	bone morphogenetic protein 7
Bmpr2	bone morphogenetic protein receptor, type II
Camk2d	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta
Comt	catechol-O-methyltransferase
Ctnna1	catenin (cadherin associated protein), alpha 1
Cenpf	centromere protein F
Carm1	coactivator-associated arginine methyltransferase 1
Coro1a	coronin, actin binding protein 1A

Ccna2	cyclin A2
Ccnd1	cyclin D1
Ccnd2	cyclin D2
Ccnd3	cyclin D3
Cdk4	cyclin-dependent kinase 4
Cdkn2b	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)
Cdkn2c	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)
Cth	cystathionase (cystathionine gamma-lyase)
Dlc1	deleted in liver cancer 1
Egfr	epidermal growth factor receptor
Ereg	Epiregulin
Fnta	farnesyltransferase, CAAX box, alpha
Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte
Fgfr2	fibroblast growth factor receptor 2
Fgfr3	fibroblast growth factor receptor 3
Fosl2	fos-like antigen 2
Grn	Granulin
Hsf4	heat shock transcription factor 4
Hmox1	heme oxygenase (decycling) 1
Hbegf	heparin-binding EGF-like growth factor
Hdac1	histone deacetylase 1
Id4	inhibitor of DNA binding 4
Inpp1	inositol polyphosphate phosphatase-like 1
Itgb1	integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)
Ilk	integrin linked kinase
Ifitm3	interferon induced transmembrane protein 3
Il5	interleukin 5
Lama5	laminin, alpha 5
Mtor	mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)
Med1	mediator complex subunit 1
Maged1	melanoma antigen, family D, 1
Mfge8	milk fat globule-EGF factor 8 protein
Mapk1	mitogen activated protein kinase 1
Nupr1	nuclear protein 1
Ptch1	patched homolog 1 (Drosophila)
Prdx3	peroxiredoxin 3
Pemt	phosphatidylethanolamine N-methyltransferase
Pla2g2a	phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)
Plcd1	phospholipase C, delta 1
Pttg1	pituitary tumor-transforming 1
Pdgfa	platelet-derived growth factor alpha polypeptide
Pold4	polymerase (DNA-directed), delta 4
Phb2	prohibitin 2
Ptges	prostaglandin E synthase
Ptgs1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1
Tial1	regulator of G-protein signaling 10

Rpa1	replication protein A1
Rb1	retinoblastoma 1
Rbbp9	retinoblastoma binding protein 9
Rps4x	ribosomal protein S4, X-linked
Scin	Scinderin
Serpine1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1
Spn	Sialophorin
Bax	similar to BAX protein, cytoplasmic isoform delta; Bcl2-associated X protein
LOC367812, Sphk2	similar to Sphingosine kinase 2 (SK 2) (SPK 2); sphingosine kinase 2
Crip2	similar to cysteine-rich protein 2; cysteine-rich protein 2
LOC691642	high-mobility group nucleosome binding domain 1
Hmg1, Hmg1l1	similar to high mobility group protein box 1, pseudogene 3
Sphk1	sphingosine kinase 1
LOC298795	stratifin; similar to 14-3-3 protein sigma
Tbrg1	transforming growth factor beta regulator 1
Tgfb1	transforming growth factor, beta 1
Tgfb2	transforming growth factor, beta 2
Tgfb3	transforming growth factor, beta 3
Trib1	tribbles homolog 1 (Drosophila)
Kras	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Mafg	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G (avian)
Rela	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)
Vcam1	vascular cell adhesion molecule 1
Zeb1	zinc finger E-box binding homeobox 1

Figura 16. Matriz de expressão de 4399 mRNAs de células da medula óssea de ratas controle e ovariectomizadas. A correlação de Pearson foi utilizada como medida de similaridade. O vermelho representa indução, o verde repressão e o preto não modulação.

Tabela VIII. Genes reprimidos do grupo medula ovariectomizada pertencentes ao processo biológico de resposta a substâncias orgânicas.

ID	Gene Name
Atp5g3	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit C3
Abcc4	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4
Atp6v0e1	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 9kDa, V0 subunit e1
Cd14	CD14 molecule
Cblb	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence b
Dnajc3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3
Ero1l	ERO1-like (<i>S. cerevisiae</i>)
Fos	FBJ osteosarcoma oncogene
Fkbp1a	FK506 binding protein 1 ^a
Herpud2	HERPUD family member 2
Ihh	Indian hedgehog
Jak2	Janus kinase 2
Asah1	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1
Ndufa9	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 9
Rerg	RAS-like, estrogen-regulated, growth-inhibitor
Rbm3	RNA binding motif (RNP1, RRM) protein 3
Setd2	SET domain containing 2
Tarbp2	TAR (HIV-1) RNA binding protein 2
Timp1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
Ugt1a6	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A2, A5, A3, A6, A9, A8, A7C e A1
Vapb	VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein B and C
Aacs	acetoacetyl-CoA synthetase
Acsl4	acyl-CoA synthetase long-chain family member 4
Acsl5	acyl-CoA synthetase long-chain family member 5
Acadm	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain
Ampd1	adenosine monophosphate deaminase 1 (isoform M)
Aldh2	aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)
Aldh3a1	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1
Afp	alpha-fetoprotein
Areg	Amphiregulin
Anxa5	annexin A5
Apoa1	apolipoprotein A-I
Aqp1	aquaporin 1
Avpr1a	arginine vasopressin receptor 1 ^a
Arsa	arylsulfatase A
Asns	asparagine synthetase
Bsg	Basigin
Bckdhb	branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide
Bckdha	branched chain ketoacid dehydrogenase E1, alpha polypeptide
Bcar1	breast cancer anti-estrogen resistance 1
Capn10	calpain 10
Car4	carbonic anhydrase 4

Cpt1a	carnitine palmitoyltransferase 1a, liver
Casp1	caspase 1
Casp3	caspase 3, apoptosis related cysteine protease
Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2
Col1a1	collagen, type I, alpha 1
Col3a1	collagen, type III, alpha 1
Ccnd1	cyclin D1
Cdk4	cyclin-dependent kinase 4
Cyp4a8	cytochrome P450 4X1; cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 8
Cyp4a2	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 2 e 3
Ddost	dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase
Dusp1	dual specificity phosphatase 1
Egr1	early growth response 1
Egr2	early growth response 2
Eif2b3	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 3 gamma
Eif2b4	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 4 delta
Fnta	farnesyltransferase, CAAX box, alpha
Fabp3	fatty acid binding protein 3, muscle and heart
Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte
Got1	glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble (aspartate aminotransferase 1)
Glx2	glutaredoxin 2
Gstm1	glutathione S-transferase mu 1
Gnb1	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1
Gng12	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 12
Hspa1b	heat shock 70kD protein 1B (mapped); heat shock 70kD protein 1A
Hsf1	heat shock transcription factor 1
Hmox1	heme oxygenase (decycling) 1
Hif1a	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)
Id2	inhibitor of DNA binding 2
Inpp1	inositol polyphosphate phosphatase-like 1
Il1a	interleukin 1 alpha
Il1b	interleukin 1 beta
Il6st	interleukin 6 signal transducer
Idh1	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble
LOC364462	lactate dehydrogenase A; similar to L-lactate dehydrogenase A chain (LDH-A)
Lbp	lipopolysaccharide binding protein
Lonp1	lon peptidase 1, mitochondrial
Kdm3a	lysine (K)-specific demethylase 3A
Mmp2	matrix metalloproteinase 2
Mgst1	microsomal glutathione S-transferase 1
Mapk1	mitogen activated protein kinase 1
Map2k1	mitogen activated protein kinase kinase 1
Mcl1	myeloid cell leukemia sequence 1
Nampt	nicotinamide phosphoribosyltransferase
Nfkb1a	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
Nfe2l2	nuclear factor, erythroid derived 2, like 2

Ncor2	nuclear receptor co-repressor 2
Prdx2	peroxiredoxin 2; similar to peroxiredoxin 2 isoform b
Prdx3	peroxiredoxin 3
Pck2	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)
Pik3c3	phosphoinositide-3-kinase, class 3
Pik3r1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)
Plcd1	phospholipase C, delta 1
Gart	phosphoribosylglycinamide formyltransferase
Pdgfa	platelet-derived growth factor alpha polypeptide
Ptgs1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1
Ppp2r2a	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B, alpha isoform
Ramp2	receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 2
Ripk1	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1
Spp1	secreted phosphoprotein 1
Sparc	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
Serpinf1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade F, member 1
Sgk1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1
Anxa7	similar to Annexin A7 (Annexin VII) (Synexin); annexin A7
Got2	glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial (aspartate aminotransferase 2)
Bax	similar to BAX protein, cytoplasmic isoform delta; Bcl2-associated X protein
Hmgb2	similar to High mobility group protein 2 (HMG-2); high mobility group box 2
Insig1	insulin induced gene 1
Gpx4	glutathione peroxidase 4
C1s	complement component 1, s subcomponent
Hsp90ab1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1
Slc11a1	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1
Slc25a36	solute carrier family 25, member 36; similar to solute carrier family 25, member 36
Sphk1	sphingosine kinase 1
Serp1	stress-associated endoplasmic reticulum protein 1
Strn3	striatin, calmodulin binding protein 3
Sdf4	stromal cell derived factor 4
Txn2	thioredoxin 2
Timp4	tissue inhibitor of metalloproteinase 4
Tfrc	transferrin receptor
Tap2	transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
Tnf	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
Tp73	tumor protein p73
Uqcrc1	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I
Uqcrcfs1	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1
Kras	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

Tabela IX. Genes reprimidos do grupo de medula ovariectomizada pertencentes ao processo biológico de *regulação da proliferação celular*.

ID	Gene Name
Abcc4	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4
Cnbp	CCHC-type zinc finger, nucleic acid binding protein
Cblb	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence b
Cd47	Cd47 molecule
Cd81	Cd81 molecule
Fbxw4	F-box and WD repeat domain containing 4
Fxyd2	FXYD domain-containing ion transport regulator 2
Fcgr2b	Fc fragment of IgG, low affinity lib and IIa, receptor (CD32)
Ihh	Indian hedgehog
Jak2	Janus kinase 2
Klf5	Kruppel-like factor 5
Rerg	RAS-like, estrogen-regulated, growth-inhibitor
B4galt1	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1
Vsig4	V-set and immunoglobulin domain containing 4
Atf3	activating transcription factor 3
Aldh3a1	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A1
Areg	Amphiregulin
Avpr1a	arginine vasopressin receptor 1 ^a
Becn1	beclin 1, autophagy related
Camk2d	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II delta
Casp3	caspase 3, apoptosis related cysteine protease
Cenpf	centromere protein F
Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2
Clu	Clusterin
F3	coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)
Csf1	colony stimulating factor 1 (macrophage)
Ccnd1	cyclin D1
Ccnd3	cyclin D3
Cdk4	cyclin-dependent kinase 4
Cdkn1c	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)
Egf	epidermal growth factor
Eif5a	eukaryotic translation initiation factor 5A
Fnta	farnesyltransferase, CAAX box, alpha
Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte
Grn	Granulin
Ghrh	growth hormone releasing hormone
Hes1	hairy and enhancer of split 1 (Drosophila)
Hsf1	heat shock transcription factor 1
Hmox1	heme oxygenase (decycling) 1
Hbegf	heparin-binding EGF-like growth factor
Hif1a	hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)
Id2	inhibitor of DNA binding 2

Id4	inhibitor of DNA binding 4
Inpp1	inositol polyphosphate phosphatase-like 1
Inpp5d	inositol polyphosphate-5-phosphatase D
Itgb1	integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)
Ilk	integrin linked kinase
Ifitm3	interferon induced transmembrane protein 3
Il1a	interleukin 1 alpha
Il1b	interleukin 1 beta
Il13ra1	interleukin 13 receptor, alpha 1
Il15	interleukin 15
Il5	interleukin 5
Il6st	interleukin 6 signal transducer
Lama5	laminin, alpha 5
Mapk1	mitogen activated protein kinase 1
Mll1	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 1
Nf2	neurofibromin 2 (merlin)
Nampt	nicotinamide phosphoribosyltransferase
Nfkbia	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
Prrx1	paired related homeobox 1
Prdx3	peroxiredoxin 3
Plcd1	phospholipase C, delta 1
Pdgfa	platelet-derived growth factor alpha polypeptide
Pold4	polymerase (DNA-directed), delta 4
Phb2	prohibitin 2
Ptger2	prostaglandin E receptor 2, subtype EP2
Ptgs1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1
Pura	purine rich element binding protein A
Tial1	regulator of G-protein signaling 10
Rb1	retinoblastoma 1
Rps4x	ribosomal protein S4, X-linked
RGD1566136	ribosomal protein S9; similar to 40S ribosomal protein S9; hypothetical protein LOC681065
Sparc	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
Serpine1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 1
Serpinf1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade F, member 1
Shox2	short stature homeobox 2
Bax	similar to BAX protein, cytoplasmic isoform delta; Bcl2-associated X protein
Sphk2	similar to Sphingosine kinase 2 (SK 2) (SPK 2); sphingosine kinase 2
Crip2	similar to cysteine-rich protein 2; cysteine-rich protein 2
Sphk1	sphingosine kinase 1
Birc6	tetratricopeptide repeat domain 27; baculoviral IAP repeat-containing 6
Tipin	timeless interacting protein; timeless-interacting protein
Tbrg1	transforming growth factor beta regulator 1
Tnf	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
Kras	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Mafig	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog G (avian)

Tabela X. Genes induzidos do grupo medula ovariectomizada pertencentes ao processo biológico de *regulação da proliferação celular*.

ID	Gene Name
E2f3	E2F transcription factor 3
Fcgr2b	Fc fragment of IgG, low affinity lib and IIa, receptor (CD32)
H19	H19 fetal liver mRNA
Hlx	H2.0-like homeobox
Kitlg	KIT ligand
Notch1	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)
Pds5b	PDS5, regulator of cohesion maintenance, homolog B (S. cerevisiae)
Sox4	SRY (sex determining region Y)-box 4
Tbx2	T-box 2
Wfdc1	WAP four-disulfide core domain 1
Adora1	adenosine A1 receptor
Adrb2	adrenergic, beta-2-, receptor, surface
Aif1	allograft inflammatory factor 1
Agt	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)
Bmp4	bone morphogenetic protein 4
Brca2	breast cancer 2
Cxcl12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)
Ccdc88a	coiled coil domain containing 88A
Cdkn1c	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (P57)
Cyp27b1	cytochrome P450, family 27, subfamily b, polypeptide 1
Dlx5	distal-less homeobox 5
Ednra	endothelin receptor type A
Epo	Erythropoietin
Eif2ak2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2
Fntb	farnesyltransferase, CAAX box, beta
Fgf17	fibroblast growth factor 17
Fgfr1	fibroblast growth factor receptor-like 1
Gal	galanin prepropeptide
Hhex	hematopoietically expressed homeobox
Hipk2	homeodomain interacting protein kinase 2
Hdac1	histone deacetylase 1
Inha	inhibin alpha
Igf1	insulin-like growth factor 1
Kdr	kinase insert domain protein receptor
Kifap3	kinesin-associated protein 3
Kng2	kininogen 2
Lst1	leukocyte specific transcript 1
Mecp2	methyl CpG binding protein 2
Ngf	nerve growth factor (beta polypeptide)
Nfib	nuclear factor I/B
Ovol2	ovo-like 2 (Drosophila)
Pax3	paired box 3

Pthlh	parathyroid hormone-like hormone
Pten	phosphatase and tensin homolog
Plcd3	phospholipase C, delta 3
Pml	promyelocytic leukemia
Ptpv	protein tyrosine phosphatase, receptor type, V
Rgs10	regulator of G-protein signaling 10
Rara	retinoic acid receptor, alpha
Stk11	serine/threonine kinase 11
Shox2	short stature homeobox 2
Stat5a	signal transducer and activator of transcription 5A
Stat6	signal transducer and activator of transcription 6
Nos2	nitric oxide synthase 2, inducible
Gtbp4	similar to G protein-binding protein CRFG; GTP binding protein 4
Tnfrsf13b	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13B
Txnip	thioredoxin interacting protein
Tlr4	toll-like receptor 4
Tgfr1	transforming growth factor, beta receptor 1
Tnfrsf13b	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b
Tsg101	tumor susceptibility gene 101
Vcam1	vascular cell adhesion molecule 1
Vegfc	vascular endothelial growth factor C

Tabela XI. Genes induzidos do grupo medula ovariectomizada pertencentes ao processo biológico de resposta a substâncias orgânicas.

ID	Gene Name
Pfkfb1	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1
Abca2	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2
Derl3	Der1-like domain family, member 3
H19	H19 fetal liver mRNA
Meis2	Meis homeobox 2
Taf9b	TAF9B RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor
Wfdc1	WAP four-disulfide core domain 1
LOC360228	WDNM1 homolog
Acta2	actin, alpha, cardiac muscle 1; smooth muscle alpha-actin
Acvr1c	activin A receptor, type IC
Acvr2b	activin A receptor, type IIB
Acs1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1
Adipor1	adiponectin receptor 1
Adipoq	adiponectin, C1Q and collagen domain containing
Adh1	alcohol dehydrogenase 1 (class I)
Alpl	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
Aif1	allograft inflammatory factor 1
Angpt1	angiopoietin 1
Aqp9	aquaporin 9

Bmp4	bone morphogenetic protein 4
Brca2	breast cancer 2
Car2	carbonic anhydrase II
Casp6	caspase 6
Agtr1b	chemokine (C-C motif) receptor 2; angiotensin II receptor, type 1b
Cxcl12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)
Cxcl16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16
C1qb	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide
C5ar1	complement component 5a receptor 1
Crym	crystallin, um
Cdo1	cysteine dioxygenase, type I
Cyp2j4	cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 4
Cyp2d1	cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 1
Cyp27b1	cytochrome P450, family 27, subfamily b, polypeptide 1
Enpp1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
Ensa	endosulfine alpha; similar to endosulfine alpha isoform 2
Ednra	endothelin receptor type A
Ephx1	epoxide hydrolase 1, microsomal
Eif2ak2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2
Fntb	farnesyltransferase, CAAX box, beta
Gal	galanin prepropeptide
Ggh	gamma-glutamyl hydrolase
Grm2	glutamate receptor, metabotropic 2
Gstm2	glutathione S-transferase mu 2
Gstm7	glutathione S-transferase, mu 7
Gk	glycerol kinase
Gys2	glycogen synthase 2
Ghr	growth hormone receptor
Gng11	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11
Gng13	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 13
Hadh	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase
Hsd11b2	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 2
Igf1	insulin-like growth factor 1
Igf2	insulin-like growth factor 2
Igfbp1	insulin-like growth factor binding protein 1
Igfbp2	insulin-like growth factor binding protein 2
Il1rn	interleukin 1 receptor antagonist
Khk	Ketohexokinase
Mgst3	microsomal glutathione S-transferase 3
Mapk9	mitogen-activated protein kinase 9
Ngf	nerve growth factor (beta polypeptide)
Nnat	Neuronatin
Nfkb2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2, p49/p100
Ncoa1	nuclear receptor coactivator 1
Nr0b2	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2
Nr1h3	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3

Nrf1	nuclear respiratory factor 1
Pak1	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1
Pten	phosphatase and tensin homolog
Pde3b	phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited
Pecam1	platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
Pml	promyelocytic leukemia
Retn	Resistin
Rara	retinoic acid receptor, alpha
Ryr2	ryanodine receptor 2, cardiac
Stk11	serine/threonine kinase 11
Stat5a	signal transducer and activator of transcription 5A
Stat6	signal transducer and activator of transcription 6
Cd36	similar to CD36 antigen; similar to fatty acid translocase/CD36
RGD1565355	similar to fatty acid translocase/CD36
Sorbs1	sorbin and SH3 domain containing 1
Srebf1	sterol regulatory element binding transcription factor 1
Sult1a1	sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1
Socs1	suppressor of cytokine signaling 1
Txnip	thioredoxin interacting protein
Tlr4	toll-like receptor 4
Tlr6	toll-like receptor 6
Tbl1x	transducin (beta)-like 1 X-linked
Tgfb1	transforming growth factor, beta receptor 1

6.4 Análise dos miRNAs diferencialmente expressos

Da mesma maneira como foi descrito para os mRNAs, após os dados terem sido extraídos com o uso do *Agilent Feature Extraction Software*, os arquivos gerados no programa foram analisados na plataforma de bioinformática Agilent GeneSpring 12.6 GX. Os dados de miRNA foram normalizados utilizando-se também o quantil e após análise estatística por teste-t moderado com $p\text{-value} \leq 0.05$ e posterior *fold change* > 1.5 , foram evidenciados 84 miRNAs diferencialmente expressos nas células de calvária de ratas controle e ovariectomizada (Figura 17) e 55 miRNAs diferencialmente expressos nas células da medula óssea de ratas controle e ovariectomizada (Figura 18). As tabelas XII e XIII representam, respectivamente, os miRNAs diferencialmente expressos no grupo das células da

calvária e seu valor de *fold change* e os miRNAs diferencialmente expressos no grupo das células da medula óssea e seu valor de *fold change*.

Figura 17. Comparação dos perfis de expressão gênica de 84 miRNAs diferencialmente expressos entre as células da calvária de ratas controle e ovariectomizadas. A correlação de Pearson foi utilizada como medida de similaridade. O vermelho representa indução, o verde repressão e o preto não modulação.

Figura 18. Comparação dos perfis de expressão gênica de 55 miRNAs diferencialmente expressos entre as células da medula de ratos controle e ovariectomizada. A correlação de Pearson foi utilizada como medida de similaridade. O vermelho representa ativação, o verde repressão e o preto não modulação.

Tabela XII. miRNAs diferencialmente expressos nas células originárias da calvária do grupo ovariectomizado comparado ao grupo controle.

MicroRNA	Fold-Change (Ovx vs Ctrl)	Expressão
miRNABrightCorner30	2,7299914	Reprimido
mr_1	3,223816	Reprimido
rno-let-7b-3p	79,346535	Reprimido
rno-let-7f-5p	1,6490453	Induzido
rno-miR-100-5p	1,6857865	Induzido
rno-miR-101a-3p	3,1842966	Induzido
rno-miR-101b-3p	2,169685	Induzido
rno-miR-103-3p	1,7109159	Reprimido
rno-miR-10a-5p	14,835407	Induzido
rno-miR-1224	1,6301241	Induzido
rno-miR-126a-3p	21,801958	Induzido
rno-miR-128-3p	36,07911	Induzido
rno-miR-133b-3p	1,9530369	Reprimido
rno-miR-134-5p	774,7109	Induzido
rno-miR-139-3p	183,72975	Induzido
rno-miR-142-3p	308,9339	Induzido
rno-miR-143-3p	1,7075026	Induzido
rno-miR-146a-5p	7,7815137	Induzido
rno-miR-146b-5p	102,61155	Induzido
rno-miR-148b-3p	303,00833	Induzido
rno-miR-151-5p	2,0086658	Induzido
rno-miR-17-5p	2,518973	Reprimido
rno-miR-181a-1-3p	6,910398	Induzido
rno-miR-185-5p	84,29358	Induzido
rno-miR-188-5p	4,878182	Induzido
rno-miR-18a-5p	3,7311776	Reprimido
rno-miR-195-5p	523,7685	Induzido
rno-miR-206-3p	2,9415932	Reprimido
rno-miR-207_v15.0	22,088139	Reprimido
rno-miR-21-3p	23,622784	Induzido
rno-miR-210-3p	131,34714	Induzido
rno-miR-211-5p	77,96804	Reprimido
rno-miR-212-3p	2,6461046	Reprimido
rno-miR-218a-5p	2,4842746	Induzido
rno-miR-219-5p	201,99202	Induzido
rno-miR-22-3p	1,6119889	Induzido
rno-miR-22-5p	399,0273	Induzido
rno-miR-221-3p	1,5125052	Reprimido
rno-miR-222-3p	2,4142122	Reprimido
rno-miR-224_v15.0	66,17957	Induzido
rno-miR-26b-5p	1,7250319	Induzido
rno-miR-28-5p	107,87372	Induzido

rno-miR-290_v15.0	34,280678	Induzido
rno-miR-292-5p	4,972984	Induzido
rno-miR-299a-5p	913,5045	Reprimido
rno-miR-29a-3p	1,5751925	Induzido
rno-miR-29a-5p	4,176993	Induzido
rno-miR-29c-3p	1,6224548	Induzido
rno-miR-30c-2-3p	8,703636	Induzido
rno-miR-30e-3p	7,8439407	Induzido
rno-miR-320-3p	187,50362	Induzido
rno-miR-322-3p	8,440684	Induzido
rno-miR-324-3p	2,6385407	Reprimido
rno-miR-324-5p	42,167255	Induzido
rno-miR-327	29,333977	Induzido
rno-miR-328a-3p	12,101761	Reprimido
rno-miR-33-5p	9,156112	Induzido
rno-miR-331-3p	14,557925	Induzido
rno-miR-335	58,667137	Induzido
rno-miR-342-3p	52,33345	Induzido
rno-miR-34a-5p	1,9164895	Induzido
rno-miR-34b_v15.0	43,637985	Induzido
rno-miR-34c-5p	30,051292	Induzido
rno-miR-350	48,108982	Reprimido
rno-miR-352	1,7765669	Induzido
rno-miR-361-5p	9,619932	Induzido
rno-miR-450a_v15.0	47,704094	Induzido
rno-miR-451-5p	29,310175	Induzido
rno-miR-466b-5p	1,7202793	Reprimido
rno-miR-487b_v15.0	20,467234	Reprimido
rno-miR-494_v15.0	2,348819	Reprimido
rno-miR-497-5p	203,40898	Induzido
rno-miR-532-5p	93,54498	Induzido
rno-miR-542-3p	9,389667	Induzido
rno-miR-582-5p	12,726893	Induzido
rno-miR-664-3p	11,226156	Induzido
rno-miR-672-5p	2,3192906	Reprimido
rno-miR-674-3p	5,44681	Induzido
rno-miR-764_v15.0	91,55996	Reprimido
rno-miR-874-3p	241,21439	Induzido
rno-miR-93-5p	2,399439	Reprimido
rno-miR-98-5p	1,6640126	Induzido
rno-miR-99a-5p	2,3044372	Induzido
rno-miR-99b-5p	1,5588261	Reprimido

Tabela XIII. miRNAs diferencialmente expressos de células provenientes da medula óssea do grupo ovariectomizado comparado ao grupo controle.

MicroRNA	Fold-Change (Ovx vs Ctrl)	Expressão
mr_1	1,8737774	Reprimido
rno-let-7b-3p	124,25068	Reprimido
rno-let-7d-3p	22,770586	Reprimido
rno-miR-125a-3p	1,5228158	Reprimido
rno-miR-130b-3p	42,067238	Induzido
rno-miR-143-3p	1,892627	Induzido
rno-miR-145-5p	2,002352	Induzido
rno-miR-17-5p	1,6390806	Reprimido
rno-miR-18a-5p	1,8264737	Reprimido
rno-miR-192-5p	110,326965	Induzido
rno-miR-194-5p	140,3047	Induzido
rno-miR-204-5p	3,3886456	Induzido
rno-miR-207_v15.0	51,52554	Reprimido
rno-miR-20a-5p	1,8016795	Reprimido
rno-miR-21-5p	1,6407273	Induzido
rno-miR-212-3p	1,9877568	Reprimido
rno-miR-224_v15.0	2,009357	Reprimido
rno-miR-28-5p	2,265882	Induzido
rno-miR-292-5p	1,8451962	Induzido
rno-miR-29c-5p	125,08603	Induzido
rno-miR-30a-3p	1,8319688	Induzido
rno-miR-30a-5p	1,952358	Induzido
rno-miR-30c-1-3p	11,857018	Reprimido
rno-miR-30c-2-3p	2,5265696	Induzido
rno-miR-30c-5p	1,6161971	Induzido
rno-miR-30d-5p	1,6283126	Induzido
rno-miR-30e-3p	2,0407534	Induzido
rno-miR-31a-5p	1,5494415	Reprimido
rno-miR-322-3p	2,2995403	Induzido
rno-miR-324-3p	1,5539515	Reprimido
rno-miR-328a-3p	1,911188	Reprimido
rno-miR-339-3p	3,6208072	Reprimido
rno-miR-340-5p	1,5380301	Induzido
rno-miR-347	1,7355053	Reprimido
rno-miR-350	52,267693	Reprimido
rno-miR-362-5p	18,948578	Induzido
rno-miR-374-5p	1,7786773	Induzido
rno-miR-376b-3p	264,94974	reprimido
rno-miR-378a-5p	107,311424	induzido
rno-miR-450a_v15.0	1,6693003	induzido
rno-miR-451-5p	2,300276	reprimido
rno-miR-465-5p	64,28506	induzido

rno-miR-466b-5p	3,5100439	induzido
rno-miR-487b_v15.0	2,5406308	reprimido
rno-miR-499-5p	207,0159	induzido
rno-miR-503-5p	33,64585	induzido
rno-miR-511_v15.0	42,396446	reprimido
rno-miR-532-3p	89,30093	induzido
rno-miR-539-5p	202,6152	induzido
rno-miR-542-3p	2,143753	induzido
rno-miR-542-5p	173,34563	induzido
rno-miR-764_v15.0	372,85205	reprimido
rno-miR-7a-5p	1,7258451	reprimido
rno-miR-872-3p	60,954376	reprimido
rno-miR-877	1,6160038	induzido

6.5. Análise de Venn

Os diagramas de Venn têm como objetivo analisar as semelhanças e diferenças entre diferentes conjuntos, indicando todas as lógicas possíveis no mesmo diagrama. O *software GeneSpring* possui essa ferramenta que está aqui representada nas figuras 19 e 20, as quais mostram a quantidade de genes diferencialmente expressos apenas no grupo da calvária, apenas no grupo da medula óssea e também os genes comuns aos dois grupos (Figura 19). O mesmo diagrama também foi realizado para os miRNAs diferencialmente expressos (Figura 20).

Figura 19. Diagrama de Venn mostrando a quantidade de genes diferencialmente expressos apenas no grupo da calvária, apenas no grupo da medula óssea e também os genes comuns aos dois grupos.

Figura 20. Diagrama de Venn mostrando a quantidade de miRNAs diferencialmente expressos apenas no grupo da calvária, apenas no grupo da medula óssea e também os genes comuns aos dois grupos.

6.6 Análise da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real

(qPCR)

Os dados de *microarrays* foram confirmados por qPCR de três mRNAs que se apresentaram diferencialmente expressos entre as células da CC e CO que são: Notch1, Anxa5 e Sp7. Tais mRNAs estão associados a homeostase e ligação aos íons de cálcio (Anxa5), diferenciação osteoblástica e formação óssea (Sp7) e

regulação da ossificação e da via de sinalização BMP (Notch1). O tipo de modulação (induzido ou reprimido) obtidos por qPCR foram comparáveis aos dados encontrados com a técnica de *microarrays*. Os resultados mostrados na figura 21 indicam que o gene *Anxa5* está induzido na CC, enquanto que o gene *Sp7* está induzido na CO. O gene *Notch1* não apresentou diferença estatística entre os dois grupos.

Figura 21. PCR quantitativa dos genes *Anxa5*, *Sp7* e *Notch1* de células da calvária de ratas controle e tratada (ovx). Os níveis de expressão foram normalizados utilizando o gene da β -actina. A diferença entre os grupos foi avaliada utilizando o teste-t não pareado. *** $p < 0.0005$ foi considerado significativo.

Observação: não foi possível realizar a confirmação dos dados de *microarray* por PCR quantitativa tempo real (qPCR) das células da medula óssea, pois os RNAs dessas células apresentaram-se degradados e com baixo RIN (RNA Integrity Number) impossibilitando a realização dos experimentos, portanto, foi apenas realizada a PCR das células da calvária. Faremos esses experimentos assim que possível para podermos publicar nosso trabalho em uma revista científica.

DISCUSSÃO

7. DISCUSSÃO

A osteoporose é uma doença silenciosa e o impacto econômico e na saúde do indivíduo é resultante do maior risco à fratura de ossos que esses indivíduos apresentam, implicando em um problema clínico e social, uma vez que os portadores dessa patologia comumente apresentam limitações para exercer suas atividades profissionais e sociais, afetando, muitas vezes, a saúde emocional e impactando negativamente na qualidade de vida do paciente. A prevalência dessa doença, acompanhada da morbidade e mortalidade de suas fraturas, aumenta a cada ano. Estima-se que com o envelhecimento populacional na América Latina, o ano de 2050, comparado a 1950, terá um crescimento de 400% no número de fraturas de quadril para homens e mulheres entre 50 e 60 anos, e próximo de 700% nas idades superiores a 65 anos (Cunha e cols., 2011) .

Frente a esses e outros problemas, constantes pesquisas estão sendo realizadas buscando respostas celulares e moleculares para o entendimento da osteoporose, a fim de encontrar novas drogas e terapias para a sua prevenção e tratamento.

As pesquisas com animais permitem o estudo de várias condições sistêmicas, sendo que o modelo ideal de animais de laboratório deve replicar uma condição humana com o máximo grau de fidelidade possível. Fatores de risco da osteoporose como insuficiência de hormônios sexuais, terapia com drogas anti-inflamatórias e imunossupressoras, uso de álcool e tabaco e envelhecimento, tem sido bem estabelecidos em animais (Turner et al., 2001). Roedores e macacos são os principais animais utilizados para estabelecer um modelo de osteoporose (Duncan & Brown, 2010; Kharode e cols., 2008; Robichaud e cols., 2008).

Para a realização deste estudo foram utilizadas ratas *Wistar* induzidas à osteoporose a partir da remoção cirúrgica dos ovários. A ovariectomia em roedores é uma técnica bem estabelecida na literatura para obtenção de um modelo animal com osteoporose, apresentando perda de densidade e condições ósseas similares às mulheres na pós-menopausa (Giro e cols., 2011; Govindarajan e cols., 2013; Lelovas e cols., 2008; Kalu, 1991).

Neste trabalho o tempo de espera entre a cirurgia (ovariectomia bilateral) e o sacrifício dos animais foi de 150 dias, prazo confiável para o estabelecimento da osteoporose; no entanto, este período pode variar dependendo do local alvo do estudo. Wronski e cols (1989) realizaram experimentos com tempo de espera de 0 a 540 dias após a ovariectomia das ratas, avaliando a qualidade óssea de vértebras lombares e tíbias e notaram que uma significativa perda de volume ósseo na tíbia (cerca de 50%) ocorreu entre 30 e 60 dias, enquanto que a mesma perda de volume para as vértebras ocorreu a partir de 270 dias, mostrando que há uma diferença na taxa de perda óssea entre locais distintos ao longo do tempo. Atmaca e cols (2013) avaliaram o efeito da ovariectomia nos ossos femurais e observaram que na 14ª semana após a cirurgia a densidade mineral óssea era significativamente menor quando comparado ao grupo controle.

Passado o tempo de espera e realizadas as culturas celulares, iniciaram-se os ensaios de proliferação e viabilidade celular. Em um estudo realizado por Yu e cols (2012) a proliferação e diferenciação de células osteoblásticas removidas da mandíbula de ratas osteoporóticas foram avaliadas e foi observado um aumento dessas taxas no grupo ovariectomizado quando comparado ao grupo controle. Esse resultado também foi observado em nosso estudo. Embora as células da calvária e medula óssea tenham sido plaqueadas na mesma densidade e cultivadas no mesmo

ambiente, elas apresentaram comportamento diferente entre si. Enquanto as células diferenciadas da medula apresentaram maiores taxas de proliferação no grupo tratado, na calvária pode-se notar um aumento na proliferação e viabilidade das células do grupo controle aos 7 e 10 dias de cultura. Uma possível explicação é que as células mesenquimais da medula óssea estão localizadas em um ambiente específico e o estrógeno é um dos fatores que modula a proliferação celular (Zhang e cols., 2011). Assim, sugere-se que na falta desse hormônio as células tenderiam a se multiplicar a fim de buscar um equilíbrio no meio em que se encontram, o que não significa que o mesmo será estabelecido, uma vez que a diferenciação destas células é atrasada em relação às células obtidas da calvária.

Rosales-Rocabado e cols (2014) realizaram um estudo comparando o comportamento entre células da medula óssea e calvária em ratas sem osteoporose e observaram que, em uma situação normal, as células da calvária tem maior proliferação e viabilidade que as células da medula óssea, apoiando a hipótese de que a osteoporose interfere no funcionamento celular. As células da calvária, incluindo as pertencentes ao grupo tratado, apresentam maior diferenciação em relação às células da medula, e assim, sofrem mais com a remodelação óssea, ou seja, há um prejuízo em relação à multiplicação celular, uma vez que elas não têm a mesma capacidade de proliferação das células mesenquimais, dessa forma, os resultados no grupo tratado são menores quando comparado ao controle.

Durante todo o processo de diferenciação celular e tecidual, um conjunto diversificado de proteínas é mobilizado como resultado da expressão diferencial de respectivos genes. Portanto, pode-se dizer que durante o desenvolvimento, o primeiro ponto de controle molecular é a expressão gênica ao nível do conjunto de mRNA. Hoje, sabe-se que o transcriptoma das células e tecidos é reflexo da razão

entre a biossíntese de mRNA (transcrição) e sua degradação, muitas vezes causada pelos miRNAs (Sevignani e cols., 2006).

O foco principal das pesquisas genômicas é compreender quais são os papéis funcionais dos diferentes genes e quais processos biológicos eles participam, identificar todos os mRNAs expressos em um dado organismo ou tecido e comparar o perfil de expressão gênica em diferentes condições ambientais, estados patológicos, fisiológicos ou de desenvolvimento (Yabuta, 2012). Em nosso estudo procuramos mostrar a diferença do perfil de expressão gênica entre células de diferentes locais, como calvária e medula óssea, em diferentes condições fisiológicas, como controle e ovariectomizadas.

A análise dos genes diferencialmente expressos no nosso estudo nos deixa clara a diferença entre os grupos estudados, possuindo apenas 1871 genes semelhantes entre os grupos de células da calvária e medula óssea, como nos mostrou a Análise de Venn.

Dentre os 5447 genes diferencialmente expressos do grupo da calvária, destacam-se Notch1, Dlx5, Fgf1, Il6 e Fgfr2 como reguladores da proliferação celular no grupo de genes reprimidos das células originárias da calvária controle (CC) e as Caspases 6 e 12 como resposta a substâncias orgânicas. Já no grupo de genes induzidos destas células (CC) encontramos os genes Gli1 e Bmp7 como reguladores da proliferação celular, Gli1, Bmp3 e Mmp2 no processo biológico de desenvolvimento ósseo e Lrp1, Mmp2 e a família Tgf β 1, 2 e 3 no envelhecimento, entre outros.

Dentre os 4399 genes diferencialmente expressos do grupo da medula óssea, encontram-se o Csfl, Sparc e Tnf como reguladores da proliferação celular no grupo de genes reprimidos das células provenientes da medula óssea ovariectomizada

(MO) e *Anxa5*, *Col1a1*, *Spp1*, *Sparc*, *Tnf* e *Mmp2* no processo biológico de resposta a substâncias orgânicas. No grupo de genes induzidos os genes *Notch1*, *Bmp4*, *Dlx5* e *Stat6* como reguladores da proliferação celular e os genes *Alpl*, *Bmp4* e *Casp6* no processo de resposta a substâncias orgânicas, entre outros.

Foram selecionados alguns genes que atuam de alguma forma, direta ou indiretamente, na osteogênese, para a discussão.

Segundo Canalis e cols (2008), o gene *Notch1* causa osteopenia e impede a osteoblastogênese inibindo a via de sinalização Wnt/ β -catenina, o que condiz com nossos achados, por esse gene estar reprimido nos dois grupos controles; no entanto, Tezuka e cols (2002) afirma que a diferenciação de células osteoblásticas é regulada positivamente por este gene e que ele poderia ser o único e interessante alvo molecular para o tratamento da osteoporose; portanto, o *Notch1* apresenta funções contraditórias.

O gene que codifica a proteína *Dlx5* funciona como um fator de transcrição, regulando a expressão de genes osteoblásticos-específicos como a osteocalcina e a fosfatase alcalina, promovendo a mineralização (Manolagas, 2000); no entanto, esse gene apareceu reprimido nos dois grupos controles, assim como o *Fgfr2* que está reprimido no grupo CC e funciona como um regulador positivo da diferenciação osteoblástica e é essencial para o desenvolvimento normal do esqueleto (Teplyuk, 2009).

A deficiência de estrógeno pós-menopausa aumenta a formação de osteoclastos na medula, através do aumento da produção e ação de citocinas que são responsáveis pela osteoclastogênese, como a *Il6*, a qual estimula a formação e função de osteoclastos, aumentando a reabsorção óssea (Manolagas, 2000). Essa

citocina teve sua expressão aumentada nos dois grupos ovariectomizados, condizendo com o trabalho de Manolagas.

A Casp6 que aparece em ambos os grupos e a Casp12 que aparece no grupo da calvária são essenciais para o início e execução da apoptose e para o processamento e maturação de citocinas inflamatórias, respectivamente, e ambas estão induzidas nos grupos tratados, indicando que nesses grupos houve uma maior taxa de morte celular que o grupo controle.

O gene Mmp2 é um fator determinante de remodelação óssea e mineralização e desempenha um papel crucial na formação e manutenção da rede canalicular osteocítica. As concentrações séricas de Mmp2 têm sido relacionadas com marcadores de remodelação óssea, incluindo fosfatase alcalina e osteocalcina (Tranah e cols., 2008). Este gene apresentou-se reprimido em ambos os grupos ovariectomizados estudados, o que já era esperado levando em conta as suas funções exercidas.

Hojo e cols (2012) demonstraram que ratos nocaute Gli1 não expressavam Runx2 nem Osterix, que são reguladores máximos da osteogênese, indicando que sua presença é indispensável para a diferenciação osteoblástica. Esse gene aparece induzido no grupo CC.

O paratormônio (Pth) é um agente anabólico que provê benefícios para a densidade mineral óssea e tem sido caracterizado como um potente agente terapêutico para a reparação esquelética. O uso intermitente de Pth estimula a função e diferenciação de osteoblastos levando a um aumento da formação óssea. Este gene apresentou-se reprimido nos grupos CO e MO, sugerindo que nestes grupos há uma menor formação óssea.

Os genes *Spp1*, *Sparc* e *Col1a1* estão envolvidos na formação e mineralização óssea e estão reprimidos no grupo de MO, indicando uma menor formação óssea nesse grupo, comparado ao controle.

Apesar de não aparecerem na lista de genes dos processos biológicos selecionados, os genes *Dkk1*, *Sost* e *Sp7* apresentam funções muito importantes e bem consolidadas em relação à osteogênese.

A deleção de um único alelo do gene *Dkk1* em ratos causa um aumento da formação óssea, enquanto que um aumento de sua expressão em osteoblastos leva a osteopenia, por inibir a via WNT/ β catenina (Guo e cols., 2010). Esse gene apresentou sua expressão aumentada no grupo MO indicando uma menor formação óssea nesse grupo.

O gene *Sost* que age como inibidor das vias de sinalização WNT e BMP, levando a uma redução da formação óssea (Benisch e cols., 2012), apresentou-se induzido no grupo CO, indicando que nesse grupo há realmente uma diminuição da massa óssea. No entanto, o *Sp7* que é um fator de transcrição ósseo essencial para a diferenciação osteoblástica e formação óssea está induzido no grupo CO e não no grupo controle, que seria o esperado.

Um trabalho realizado por Benisch e cols (2012) mostra que o perfil transcricional de células tronco-mesenquimais em osteoporose primária é diferenciado e apresenta aumento de expressão de inibidores osteogênicos, o que foi observado também no nosso trabalho, sugerindo que o grupo tratado apresenta perfil de expressão diferente do grupo controle.

Como dito anteriormente, os miRNAs fornecem uma nova dimensão do controle pós-transcricional por inibição direta da tradução do seu mRNA alvo, representando um nível sofisticado de regulação do gene que coordena um amplo

espectro de processos patológicos e fisiológicos mostrando grande potencial como possíveis novos biomarcadores e alvos terapêuticos para várias doenças, como osteoporose, câncer, artrite reumatoide e diabetes (An e cols., 2014).

A análise dos miRNAs diferencialmente expressos também nos deixa clara a diferença do perfil de expressão entre os grupos estudados. A análise de Venn nos mostra que foram encontrados apenas 22 miRNAs semelhantes nos grupos de células da calvária e medula óssea de um total de 84 miRNAs no grupo da calvária e 55 miRNAs no grupo da medula óssea.

Desses miRNAs muitos estão relacionados com a osteoporose, participando da proliferação e diferenciação de osteoblastos e osteoclastos, por exemplo; mas, também, foram encontrados muitos miRNAs que ainda não foram estudados, ou então, não apresentam relação com osteogênese e remodelação óssea, como por exemplo o miRNA-350 e o miRNA-let-7b-3p.

Membros da família 30 (miR-30a, 30c e 30d) apresentaram-se induzidos tanto na CO quanto na MO, sendo que estes miRNAs atuam como reguladores negativos da diferenciação osteoblástica, e tem como alvo o gene *Lrp6*, promovendo a diferenciação adipocítica em vez da osteoblástica.

O miRNA-20a promove a diferenciação osteogênica aumentando a atividade da via de sinalização BMP/Runx2 e ele tem como alvo os genes *Pparg*, *Bambi* e *Crim1* os quais agem como antagonistas dessa via de sinalização (Zhang e cols., 2011). Esse miRNA está reprimido no grupo MO, indicando que nesse grupo há uma menor diferenciação osteogênica.

Já o miRNA-17-5p tem como alvo o *Tcf3*, um fator de transcrição importante da via Wnt/ β -catenin. Sugere-se que o aumento de sua expressão leva a uma

diminuição da diferenciação osteoblástica (W Liu e cols., 2013). Esse miRNA apresentou-se induzido nos dois grupos controles.

Outro miRNA encontrado no grupo da medula e de grande importância na osteogênese é o miRNA-204-5p, o qual tem como alvo o Runx2, inibindo a diferenciação osteoblástica e promovendo a diferenciação adipocítica de células-tronco mesenquimais. Em nosso trabalho esse miRNA está induzido no grupo ovariectomizado (Huang e cols., 2010).

O miR-542-3p suprime a diferenciação osteogênica e promove a apoptose dos osteoblastos reprimindo o gene Bmp7 e a sua via de sinalização. Segundo Kureel (2014) a inibição farmacológica desse miRNA por anti-miR-542-3p pode representar uma estratégia terapêutica para aumentar a formação óssea *in vivo*. Esse miRNA está induzido tanto no grupo de células da calvária quanto nas células da medula de ratas ovariectomizadas.

O miRNA-34c-5p suprime a via de sinalização Notch em osteoblastos causando um aumento da diferenciação osteoclástica por inibir a expressão de osteoprotegerina (Lee e cols., 2012). Em nosso trabalho esse miRNA está induzido no grupo CO, condizendo com suas funções exercidas.

A inibição da tradução de mRNA pelos miRNAs tem surgido como um importante regulador de vias de sinalização do desenvolvimento ósseo, diferenciação e proliferação de osteoblastos, reabsorção óssea mediada por osteoclastos e homeostase óssea. Os miRNAs controlam múltiplas fases da regulação genética do desenvolvimento ósseo e funções pós-natais, desde a resposta inicial de células-tronco/progenitoras até a atividade estrutural e metabólica do tecido já maduro (Lian e cols., 2013).

Nossos achados demonstram, portanto, que os miRNAs desempenham um papel importante na função e diferenciação dos osteoblastos, influenciando diretamente na remodelação óssea.

Como pudemos observar, há uma diferença significativa no perfil de expressão tanto dos mRNA quanto dos miRNAs entre os dois grupos estudados (calvária X medula) e também entre os grupos controle e tratado (ovariectomizado), indicando que a osteoporose afeta esses perfis de expressão.

Nosso estudo indica que alterações intrínsecas na biologia das células-tronco estão envolvidas na patofisiologia da osteoporose. Através das análises de *microarray*, nós detectamos diferenças significantes entre células da calvária e medula óssea com e sem osteoporose, sugerindo que esta doença causa uma mudança no perfil de expressão dessas células. Nossos resultados confirmam a importância de genes bem conhecidos ligados à osteoporose como *Sost*, *Col1a1*, *Notch1* e *Spp1* e também detectamos novos genes candidatos que necessitam de mais investigações.

O distúrbio da homeostase óssea através da inibição de regeneradores osteogênicos é tão importante quanto a reabsorção óssea aumentada. Portanto, inibição dos inibidores da regeneração óssea usando, como exemplo, anticorpos de *Sost* é um tratamento mecanicamente plausível para esta síndrome e que terá mais atenção no futuro. Por estas razões, o conhecimento sobre alterações comportamentais provocadas pela osteoporose em células mesenquimais provenientes da medula óssea e em células osteoblásticas já diferenciadas pode ser útil para que novos medicamentos e novas tecnologias possam ser utilizados para evitar a progressão da doença.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, foi observado que:

-células provenientes da calvária e da medula óssea de ratas saudáveis apresentam modulação distinta na expressão de mRNAs associados ao processo de metabolismo ósseo quando comparado às células provenientes de ratas ovariectomizadas;

-células provenientes da calvária e da medula óssea de ratas saudáveis apresentam modulação distinta na expressão de miRNAs associados ao processo de metabolismo ósseo quando comparado às células provenientes de ratas ovariectomizadas.

Como conclusão, sugere-se que a osteoporose promove alterações metabólicas nas células da calvária e da medula óssea, interferindo no processo de remodelação óssea. O conhecimento da modulação de mRNAs e de miRNAs associados a este processo pode ser útil para que novos medicamentos e novas tecnologias possam ser utilizados para prevenção e/ou estabilização da doença.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRIGHT F, BLOOMBERG E, SMITH PH. Postmenopausal osteoporosis. Trans. Assoc. Am. Physicians 1940; 55: 298-305.

AMBROS V, BARTEL B, BARTEL DP, BURGE CB, CARRINGTON JC, CHEN X, DREYFUSS G, EDDY SR, GRIFFITHS-JONES S, MARSHALL M, MATZKE M, RUVKUN G, TUSCHL T. A uniform system for microRNA annotation. RNA 2003 Mar; 9(3):277–279.

AN JH, OHN JH, SONG JA, YANG JY, PARK H, CHOI HJ, KIM SW, KIM SY, PARK WY, SHIN CS. Changes of microRNA profile and microRNA-mrna regulatory network in bones of ovariectomized mice. J Bone Miner Res 2014 Mar; 29(3):644-56.

ARAÚJO, G. Brasil tem 15 milhões de pessoas com osteoporose. Disponível em: <<http://g1.globo.com/Noticias/Brasil/O,AA1318978-5598,00.html>> Acesso em: 20 agosto 2014.

ATMACA H, AYDIN A, MUSAOĞLU R. Experimental model of osteoporosis: comparison between ovariectomy and botulinum toxin A. Acta Ortop Bras 2013;21(6):340-343.

BARTEL DP, CHEN CZ. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. Nat Rev Genet 2004 May;5(5): 396-400.

BECKER C. Pathophysiology and clinical manifestations of osteoporosis. Clin Cornerstone 2008;9(2): 42-7.

BENISCH P, SCHILLING T, KLEIN-HITPASS L, FREY S, SEEFRIED L, RAAIJMAKERS N, KRUG M, REGENSBURGER M, ZECK S, SCHINKE T, AMLING M, EBERT R, JAKOB F. The transcriptional profile of mesenchymal stem cell

populations in primary osteoporosis is distinct and shows overexpression of osteogenic inhibitors. Plos One 2012;7(9):E45142.

BONEWALD LF. The Amazing Osteocyte. J Bone Miner Res 2011 Feb;26(2):229–238.

BRANDAO CM, FERRÉ F, MACHADO GP, GUERRA JR AA, ANDRADE EI, CHERCHIGLIA ML, ACURCIO F DE A. Public spending on drugs for the treatment of osteoporosis in post-menopause. Rev Saude Publica 2013;47(2): 390-402.

BRAZMA A, VILO J. Gene expression data analysis. Microbes Infect 2001 Aug;3(10): 823-9.

BUENO MJ, PÉREZ DE CASTRO I, MALUMBRES M. Control of cell proliferation pathways by micrnas. Cell cycle 2008;7(20):3143-3148.

CANALIS E, MCCARTHY T, CENTRELLA M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. J Clin Invest 1998;81(2):277-81.

COSTA RCC, MIGUEL FB, ROSA FP. Estratégias de bioengenharia tecidual na reconstrução óssea. Revista de Ciências Médicas e Biológicas 2005;4(1):70-76.

CUNHA EP, STEINER ML, STRUFALDI R, FERNANDES C, LAURINDO IMM, PEREIRA RMR, SIMÕES R. Osteoporose: Tratamento. Diretrizes clínicas na saúde suplementar. Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. Sociedade Brasileira de Reumatologia. 31 de janeiro de 2011.

D'AMELIO P, ROATO I, D'AMICO L, VENEZIANO L, SUMAN E, SASSI F, BISIGNANO G, FERRACINI R, GARGIULO G, CASTOLDI F, PESCARMONA GP, ISAIA GC. Bone and bone marrow pro-osteoclastogenic cytokines are up-regulated in osteoporosis fragility fractures. Osteoporos Int 2011 Nov;22(11): 2869-77.

- DALLANEZI G, NAHAS EA, FREIRE BF, NAHAS-NETO J, CORRENTE JE, MAZETO GM. Quality of life of women with low bone mass in postmenopause. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2011;33(3):133-138.
- DEMPSTER DW, LAMBING CL, KOSTENUIK PJ, GRAUER A. Role of RANK ligand and denosumab, a targeted RANK ligand inhibitor, in bone health and osteoporosis: a review of preclinical and clinical data. *Clin Ther* 2012 Mar;34(3):521-36.
- DOWNEY PA, SIEGEL MI. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther* 2006 Jan;86(1):77-91.
- DRZEWIECKI BA, THOMAS JC, TANAKA ST. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: current and future applications in the urinary bladder. *Stem Cells Int* 2011; 2010:765167.
- DUNCAN EL, BROWN MA. Mapping genes for osteoporosis-old dogs and new tricks. *Bone* 2010;46(5):1219-25.
- FROST HM, JEE WS. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner* 1992 Sep;18(3): 227-36.
- GIRO G, COELHO PG, SALES-PESSOA R, PEREIRA RM, KAWAI T, ORRICO SR. Influence of estrogen deficiency on bone around osseointegrated dental implants: an experimental study in the rat jaw model. *J Oral Maxillofac Surg* 2011;69(7): 1911-18.
- GOVINDARAJAN P, BÖCKER W, EL KHASSAWNA T, KAMPSCHULTE M, SCHLEWITZ G, HUERTER B, SOMMER U, DÜRSELEN L, IGNATIUS A, BAUER N, SZALAY G, WENISCH S, LIPS KS, SCHNETTLER R, LANGHEINRICH A, HEISS C. Bone matrix, cellularity, and structural changes in a rat model with high-turnover osteoporosis induced by combined ovariectomy and a multiple-deficient diet. *Am J Pathol* 2013;184(3): 765-777.

- GUIL S, ESTELLER M. Dna methylomes, histone codes and mirnas: tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41(1): 87-95.
- GUO J, LIU M, YANG D, BOUXSEIN ML, SAITO H, GALVIN RJ, KUHSTOSS SA, THOMAS CC, SCHIPANI E, BARON R, BRINGHURST FR, KRONENBERG HM. Suppression of Wnt Signaling by Dkk1 attenuates PTH-Mediated stromal cell response and new bone formation. *Cell Metabolism* 2010 Feb;11:161–171.
- HE YX, LIU Z, PAN XH, TANG T, GUO BS, ZHENG LZ, XIE XH, WANG XL, LEE KM, LI G, CAO YP, WEI L, CHEN Y, YANG ZJ, HUNG LK, QIN L, ZHANG G. Deletion of estrogen receptor beta accelerates early stage of bone healing in a mouse osteotomy model. *Osteoporos Int* 2012 Jan;23(1):377-89.
- HOAR W, HICKMAN CP. Ovariectomy and the estrous cycle of the rat. *General and comparative physiology*, 2. ed. New jersey: prentice-hall, p. 265, 1975.
- HOJO H, OHBA S, YANO F, SAITO T, IKEDA T, NAKAJIMA K, KOMIYAMA Y, NAKAGATA N, SUZUKI K, TAKATO T, KAWAGUCHI H, CHUNG UI. Gli1 protein participates in Hedgehog-mediated specification of osteoblast lineage during endochondral ossification. *J Biol Chem* 2012; 287:17860-17869.
- HO-PHAM LT, NGUYEN ND, NGUYEN TV. Quantification of the relative contribution of estrogen to bone mineral density in men and women. *BMC Musculoskelet Disord* 2013; 14:366.
- HOROWITZ MC. Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science* 1993 Apr; 260(5108):626-7.
- HUANG J, ZHAO L, XING L, CHEN D. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells* 2010 Feb;28(2):357-64.

INOSE H, OCHI H, KIMURA A, FUJITA K, XU R, SATO S, IWASAKI M, SUNAMURA S, TAKEUCHI Y, FUKUMOTO S, SAITO K, NAKAMURA T, SIOMI H, ITO H, ARAI Y, SHINOMIYA K, TAKEDA S. A microRNA regulatory mechanism of osteoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 Dec;106(49): 20794-9.

JUDAS F, PALMA P, FALACHO RI, FIGUEIREDO H. Estrutura e dinâmica do tecido ósseo. Texto de apoio para os alunos do Mestrado Integrado em Medicina. Disciplina de Ortopedia. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, março de 2012.

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. *Histologia Básica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

KALU DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1991;15(3):171–192.

KAPINAS K, DELANY AM. MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. *Arthritis Res Ther* 2011;13(3): 220.

KEISERMAN MW. Osteoporose- ABC da Saúde. Disponível em: <<http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?312>> Acesso em 12 de agosto de 2014.

KHARODE YP, SHARP MC, BODINE PV. Utility of the ovariectomized rat as a model for human osteoporosis in drug discovery. *Methods Mol Biol* 2008;455:111-24.

KHOSLA S, RIGGS BL. Pathophysiology of age-related bone loss and osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2005 Dec;34(4): 1015-30.

KIM KS, KIM JS, LEE MR, JEONG HS, KIM J. A study of microRNAs in silico and in vivo: emerging regulators of embryonic stem cells. *Febs J* 2009;276(8): 2140-9.

KOBAYASHI T, LU J, COBB BS, RODDA SJ, MCMAHON AP, SCHIPANI E, MERKENSCHLAGER M, KRONENBERG HM. Dicer-dependent pathways

regulate chondrocyte proliferation and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Feb;105(6):1949-54.

KUREEL J, DIXIT M, TYAGI AM, MANSOORI MN, SRIVASTAVA K, RAGHUVANSHI A, MAURYA R, TRIVEDI R, GOEL A, SINGH D. Mir-542-3p suppresses osteoblast cell proliferation and differentiation, targets BMP-7 signaling and inhibits bone formation. *Cell Death Dis* 2014;5: E1050.

LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, LENDECKEL W, TUSCHL T. Identification of novel genes coding for small expressed rnas. *Science* 2001 Oct;294(5543): 853-8.

LAU NC, LIM LP, WEINSTEIN EG, BARTEL DP. An abundant class of tiny rnas with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001 Oct;294(5543):858-62.

LEE J, VASIKARAN S. Current recommendations for laboratory testing and use of bone turnover markers in management of osteoporosis. *Ann Lab Med* 2012 Mar; 32(2):105-12.

LEE RC, AMBROS V. An extensive class of small rnas in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001 Oct;294(5543): 862-4.

LEE RC, FEINBAUM RL, AMBROS V. The *C. Elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small rnas with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993 Dec;75(5):843-54.

LELOVAS PP, XANTHOS TT, THOMA SE, LYRITIS GP, DONTAS IA. The laboratory rats as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med* 2008;58(5):424-430.

LI H, XIE H, LIU W, HU R, HUANG B, TAN YF, XU K, SHENG ZF, ZHOU HD, WU XP, LUO XH. A novel microrna targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation

in mice and contributes to primary osteoporosis in humans. *J Clin Invest* 2009 Dec;119(12):3666-77.

LI Z, HASSAN MQ, VOLINIA S, VAN WIJNEN AJ, STEIN JL, CROCE CM, LIAN JB, STEIN GS. A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Sep;105(37):13906-11.

LIAN JB, STEIN GS, VAN WIJNEN AJ, STEIN JL, HASSAN MQ, GAUR T, ZHANG Y. MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 2012 Apr;8(4):212-27.

LOPES AD. Ossos com vibrações positivas: uma máquina parecida com uma balança caseira é a mais nova arma no combate à osteoporose. *Revista Veja*, v. 2045, 30 de janeiro de 2008.

LYNAM-LENNON N, MAHER SG, REYNOLDS JV. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2009;84(1): 55-71.

MAILHOT M, BORKE JL. An isolation and in vitro culturing method for human intraoral bone cells derived from dental implant preparation sites. *Clin. Oral Implants Res* 1998;9:4350.

MANIATOPOULOS C, SODEK J, MELCHER AH. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res* 1988; 254: 317-330.

MANOLAGAS SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews* 2000 Apr;21(2): 115–137.

MANOLAGAS SC, JILKA RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 1995 Feb;332(5): 305-11.

MARCONDES FK, BIANCHI FJ, TANNO AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 2002; 62(4): 609-614.

MARIE PJ, KASSEM M. Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets. *Eur J Endocrinol* 2011 Jul;165(1): 1-10.

MARUOTTI N, CORRADO A, NEVE A, CANTATORE FP. Bisphosphonates: effects on osteoblast. *Eur J Clin Pharmacol* 2012 Jul;68(7): 1013-8.

MONTEIRO BS, ARGOLO NNM, DEL CARLO RJ. Células-tronco mesenquimais. *Cienc. Rural* 2010 Feb;40(1):238-245.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Who scientific group on the assessment of osteoporosis at primary health care level. Summary meeting report Brussels, p. 13, 2004.

PACIFICI R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996 Aug;11(8): 1043-51.

PASQUINELLI AE, REINHART BJ, SLACK F, MARTINDALE MQ, KURODA MI, MALLER B, HAYWARD DC, BALL EE, DEGNAN B, MÜLLER P, SPRING J, SRINIVASAN A, FISHMAN M, FINNERTY J, CORBO J, LEVINE M, LEAHY P, DAVIDSON E, RUVKUN G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000 Nov;408(6808):86-9.

PINHEIRO MM, CICONELLI RM, JACQUES NO, GENARO OS, MARTINI LA, FERRAZ MB. O impacto da osteoporose no Brasil: dados regionais das fraturas em homens e mulheres adultos – The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Rev Bras Reumatol* 2010; 50(2): 113-27.

PINTO FILHO STL, TREICHEL TLE, JUNIOR JSA, DA ROSA MB, DALMOLIN F, BRUN MV, KRAUSE A, PIPPI NL. Células-Tronco mesenquimais adultas:

Características e aplicações experimentais em animais. Vet. E Zootec 2013;20(Edição Comemorativa):49-59.

RAISZ LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. J Clin Invest 2005 Dec;115(12): 3318-25.

RALSTON SH. Genetics of osteoporosis. Ann N Y Acad Sci 2010 Mar;1192:181-9.

RAWLINSON SC, BOYDE A, DAVIS GR, HOWELL PG, HUGHES FJ, KINGSMILL VJ. Ovariectomy vs. Hypofunction: their effects on rat mandibular bone. J Dent Res 2009 Jul;88(7): 615-20.

REINHART BJ, SLACK FJ, BASSON M, PASQUINELLI AE, BETTINGER JC, ROUGVIE AE, HORVITZ HR, RUVKUN G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. Nature 2000 Feb;403(6772): 901-6.

RIGGS BL, KHOSLA S, MELTON LJ 3RD. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. Endocr Rev 2002;23(3): 279-302.

ROBICHAUD J, BLACK WC, THÉRIEN M, PAQUET J, OBALLA RM, BAYLY CI, MCKAY DJ, WANG Q, ISABEL E, LÉGER S, MELLON C, KIMMEL DB, WESOLOWSKI G, PERCIVAL MD, MASSÉ F, DESMARAIS S, FALGUEYRET JP, CRANE SN. Identification of a non basic, nitrile-containing cathepsin K inhibitor (MK-1256) that is efficacious in a monkey model of osteoporosis. J Med Chem 2008;51(20): 6410-20. J Oral Maxil Surg 2014 Apr; 72(4): 694.e1-694.e9.

RUSSELL RG, ESPINA B, HULLEY P. Bone biology and the pathogenesis of osteoporosis. Curr Opin Rheumatol 2006 Jun;18, Suppl 1:S3-10.

SANDHU SK, HAMPSON G. The pathogenesis, diagnosis, investigation and management of osteoporosis. J Clin Pathol 2011 Dec;64(12): 1042-50.

SEVIGNANI C, CALIN GA, SIRACUSA LD, CROCE CM. Mammalian micrnas: a small world for fine-tuning gene expression. *Mamm Genome* 2006 Mar;17(3): 189-202.

SIMON LS. Osteoporosis. *Rheum Dis Clin North Am* 2007 Feb;33(1): 149-76.

SIMONET WS, LACEY DL, DUNSTAN CR, KELLEY M, CHANG MS, LÜTHY R, NGUYEN HQ, WOODEN S, BENNETT L, BOONE T, SHIMAMOTO G, DEROSE M, ELLIOTT R, COLOMBERO A, TAN HL, TRAIL G, SULLIVAN J, DAVY E, BUCAY N, RENSHAW-GEGG L, HUGHES TM, HILL D, PATTISON W, CAMPBELL P, SANDER S, VAN G, TARPLEY J, DERBY P, LEE R, BOYLE WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997 Apr; 89(2): 309-19.

SOMMERFELDT DW, RUBIN CT. Biology of bone and how it orchestrates: The form and function of the skeleton. *Eur Spine J* 2001;10: S86–S95.

SOUTH-PAUL JE. Osteoporosis: part I. Evaluation and assessment. *Am Fam Physician* 2001 Mar; 63(5): 897-904.

SUGATANI T, HRUSKA KA. Impaired micro-RNA pathways diminish osteoclast differentiation and function. *J Biol Chem* 2009 Feb;284(7): 4667-78.

TEPLYUK NM, HAUPT LM, LING L, DOMBROWSKI C, MUN FK, NATHAN SS, LIAN JB, STEIN JL, STEIN GS, COOL SM, VAN WIJNEN AJ. The osteogenic transcription factor runx2 regulates components of the fibroblast growth factor/proteoglycan signaling axis in osteoblasts. *J Cell Biochem*. 2009 May; 107(1): 144–154.

TEZUKA K, YASUDA M, WATANABE N, MORIMURA N, KURODA K, MIYATANI S, HOZUMI N. Stimulation of osteoblastic cell differentiation by Notch. *J Bone Miner Res* 2002; 17(2): 231-239.

- TRANAH GJ, TAYLOR BC, LUI LY, ZMUDA JM, CAULEY JA, ENSRUD KE, HILLIER TA, HOCHBERG MC, LI J, RHEES BK, ERLICH HA, STERNLICHT MD, PELTZ G, CUMMINGS SR. Study of Osteoporotic Fractures (SOF) Research Group. Genetic variation in candidate osteoporosis genes, bone mineral density, and fracture risk: the study of osteoporotic fractures. *Calcif Tissue Int* 2008;83(3):155-166.
- TURNER RT, MARAN A, LOTINUN S, HEFFERAN T, EVANS GL, ZHANG M. Animal models for osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord* 2001;2(1):117-27.
- VAN WIJNEN AJ, VAN DE PEPPEL J, VAN LEEUWEN JP, LIAN JB, STEIN GS, WESTENDORF JJ, OURSLER MJ, IM HJ, TAIPALEENMÄKI H, HESSE E, RIESTER S, KAKAR S. MicroRNA functions in osteogenesis and dysfunctions in osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep* 2013 Jun;11(2): 72-82.
- VARELLA D. Disponível em: < <http://drauziovarella.com.br/letras/o/osteoporose-3/> > Acesso em: 18 julho 2014.
- VERONESI F, TORRICELLI P, BORSARI V, TSCHON M, RIMONDINI L, FINI M. Mesenchymal stem cells in the aging and osteoporotic population. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2011;21(4): 363-77.
- WEITZMANN MN, PACIFICI R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest* 2006 May;116(5): 1186-94.
- WRONSKI TJ, LOWRY PL, WALSH CC, IGNASZEWSKI LA. Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1985 May;37(3): 324-8.
- WRONSKI TJ, DANN LM, HORNER SL. Time course of vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Bone* 1989;10(4): 295-301.
- XIA Z, CHEN C, CHEN P, XIE H, LUO X. MicroRNAs and their roles in osteoclast differentiation. *Front Med* 2011 Dec;5(4): 414-9.

XU XH, DONG SS, GUO Y, YANG TL, LEI SF, PAPASIAN CJ, ZHAO M, DENG HW. Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: the 2009 update. *Endocr Rev* 2010 Aug;31(4):447-505.

YABUTA PBD. O papel dos micrnas de células T na susceptibilidade/resistência a artrite reumatóide experimental. Ribeirão Preto. Tese [Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada]. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2012.

ZHANG JF, FU WM, HE ML, XIE WD, LV Q, WAN G, LI G, WANG H, LU G, HU X, JIANG S, LI JN, LIN MC, ZHANG YO, KUNG HF. Mirna-20a promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by co-regulating BMP signaling. *RNA Biol* 2011 Sep-Oct;8(5): 829-38.

Figura da capa retirada de Google Imagens. Disponível em: <http://vsprigg.wordpress.com/2012/02/> Acesso em 01 de novembro de 2014.