

LEVI HIGINO JALES NETO

**Estudo genético por *microarray* em mulheres
idasas com fratura vertebral por osteoporose**

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

Programa de Ciência do Sistema
Músculoesquelético

Orientadora: Prof^a Dr^a Rosa Maria Rodrigues
Pereira

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A
versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**SÃO PAULO
2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Jales Neto, Levi Higinio
Estudo genético por microarray em mulheres
idasas com fratura vertebral por osteoporose
/ Levi Higinio Jales Neto. -- São Paulo, 2020.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético.
Orientadora: Rosa Maria Rodrigues Pereira.

Descritores: 1.Fraturas da coluna vertebral
2.Mulheres 3.Idoso 4.Osteoporose 5.Análise de
sequência com séries de oligonucleotídeo 6.Expressão
gênica 7.Biologia computacional

USP/FM/DBD-073/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

*“O Senhor é meu pastor e nada
me faltará.”*

Salmos 23

**Dedico todos os meus esforços e motivação
aos meus pais, esposa, filhos:**

Levi Higino Jales Júnior,
Vilma Maria de Moraes Jales,
Sumatra Melo da Costa Pereira Jales,
Guilherme Levi Pereira Jales,
Beatriz Pereira Jales.

**e para todas as pessoas que
utilizarem essa pesquisa.**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a força interior que me mostra o caminho a ser seguido na vida.

À Profa. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira, minha orientadora, pelo exemplo e dedicação ao trabalho e a seus alunos. Pela idealização do projeto e pelas inúmeras revisões. Agradeço também, pela paciência em me apoiar, pela confiança, pelas reuniões científicas e pela grande amizade construída durante esses anos de estudo.

À Disciplina de Reumatologia da Universidade de São Paulo, pela oportunidade e suporte na realização da pesquisa.

À Georgea Hermógenes Fernandes Torres, por ter sido fundamental na convocação dos pacientes, coleta dos dados clínicos e ajuda no preenchimento da tabela.

Ao Luiz Gusmão, por ter participado na convocação dos pacientes para participar do estudo.

À Liliam Takayama, pela realização e ensinamentos dos ensaios de extração de RNA, por me ajudar com as aulas e pela amizade.

À Valéria de Falco Caparbo, por ter me ensinado a realizar os ensaios de laboratório, por gerenciar os insumos e gentileza no dia a dia.

À Michelle Sabrina, pelos ensinamentos iniciais de bioinformática e pelo acolhimento no INCOR.

À Núbia Steban, pela criação e ensinamentos de programação em R Studio.

À Zofia Wicik, pelos ensinamentos de bioinformática, pela análise da interação gênica, pela validação do *microarray* pelo método PCR em tempo real, pela revisão do artigo.

A todos os funcionários e colegas do Laboratório de Metabolismo Ósseo pelas suas contribuições para essa tese.

Ao Dr. Alexandre Pereira, pela orientação e revisões dessa pesquisa.

À Dra. Neusa Lopes, pela ajuda com o projeto de pesquisa.

Às secretárias da Disciplina de Reumatologia, em especial Cláudia e Mayra, pela ajuda com o programa de pós-graduação.

Às secretárias da pós-graduação do programa de Ortopedia e Traumatologia, em especial a Tânia Borges, no importante suporte administrativo da tese.

À minha esposa Sumatra Melo da Costa Pereira Jales, que foi a grande incentivadora do doutorado e pela confiança no meu estudo. Companheira fiel e organizadora da minha vida.

A meu pai Prof. Dr. Levi Higino Jales Júnior, que é a pessoa que eu me espelho como médico e pesquisador. Exemplar na vida profissional e pessoal.

À minha santa mãe Vilma Maria de Moraes Jales, pela sua bondade, inteligência e amor a todas as pessoas.

A meu filho Guilherme Levi Pereira Jales, pela sua vida, por acreditar nessa pesquisa e no sonho de fazer algo produtivo para a sociedade.

À minha filha Beatriz Pereira Jales, pela sua luz interior e maturidade que me acalma todos os dias.

À minha irmã Flávia Maria de Moraes Jales Fernandes e meu cunhado Marcus Augusto Fernandes, pelos seus exemplos de determinação e motivação nos estudos.

À minha sobrinha e afilhada Camila Jales Fernandes, pelo seu exemplo de raça e inteligência.

Aos meus avós Levi Higino Jales, Maria de Lourdes Cavalcante Jales, Francisco Batista de Moraes e Maria Edite Melo de Moraes pelas influências direta e indiretamente na minha formação.

À minha sobrinha Cecília Jales Fernandes, pela sua alegria e amor aos familiares.

A meu sogro Francisco Vilmar Pereira e minha sogra Rosana Melo da Costa Pereira, por acreditar e dar apoio na realização do doutorado.

À Raimunda Eulália Alves de Almeida (Dona Leda), pelo suporte e ajuda no meu lar.

A todos os meus familiares e amigos, em especial ao Prof. Dr. Roberto Levi Cavalcante Jales e à Dra. Patrícia Leda Jales de Brito, pois foram muito importantes nas correções e com valiosas sugestões da escrita da tese e à minha tia Maria Lúcia Cavalcante Jales Soares pela sua forte espiritualidade e notável saber jurídico.

Aos pacientes dessa pesquisa, que foram voluntários para a realização desse trabalho.

Agradecimentos Especiais

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo,
que aprovou e financiou a execução deste projeto, pela confiança que
dedica aos pesquisadores e à pesquisa científica (# **2016/00006-7**).

**Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
Tecnológico,** pelo incentivo fundamental durante o período de pós-
graduação (#**457590/2013-0**).

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	8
3	MÉTODOS	10
3.1	População do Estudo	11
3.2	Medições e Procedimentos	14
3.2.1	Coleta de sangue periférico e extração de RNA	14
3.2.2	Densidade mineral óssea e medidas semiquantitativas (SQ) para fraturas vertebrais	15
3.2.3	Análise de expressão de genes por <i>microarray</i>	17
3.2.4	Análise de enriquecimento por bioinformática.....	17
3.2.5	Validação dos transcritos identificados pela bioinformática por qPCR-RT (PCR quantitativo em tempo real)	19
4	RESULTADOS.....	22
4.1	Características da população estudada	23
4.2	Identificação de Fraturas Vertebrais.....	25
4.3	Análise <i>DEGs</i>	27
4.4	Análise da interação gênica	33
4.5	Validação da expressão dos genes indicados pelo <i>microarray</i> usando PCR quantitativo em tempo real	34
4.6	Curva ROC do PCR em tempo real dos genes validados	37
5	DISCUSSÃO	41
6	CONCLUSÃO	49
7	ANEXOS	51
8	REFERÊNCIAS	64
	APÊNDICES	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

25OHD	- 25-hidroxivitamina D
<i>ARHGAP8/PRR5-ARHGAP8</i>	- Gene do ativador Rho GTPase, proteína 8
<i>BSG</i>	- Gene do indutor de metaloproteinase da matriz extracelular
BMMSCs	- Propriedades biológicas da medula óssea derivada das células-tronco mesenquimais envelhecidas
<i>CD248</i>	- Gene da molécula do receptor <i>CD248</i>
<i>CDC34</i>	- Gene que codifica um produto proteico que possui atividade conjugadora de ubiquitina
<i>COL1A1</i>	- Gene do colágeno tipo I
<i>COL1A2</i>	- Gene do colágeno tipo II
CTX	- Telopectídeo-C do colágeno tipo I
<i>CYSRT1</i>	- Gene da calda rica em cisteína 1
<i>DEGs</i>	- Genes diferencialmente expressos
DMO	- Densidade mineral óssea
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DNAc	- Ácido desoxirribonucleico complementar
DP	- Desvio padrão
<i>DPCD</i>	- Gene deletado em discinesia ciliar primária
DXA	- <i>Dual X-ray Absorptiometry</i> (densitômetro ósseo)
DPOC	- Doença pulmonar obstrutiva crônica
<i>ECSIT</i>	- Gene do Intermediário de sinalização evolutivamente conservado na via Toll, mitocondrial
<i>ELOF1</i>	- Gene do fator de alongamento, 1 homólogo
<i>ENPP2</i>	- Gene do ectonucleotídeo pirofosfatase /fosfodiesterase 2
<i>ESR1</i>	- Gene do receptor de estrógeno I
<i>FAM134B</i>	- Gene do regulador reticulofágico 1
<i>FBLN7</i>	- Gene da fibulina 7

<i>FKBP8</i>	- Gene da proteína 8 de ligação a FK506
FV	- Fratura vertebral
GO	- Base de dados <i>gene ontology</i>
<i>GP5</i>	- Gene da glicoproteína de plaquetas V
<i>GPLD1</i>	- Gene da glicosil-fosfatidil-inositol fosfolipase D1 específica
GWAS	- <i>Genoma Wide Association Study</i> (Estudo da associação ampla do genoma)
IMC	- Índice de massa corporal
<i>ITGA1</i>	- Gene da integrina subunidade alfa 1
<i>ITGA6</i>	- Gene da integrina subunidade alfa 6
<i>LCN1</i>	- Gene da lipocalina 1
<i>LCN2</i>	- Gene da lipocalina 2
<i>LGALS14</i>	- Gene da galectina 14
<i>LRP4</i>	- Gene do receptor de LDL relacionado a proteína 4
<i>LRP5</i>	- Gene do receptor de LDL relacionado a proteína 5
<i>LYL1</i>	- Gene da proteína membro da família hélice-ciclo-hélice básica LYL1
<i>MLST8</i>	- Gene da proteína associada ao MTOR, subunidade LST8 homóloga
mTOR	- <i>Mammalian target of rapamycin</i>
mTORC1	- Complexo 1 do <i>Mammalian target of rapamycin</i>
NK	- Células <i>natural killer</i> (Células assassinas naturais)
<i>NKG7</i>	- Gene da Proteína natural 7 para grânulos de células NK
NVF	- <i>No vertebral fracture</i> (Sem fratura vertebral)
OPG	- Osteoprotegerina
P1NP	- Propeptídeo N-terminal do colágeno tipo I
<i>PDK1</i>	- Gene da piruvato desidrogenase quinase 1
<i>PLCL1</i>	- Gene da fosfolipase C <i>Like 1</i>
<i>PLTP</i>	- Gene da proteína de transferase fosfolipídica
<i>PNO1</i>	- Gene proteína ligante de RNA
POLL	- Gene do DNA polimerase Lambda

<i>Prader</i>	- Gene da Willi region non-protein coding RNA 1
<i>PRDX2</i>	- Gene da Peroxirredoxina 2
<i>PRDX5</i>	- Gene da Peroxirredoxina 5
<i>PRR5</i>	- Gene rico em prolina 5
<i>PTH</i>	- Hormônio da paratireoide
<i>PTMS</i>	- Gene da Paratimosina
qPCR-RT	- Reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real
<i>RANKL</i>	- <i>Rank</i> ligante
<i>RNA</i>	- Ácido ribonucleico
<i>RNF10</i>	- Gene da proteína 10 do dedo anelar
<i>RPS29</i>	- Gene da proteína ribossomal S29
<i>RR</i>	- Risco relativo
<i>SERINC5</i>	- Gene do incorporador de serina 5
<i>SNP</i>	- Polimorfismo de Nucleotídeo Único
<i>SNTG2</i>	- Gene da sintrofina gama 2
<i>SOST</i>	- Gene da esclerostina
<i>SPAH</i>	- São Paulo <i>Ageing & Health</i>
<i>SPP1</i>	- Gene da osteopontina
<i>SQ</i>	- Semiquantitativo
<i>STK16</i>	- Gene da Serina/treonina quinase 16
<i>SYDE1</i>	- Gene da sinapse defeituosa 1, Rho GTPase, homologa 1 (<i>C elegans</i>)
<i>TCIRG1</i>	- Gene regulador 1 da imunidade celular T
<i>TAS2R41</i>	- Gene do receptor 2 do paladar, membro 41
<i>TAS2R60</i>	- Gene do receptor 2 do paladar, membro 60
<i>TBX21</i>	- Gene do Fator de transcrição <i>T-Box</i> 21
<i>TFG</i>	- Taxa de filtração glomerular
<i>TNF</i>	- Fator de Necrose Tumoral
<i>TNFRSF11A</i>	- Gene receptor da superfamília de TNF, membro 11 ^a
<i>TNFRSF11B</i>	- Gene receptor da superfamília de TNF, membro 11B
<i>TNFSF11</i>	- Gene receptor da superfamília de TNF, membro 11

<i>TNXB</i>	- Gene da tenascina XB
<i>TRAF3IP2</i>	- Gene da proteína 2 que interage com o fator 3 do TNF
<i>UBE2M</i>	- Gene da enzima E2 M conjugante de ubiquitina
<i>UBXN6</i>	- Gene da proteína 6 do domínio UBX
<i>VDR</i>	- Receptor de vitamina D
<i>VFA</i>	- <i>Vertebral fracture assessment</i>
<i>WNK1</i>	- Gene da proteína quinase 1deficiente em lisina
<i>ZBTB40</i>	- Gene dedo de zinco, domínio BTB contendo a proteína 40
<i>ZNF653</i>	- Gene da proteína do dedo de zinco 653
<i>KRTAP19-1</i>	- Gene da queratina associado a proteína 19-1
<i>A4GNT</i>	- Gene da Alfa-1,4-N-acetilglucosaminiltransferase
<i>EPB42</i>	- Gene da banda proteica 4.2 da membrana eritrocítica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Amostra de osso trabecular obtida por microtomografia 3D	3
Figura 2 - Esquema de hibridização e análise dos dados da expressão gênica usando a técnica do <i>microarray</i>	7
Figura 3 - Fluxograma do estudo	12
Figura 4 - Classificação semiquantitativa da fratura vertebral (Genant).....	16
Figura 5 - Interação gênica (Gene-Gene dos <i>DEGs</i>)	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas, bioquímicas e densitométricas dos participantes.....	24
Tabela 2 - TOP 10 <i>DEGs</i> Superexpressos e subexpressos	29
Tabela 3 - Análise do enriquecimento das vias biológicas dos genes diferencialmente expressos	31
Tabela 4 - Análise do enriquecimento <i>Gene Ontology</i> (GO) dos genes diferencialmente expressos entre mulheres idosas com osteoporose e fratura vertebral (Grupo FV) e osteoporose sem fratura vertebral (Grupo controle)	32
Tabela 5 - Resumo dos resultados dos genes selecionados para validação.....	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Fratura de vértebra por paciente (número/paciente).....	25
Gráfico 2 - Locais da fratura (coluna vertebral)	26
Gráfico 3 - Gravidade da fratura vertebral (Genant)	26
Gráfico 4 - Tipo da fratura vertebral (Deformidade).....	27
Gráfico 5 - Gráfico vulcano dos genes expressos	28
Gráfico 6 - Validação dos genes por PCR em tempo real	35
Gráfico 7 - Curva ROC do gene validado ITGA6.....	38
Gráfico 8 - Curva ROC do gene validado SNTG2	39
Gráfico 9 - Curva ROC do gene validado TRAF3IP2	40

RESUMO

Jales Neto LH. *Estudo genético por microarray em mulheres idosas com fratura vertebral por osteoporose* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Introdução: As fraturas vertebrais são as manifestações clínicas mais comuns da osteoporose e estão associadas à elevada morbimortalidade. Vários fatores, incluindo história pessoal ou familiar de fraturas, densidade mineral óssea (DMO) e idade aumentam o risco de fraturas. No entanto, o mecanismo molecular subjacente pelo qual esses fatores levam ao aumento do risco não é totalmente compreendido. Portanto, o objetivo deste estudo é identificar possíveis marcadores genéticos moleculares associados a fraturas vertebrais osteoporóticas. **Método:** A análise de *microarray* transcriptômico foi realizada em amostras de sangue periférico de mulheres idosas com fratura vertebral (VF) e sem fratura vertebral (NVF), todas com critérios densitométrico de osteoporose. Elas foram pareadas por idade, doenças crônica, uso de medicações crônicas, tabagismo e DMO. O chip de *microarray* Affymetrix HTA 2.0 foi usado para análise de RNA a partir de amostras de sangue total de pacientes, dos 2 grupos (24 VF vs. 12 NVF). Na análise estatística dos *microarrays*, aplicamos o modelo de regressão logística com a idade utilizada como covariável. O processamento de dados e análise de genes diferencialmente expressos foram realizados usando os pacotes *affy* e *multtest* da *bioconductor*. Finalmente, a lista de transcrição foi carregada no software *Ingenuity Pathway Analysis* para explorar e identificar as vias de enriquecimento e funções biológicas. A análise da bioinformática para avaliar a interação gênica foi realizada pelo *software cytoscape*. As alterações de expressão gênica foram validadas usando o método qPCR-RT (reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real). Genes com $p < 0,01$ foram considerados estatisticamente significantes no estudo de *microarrays* e $p < 0,05$ na qPCR-RT. **Resultados:** Comparando os grupos VF e NVF, na análise dos dados de *microarray* foram identificados 142 genes diferencialmente expressos (DEG), 57 com a expressão aumentada e 85 com a expressão reduzida no grupo com fratura vertebral. Entre os top 10: O DEG com maior expressão foi o *Gamma2-Syntrophin (SNTG2)* ($\beta = 31,88$, $p < 0,01$), o *TRAF3IP2* também mostrou uma expressão significativa ($\beta = 12,18$, $p < 0,006$). Na análise do enriquecimento da bioinformática foram encontradas as vias de sinalização do mTOR1 (*PNO1*, *PDK1*), Adesão focal (*ITGA6*, *TNXB*), interação do receptor da matrix extra-celular (*ITGA6*, *GP5*, *TNXB*), da linhagem de células hematopoiéticas (*ITGA6*, *GP5*) como vias significativas ($p \leq 0,05$). Na análise da base de dados do *Gene Ontology* (GO), no processo biológico, a via mais significativa foi a regulação do

processo metabólico do fósforo com 6 genes envolvidos (*WNK1*, *ITGA6*, *PDK1*, *PLCL1*, *TNXB*, *ENPP2*), no componente celular a via da matriz extracelular com 4 genes envolvidos (*CD248*, *FBLN7*, *ITGA6*, *TNXB*) e na função molecular foram encontrados 5 genes (*SNTG2*, *ITGA6*, *PLCL1*, *TNXB*, *TRAF3IP2*) envolvidos com a via do receptor ligante. Os principais genes achados pelo estudo da bioinformática foram analisados e validados por outro método (qPCR- RT), onde foi confirmada a expressão aumentada no grupo VF da Proteína 2 Interagindo TRAF3 (*TRAF3IP2*, *fold change* = 2,79, desvio padrão = 0,83, $p = 0,02$), Subunidade Alfa 6 de Integrina (*ITGA6*, *fold change* = 2,86, desvio padrão = 1,14, $p = 0,04$) e Sintrofina (*SNTG2*, *fold change* = 2,79, desvio padrão = 0,86, $p = 0,01$). **Conclusão:** Identificamos e validamos os genes transcritos *SNTG2*, *TRAF3IP2* e *ITGA6* na fratura vertebral osteoporótica em mulheres idosas, de forma independente da densidade mineral óssea. Estes genes podem ser utilizados como potenciais biomarcadores ou novos alvos terapêuticos de fratura vertebral osteoporótica.

Descritores: Fraturas da coluna vertebral; Mulheres; Idoso; Osteoporose; Análise de sequência com séries de oligonucleotídeo; Expressão gênica; Biologia computacional.

ABSTRACT

Jales Neto LH. *Genetic study by microarray in elderly women with osteoporosis vertebral fracture* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

Background: Vertebral fractures are the most common clinical manifestation of osteoporosis and are associated with high morbidity and mortality. Several factors, including personal or family history of fractures, bone mineral density (BMD) and age increase the risk of fractures. However, the underlying molecular mechanism by which these factors lead to increased risk is not fully understood. Therefore, the aim of this study is to identify possible molecular genetic markers associated with osteoporotic vertebral fractures.

Subjects and Methods: An analysis of the transcriptomic microarray was performed on peripheral blood samples from elderly women with vertebral fracture (VF) and without vertebral fracture (NVF), all with densitometric osteoporosis classification. They were matched for age, chronic illness, chronic medication use, smoking and BMD. The Affymetrix HTA 2.0 microarray chip was used for RNA analysis from samples of whole blood from patients in the 2 groups (24 VF vs. 12 NVF). In the statistical analysis of microarrays, the logistic regression model with age used as a covariate is applied. Data processing and analysis of differentially expressed genes were performed using the bioconductor's *affy* and *multtest* packages. Finally, a transcript list was loaded into the Ingenuity Pathway Analysis software to explore and identify ways of enhancement and biological functions. The analysis of bioinformatics to assess gene interaction was performed using the *cytoscape* software. The changes in gene expression were validated using the qPCR-RT method (real-time quantitative polymerase chain reaction). Genes with $p \leq 0.01$ were considered statistically significant in the study of microarrays and $p \leq 0.05$ in qPCR-RT. **Results:** Comparing the VF and NVF groups, the analysis of the microarray data identified 142 differentially expressed genes (DEG), 57 with increased expression and 85 with reduced expression in the group with vertebral fracture. Among the top 10: The most expressive DEG was Gamma2-Syntrophin (*SNTG2*) ($\beta = 31.88$, $p < 0.01$), *TRAF3IP2* also showed significant expression ($\beta = 12.18$, $p < 0.006$). In the analysis of bioinformatics enrichment, the signaling pathways of mTORC1 (*PNO1*, *PDK1*), focal adhesion (*ITGA6*, *TNXB*), interaction of the extra-cellular matrix receptor (*ITGA6*, *GP5*, *TNXB*), of the hematopoietic cell line (*ITGA6*, *GP5*) as significant pathways ($p \leq 0.05$). In the analysis of the Gene Ontology (GO) database, in the biological process, the most significant route was the regulation of the phosphorus metabolic process with 6 genes involved (*WNK1*, *ITGA6*, *PDK1*, *PLCL1*, *TNXB*, *ENPP2*), in the cellular

component the extracellular matrix pathway with 4 genes involved (*CD248*, *FBLN7*, *ITGA6*, *TNXB*) and in molecular function, 5 genes (*SNTG2*, *ITGA6*, *PLCL1*, *TNXB*, *TRAF3IP2*) were found involved with the ligand receptor pathway. The main genes found by the bioinformatics study were analyzed and validated by another method (qPCR-RT), which confirmed the increased expression in the VF group of Protein 2 Interacting TRAF3 (*TRAF3IP2*, fold change = 2.79, standard deviation = 0.83, $p = 0.02$), Alpha 6 Subunit of Integrin (*ITGA6*, fold change = 2.86, standard deviation = 1.14, $p = 0.04$) and Syntrophin (*SNTG2*, fold change = 2.79, deviation standard = 0.86, $p = 0.01$). **Conclusion:** Our data identified and validated the association of *SNTG2*, *TRAF3IP2* and *ITGA6* with osteoporotic vertebral fractures in elderly women, independently of bone mineral density. These genes can be used as potential biomarkers or new therapeutic targets for osteoporotic vertebral fractures.

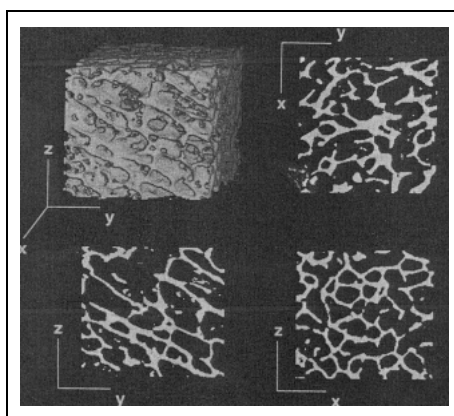
Descriptors: Spinal fractures; Aged; Women; Osteoporosis; Oligonucleotide array sequence analysis; Gene expression; Computational biology.

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença óssea caracterizada por baixa densidade óssea e deterioração da microarquitetura, que pode resultar em um risco aumentado de fraturas por fragilidades, ocorrendo mais comumente em mulheres na pós-menopausa¹.

A fratura da coluna vertebral é a fratura osteoporótica mais comum². Os dados epidemiológicos mostram uma prevalência em idosos entre 10 e 30%, variando conforme a idade e o sexo³⁻⁵. Esta complicação está associada a uma elevada morbidade⁶⁻⁸, incluindo dorsalgia e lombalgia aguda e crônica, importante redução da independência do idoso, redução da estatura, deformidade óssea como a cifose torácica e aumento da probabilidade de causar depressão, portanto, elevando de forma indireta a mortalidade^{9,10}. Além disso, as fraturas vertebrais merecem atenção, porque provavelmente se tornarão um importante problema de saúde pública com a tendência de envelhecimento da população mundial, pois a incidência da fratura vertebral aumenta de forma significativa com a idade¹¹. Os estudos prévios já demonstraram a sua associação com o aumento do risco de novas fraturas osteoporóticas em outros locais do esqueleto, sendo um fator de risco independente da densidade óssea para outras fraturas^{12,13}. Lindsay *et al.*¹⁴ estimaram que a chance de uma pessoa que desenvolve uma fratura vertebral compressiva evoluir com uma nova fratura compressiva é de cinco vezes, quando comparado ao grupo controle.

A densidade mineral óssea (DMO) também é outra importante forma de avaliar o risco da fratura vertebral, visto que uma redução de dois desvios padrões (T-score = - 2), aumenta o risco da fratura vertebral compressiva em quatro a seis vezes¹⁵. Estima-se que de 25 a 30% do osso trabecular é remodelado anualmente¹⁶ e, como a coluna vertebral tem a microestrutura formada por uma elevada porcentagem de osso trabecular (Figura 1), esse sítio vai apresentar uma maior capacidade metabólica e de remodelamento ósseo que o colo do fêmur, sofrendo uma maior resposta aos estímulos físicos, inflamatórios e hormonais que são determinados geneticamente.



Fonte: Goulet *et al.* (1994)*

Figura 1 - Amostra de osso trabecular obtida por microtomografia 3D

A fragilidade óssea é determinada por fatores intrínsecos, como a DMO, a geometria da cortical, a microestrutura da região trabecular e sua conectividade, a mineralização, a composição da matriz e a capacidade individual de reparo celular a *microdanos*. Todos esses fatores são influenciados pela taxa de remodelamento tecidual, sendo importantes na

* Goulet RW, Goldstein SA, Ciarelli MJ, Kuhn JL, Brown MB, Feldkamp LA. The relationship between the structural and orthogonal compressive properties of trabecular bone. *J Biomech.* 1994;27(4):375-89.

determinação da qualidade óssea¹⁷. Os fatores extrínsecos, como a propensão a quedas e a força muscular, também influenciam ao risco de fratura vertebral. As expressões genéticas desses fatores sofrem influência da interação gênica com o meio ambiente, hábitos de vida, doenças crônicas e medicações de uso contínuo. Estudo realizado na cidade de Framingham demonstrou que o risco específico de fratura vertebral, a DMO volumétrica e a geometria na coluna lombar são características hereditárias complexas, influenciadas por interações gene-ambiente¹⁸. Outro fator que evidencia a importância da genética na fratura vertebral é que a história familiar positiva para fratura vertebral constitui um fator de risco para novas fraturas vertebrais¹⁹ e diversos estudos mostraram que a variação da DMO é determinado por fatores genéticos como a hereditariedade, influenciando a DMO em 50 a 85% e a fratura óssea inespecífica em 25 a 68 %²⁰, esses dados enfatizam a participação da genética na patogênese dessa doença. Diversos genes tem sido relacionados a baixa DMO, em doenças monogênicas, como o gene do colágeno tipo I e tipo II (*COL1A1*) e (*COL1A2*) envolvido na osteogênese imperfeita²¹ e a mutação do gene *LRP5* encontrada na síndrome osteoporose-pseudoglioma²². Outros genes relacionados a uma maior DMO como o gene *SOST*, responsável pela esclerosteose familiar²³, e o gene *TCIRG1* envolvido na osteopetrose²⁴. Essas doenças causam uma mudança no fenótipo esquelético desses pacientes.

Em um estudo de metanálise, onde foram avaliados 150 genes relacionados à osteoporose e às fraturas osteoporóticas, Richards *et al.*²⁵

avaliaram o efeito do polimorfismo (SNP), que é uma variação na sequência do DNA que afeta somente uma base nitrogenada, como adenina, timina, citosina ou guanina, de forma que essa simples variação no sequenciamento gênico poderia influenciar a DMO e o risco de fratura. Em busca de genes candidatos relacionados à osteoporose, os autores descobriram que a maioria dos SNPs dos genes previamente identificados não foram associados com a doença, entretanto, confirmaram que as variações em nove genes (*ESR1*, *LRP4*, *ITGA1*, *LRP5*, *SOST*, *SPP1*, *TNFRSF11A*, *TNFRSF11B* e *TNFSF11*) influenciam a DMO, e que variações em quatro desses genes (*SPP1*, *SOST*, *LRP5* e *TNFRSF11A*) também estavam relacionadas ao risco aumentado de fratura. Atualmente, já está bem estabelecida a tese de que diversos genes desempenham um importante papel na osteoporose, de forma que a expressão desses genes afetam a regulação do metabolismo ósseo em diferentes mecanismos, incluindo aqueles envolvidos na formação e no remodelamento ósseo, como os genes das citocinas pró-inflamatórias, exemplo a IL-1B e TNF, os genes do sistema RANK-L/OPG, os genes envolvidos na sinalização hormonal, como o gene do receptor de estrógeno tipo I (*ESR1*) e o gene do receptor de vitamina D (VDR), e aqueles que codificam as proteínas da estrutura óssea, como o gene do colágeno tipo I (*COL1A1*)^{25,26}.

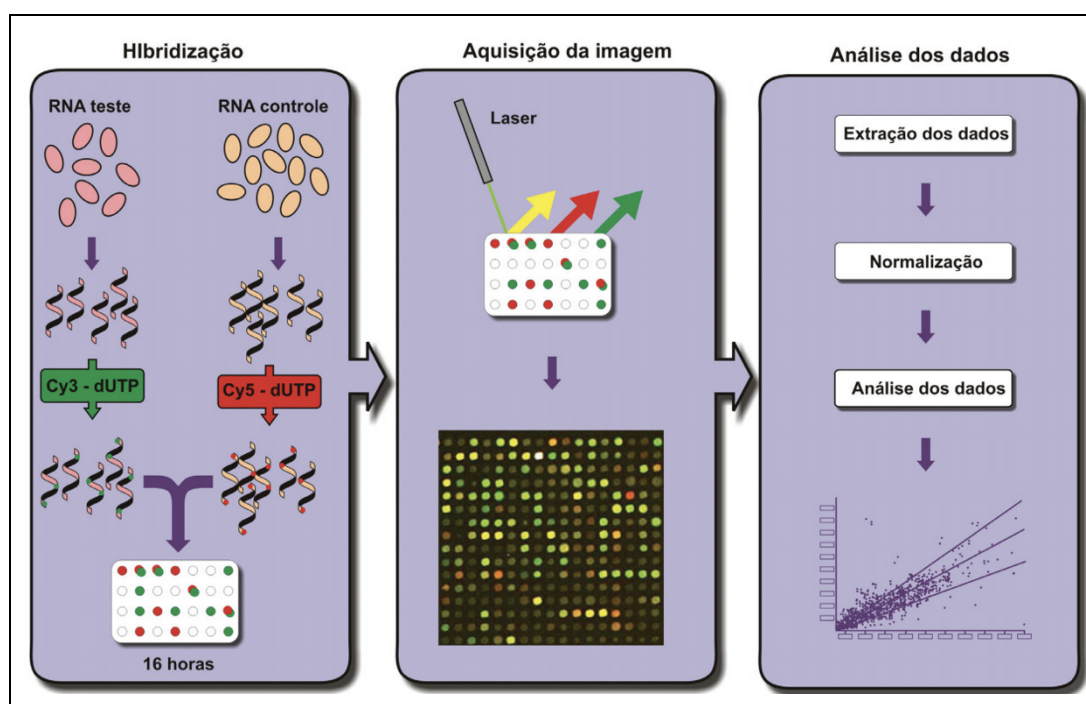
O método de investigação científica *genome-wide association studies* (GWAS) evidenciou de forma mais robusta a participação da genética na osteoporose e contribuiu para um avanço na busca de novos genes envolvidos na fisiopatologia da osteoporose. Os genes OPG, RANKL, *LRP5*,

ESR1 e *ZBTB40* foram identificados e relacionados à baixa DMO associada à fratura de baixo impacto²⁷. Outro estudo de associação do GWAS identificou 56 *loci* associados à DMO e 14 *loci* associados ao risco aumentado de fraturas óssea não específica²⁸⁻³⁰.

Estudos de expressão de RNA pelo método *microarray* ou microarranjo é uma forma já validada de avaliar a interação entre a expressão genética e os fatores ambientais que modificam a sua expressão, favorecendo a avaliação simultânea da expressão de milhares de genes em diferentes tecidos de um determinado organismo, e em diferentes estágios de desenvolvimento ou condições específicas³¹. Essa tecnologia tem sido utilizada em experimentos de genômica funcional projetados para estudar as funções moleculares. Esse método de análise da expressão gênica pode ser aplicado para estudo de caso-controle, buscando identificar os genes diferencialmente expressos (DEGs) e as vias metabólicas diferencialmente expressas através da utilização de *biochips* para análise gênica de forma quantitativa nos casos em investigação e no grupo controle. Dessa forma podemos inserir os dados encontrados na pesquisa em diversos *softwares* e utilizar a bioinformática para analisá-los de forma comparativa entre os grupos e permite também comparar com outros bancos de dados globais já cadastrados (Figura 2). Esse método de pesquisa, tem se tornado uma ferramenta importante para avanços na compreensão da patogênese de diversas doenças e manifestações clínicas, buscando novos biomarcadores e alvos moleculares para o desenvolvimento de terapias específicas^{32,33}. Em pesquisa, a expressão de RNA sérico pode ser utilizada para análise do

prognóstico das doenças, para investigação diagnóstica, em descobertas de novos alvos terapêuticos, na toxicologia, nos processos químicos moleculares e nas vias celulares biológicas relacionadas ao envelhecimento³⁴.

Até o presente momento, não existe estudo na literatura analisando as fraturas vertebrais e a expressão do RNA pela técnica do *microarray* em mulheres idosas com osteoporose.



Fonte: Colombo e Rahal (2010)[†]

Figura 2 - Esquema de hibridização e análise dos dados da expressão gênica usando a técnica do *microarray*. Etapas para produção dos dados para comparação quantitativa da expressão de RNA dos casos e controles

[†] Colombo J, Rahal P. A tecnologia de *microarray* no estudo do câncer de cabeça e pescoço. *Rev Bras Bioc.* 2010;8(1):64-72.

2 OBJETIVOS

Em mulheres idosas com fratura vertebral osteoporótica:

- a) Identificar os possíveis marcadores genéticos moleculares, através da análise da expressão de RNA:
 - Genes diferencialmente expressos.
 - Vias biológicas significativas.
- b) Validar os genes identificados.

3 MÉTODOS

3.1 População do Estudo

Nos anos de 2015 a 2016, mulheres idosas foram selecionadas a partir de um projeto epidemiológico, que incluiu uma pesquisa de base populacional (estudo São Paulo *Ageing & Health* [SPAH]). Um total de 240 indivíduos foram avaliados e as amostras de RNA foram extraídas. Desses, 92 homens foram excluídos para evitar comparação com diferentes sexos. Em relação às mulheres: 20 foram excluídas devido à baixa concentração de RNA (< 100 ng/dL), 34 excluídas por falha na hibridação dos chips de expressão, quatro excluídas devido à normalização dos dados para a bioinformática, 54 excluídas por apresentarem T-score da DMO $> -2,5$ (isto é, não tinham diagnóstico de osteoporose densitométrica) e quatro excluídas por apresentar apenas fratura vertebral de grau 1. Portanto, 36 mulheres idosas foram incluídas, com idade ≥ 65 anos, com diagnóstico de osteoporose por densitometria óssea (T-score $\leq -2,5$). Estas mulheres foram pareadas por idade em dois grupos: (a) grupo com osteoporose e Fratura Vertebral (FV, $n = 24$) e (b) grupo controle com osteoporose sem Fratura Vertebral (NVF, $n = 12$). Conforme mostrado em fluxograma do estudo (Figura 3).

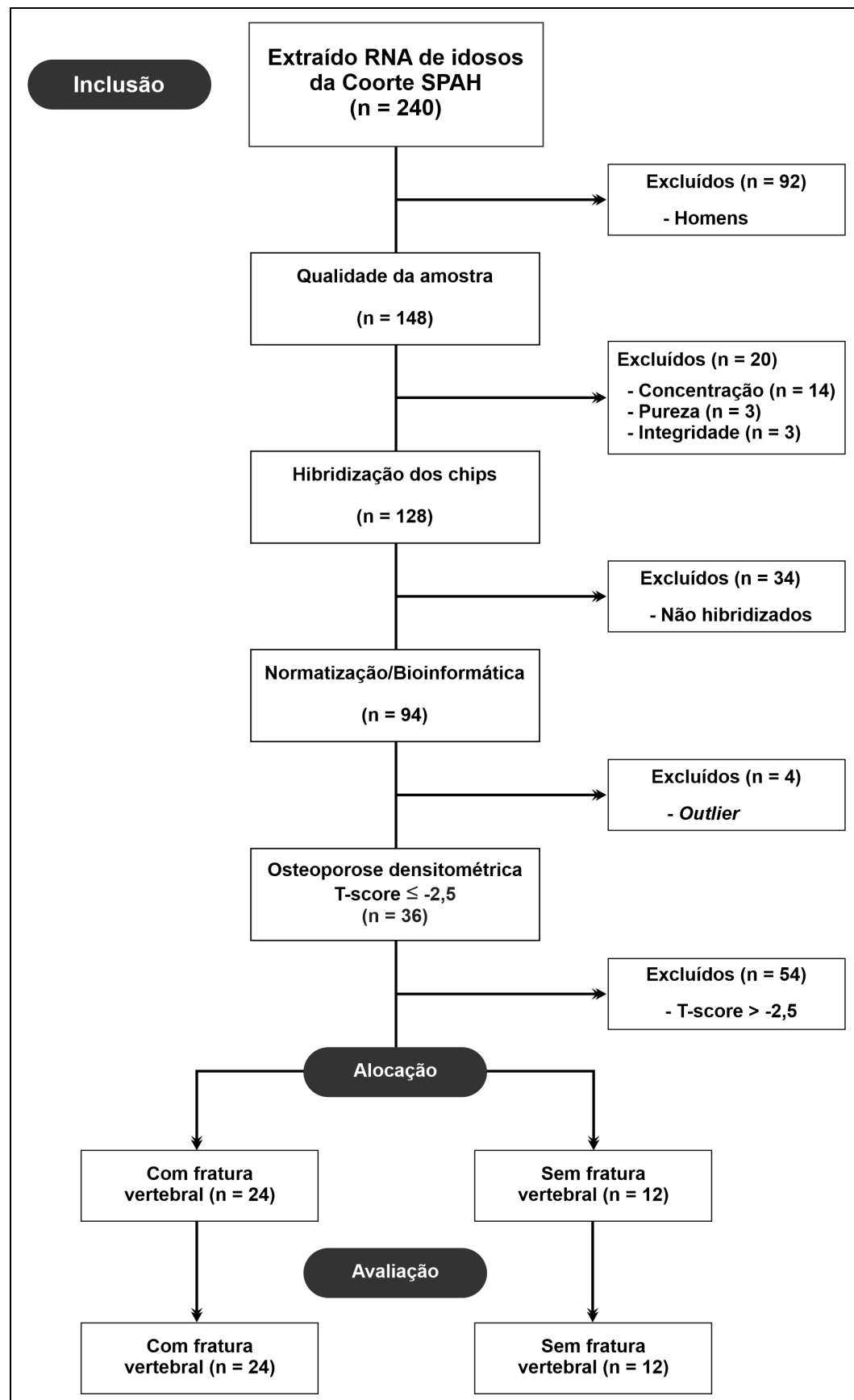


Figura 3 - Fluxograma do estudo

Todos os sujeitos responderam a um questionário padronizado sobre estilo de vida e saúde, que incluiu fraturas anteriores no último ano, história de fraturas de quadril, intensidade das atividades físicas diárias, ingestão alimentar de cálcio, idade da menopausa, uso de álcool, tabagismo, doenças associadas como eventos cardiovasculares, hipertensão arterial e diabetes *mellitus*. Nenhum indivíduo apresentava doenças crônicas graves, diarreia crônica, não mostravam evidências de má-absorção intestinal, doença hepática, câncer ou usava glicocorticoide. A absorciometria por raios X de dupla energia (DXA) foi usada para avaliar densidade e fraturas vertebrais. A raça foi considerada com base na raça autorreferida do segundo descendentes da geração, um método já usado para a população brasileira³⁵. Indivíduos com quatro avós informados como brancos foram classificados como brancos, enquanto os indivíduos com e antepassados brancos e negros (raça mista) foram classificados como não brancos. Indivíduos com antepassados asiáticos, foram classificados como raça amarela³⁵.

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq # 1904155) e todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido para participar do estudo.

3.2 Medições e Procedimentos

3.2.1 Coleta de sangue periférico e extração de RNA

As amostras de sangue foram coletadas em jejum para análise bioquímica, dos marcadores de remodelação óssea e da expressão gênica de RNA. As amostras de sangue total de 20 mL foram recolhidas em tubos *PAXgene Blood RNA*, e o RNA total foi extraído, isolado e purificado dentro de colunas *RNeasy* (Qiagen, Germantown, MD) e tratado com *RNase-Free DNase Set* (Qiagen). O RNA purificado foi verificado utilizando o sistema *Bioanalyzer* 2100 (Agilent, Santa Clara, CA) para distinguir as bandas ribossômicas 28S e 18S. As amostras com um mínimo de 100 ng/dL de RNA foram submetidas à transcrição in vitro com o kit *Ambion WT Expression (Life)* em conjunto com o kit *Affymetrix GeneChip® WT Terminal Labeling and Control*. A qualidade do RNA foi determinada com o espectrofotômetro *NanoDrop* (ND-1000, *NanoDrop, Thermo Scientific*, Wilmington, DE). As amostras marcadas foram hibridizadas com o *Transcriptome Human Array HTA 2.0* da *Affymetrix GeneChip®*. A hibridização, lavagem, coloração e varrimento foram realizados seguindo as instruções do *Affymetrix* e 67528 genes transcritos cobrindo 44.699 genes codificadores e 22.829 não codificadores foram analisados. Após controle de qualidade e avaliação dos sinais de expressão, os arquivos CEL foram submetidos a análises posteriores utilizando o *Affymetrix GCOS®*.

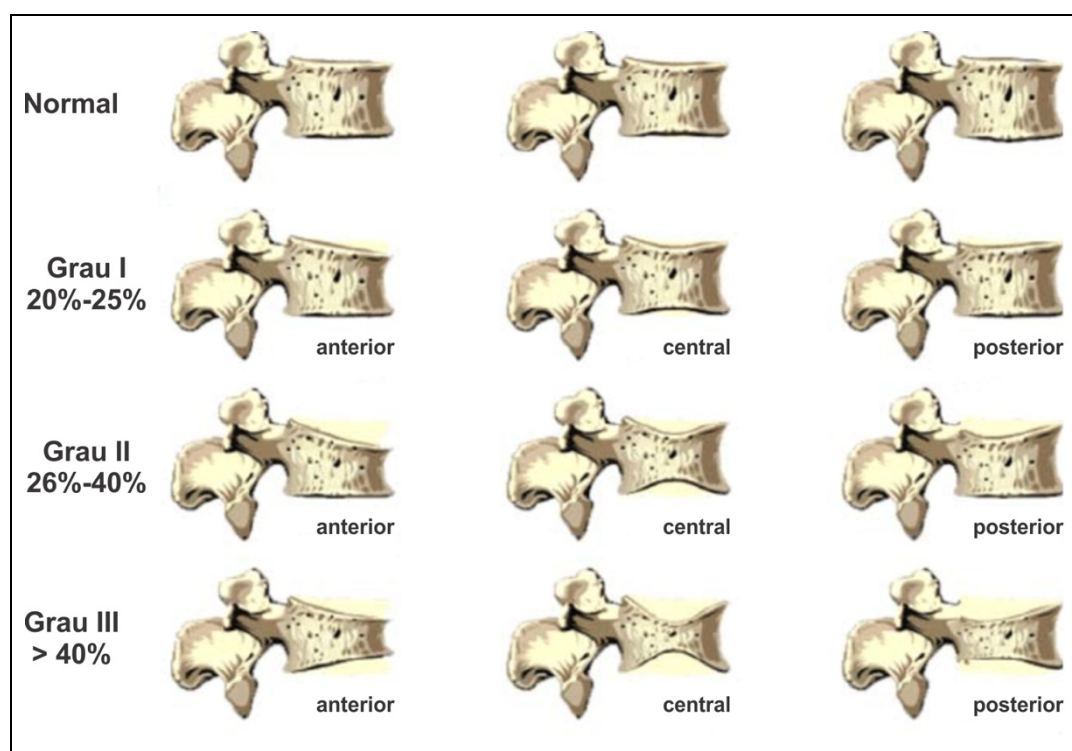
As concentrações séricas de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina foram determinadas usando métodos laboratoriais automatizados padrões. As concentrações séricas de 25-hidroxivitamina D (25OHD) e iPTH foram medidas usando a técnica de radioimunoensaio (DiaSorin, Stillwater, MN, EUA) e

método de ensaio imunorradiométrico (ELISA-PTH; CIS Bio International, Paris, França), respectivamente. Concentrações séricas de telopeptídeo C-terminal de colágeno tipo I (CTX) e propeptídeo N-terminal do procolágeno tipo I (P1NP) foram medidos pelo sistema automatizado de eletroquimioluminescência (E411, Roche Diagnostics).

3.2.2 Densidade mineral óssea e medidas semiquantitativas (SQ) para fraturas vertebrais

A DMO foi medida por DXA, utilizando um equipamento de densitometria Hologic QDR 4500A (Hologic Inc. Bedford, MA, EUA, modelo Discovery) na coluna lombar, colo do fêmur e fêmur total. Os erros de precisão para as medidas de DMO foram determinados com base nos protocolos padrão da Sociedade Internacional de Densitometria Clínica (ISCD)³⁶. A fratura vertebral prevalente foi avaliada de T4 a L4, uma varredura de VFA da coluna toracolombar realizada usando o mesmo dispositivo DXA, com os sujeitos na posição supina. Todas as medições de DXA foram realizadas pelo mesmo tecnólogo experiente (LT). Nesse mesmo dia, as radiografias da coluna torácica lateral e da coluna lombar foram realizadas usando uma distância tubo-filme de 40 polegadas centrada em T7 e L2. Todas as imagens radiográficas foram avaliadas independentemente por dois reumatologistas experientes (GHM, LHJN). Para a identificação das fraturas vertebrais, por ambos os métodos, os leitores avaliaram cada imagem das vértebras T4-L4 para decidir se havia fratura. Um consenso foi alcançado entre os leitores para qualquer diferença de interpretação.

Vértebras não visíveis foram excluídas. Apenas vértebras adequadamente visualizadas foram analisadas quanto à deformidade usando a abordagem semiquantitativa de Genant³⁷. Cada vértebra fraturada identificada foi classificada por grau com base na escala semiquantitativa de Genant, onde leve (grau 1) uma redução de 20 a 25% da média anterior e/ou altura posterior em relação aos corpos vertebrais adjacentes; moderada (grau 2) uma redução de 26 a 40% em qualquer altura; e grave (grau 3) uma redução maior de 40% em qualquer altura (Figura 4). No presente estudo, o grau I de fratura foi excluído, portanto, indivíduos com grau II ou grau III de fratura vertebral foram incluídos no grupo VF e indivíduos sem nenhuma deformidade vertebral foram incluídos no grupo NVF.



Fonte: Adaptado de: Guglielmi *et al.*, 2008³

Figura 4 - Classificação semiquantitativa da fratura vertebral (Genant)

³ Guglielmi G, Diacinti D, van Kuijk C, et al. Vertebral morphometry: current methods and recent advances. *Eur Radiol.* 2008;18(7):1484-96.

3.2.3 Análise de expressão de genes por *microarray*

Os dados de expressão foram pré-processados em R com pacotes *affy* e *multtest* da Bioconductor³⁸. O controle de qualidade de matrizes individuais incluiu várias métricas de qualidade avançadas, diagramas de diagnósticos e pseudoimagens para certificar que apenas matrizes de excelente qualidade foram usadas antes da análise estatística. O algoritmo de média robusta da matriz foi usado para correção de background, normalização de quantil e resumo de polimento mediano³⁹.

As sondas com razão $\log_2 \geq 1$ ou razão $\log_2 \leq -1$ e $p < 0,01$ foram definidas como genes diferencialmente expressos (*DEGs*) e após sua identificação, foi realizada uma análise de enriquecimento das vias adicionais. Utilizamos o modelo logístico levando em consideração as variáveis binárias osteoporose e fratura vertebral.

3.2.4 Análise de enriquecimento por bioinformática

Em etapas adicionais da análise, os *DEGs* (genes com alterações na regressão logística) foram carregados no *software Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) (*Ingenuity Systems, Redwood City, CA*) para identificar a via de expressão diferencialmente relevante. As categorias diferencialmente expressas foram traduzidas para aquelas que diferem entre o grupo com fratura vertebral por osteoporose e o grupo com osteoporose sem fratura vertebral. Nessa abordagem, redução de expressão reflete uma associação protetora do risco de fratura vertebral, enquanto o aumento da expressão reflete uma associação com um maior risco de fraturas vertebral.

A análise de *Gene Ontology* (GO) e a análise de enriquecimento da via são comumente usadas para estudos funcionais de dados transcriptômicos ou genômicos de larga escala⁴⁰. Realizamos essas análises usando *DEGs* com expressão aumentada e reduzida, com $p < 0,01$. O mapeamento funcional de banco de dados e a anotação de estudos de associação genômica ampla (FUMA GWA, <http://fuma.ctglab.nl>) fornecem um conjunto de ferramentas de mineração de dados e auxiliam na interpretação de conjuntos de dados em escala genômica ao acelerar a transição dos dados coletados para uma anotação biológica⁴¹. Nesse estudo, para melhor compreender a relevância funcional dos *DEGs* identificados, o FUMA GWAS foi usado para procurar a representação em termos GO em processos biológicos (BP), componentes celulares (CC), funções moleculares (MF), suas vias biológicas e os conjuntos de genes. Os termos GO com $p \leq 0,05$ foram definidos como estatisticamente significativos com base em um teste hipergeométrico dessa plataforma *online*. As marcas são geradas por uma abordagem híbrida que combina um procedimento computacional automatizado com uma curadoria manual especializada. A metodologia computacional identifica sobreposições de conjuntos de genes e gera representantes coerentes das mesmas. As marcas registradas resumem informações em múltiplos conjuntos de genes enfatizando os genes que exibem a expressão coordenada e representam processos biológicos bem definidos, reduzindo assim a variação e a redundância, e proporcionando um melhor espaço biológico delineado para a análise⁴¹.

3.2.5 Validação dos transcritos identificados pela bioinformática por qPCR-RT (PCR quantitativo em tempo real)

O DNA complementar (DNAc) foi sintetizado a partir de 100 *ng* de RNA, utilizando o kit da transcriptase reversa de DNAc (Applied Biosystems) e foi utilizado o termociclador PTC-100 (MJ Research) para a síntese de DNAc. A PCR quantitativa foi realizada por fluorescência, usando o *Green Master Mix PowerUp™ SYBR™* (Thermo Fisher Scientific), essa mistura contém Taq DNA Polimerase recombinante, MgCl₂, dNTPs e *SYBR Green*.

Os *primers* de PCR para os genes testados foram projetados com base em sua localização exômica de sondas de *microarrays*. Os *primers* foram projetados usando *primer3*^{42,43}, ferramentas *on-line OligoCalc*^{42,43}, *OligoAnalyzer*⁴⁴ e *Primer-BLAST*⁴⁵. As sequências dos *primers* estão no Quadro 1.

Quadro 1 - Lista dos *primers* para a validação pelo método PCR em tempo real

Gene	Transcrito	Direção	Sequência do <i>Primer</i>	Tamanho Do produto
UBXN6	ENST00000301281.10	FW	ACGTTCAACAAAGACCAGGA	154
		RV	TCCCTTCCAGGCAGTTAATG	
PNO1	ENST00000263657	FW	TTATTCTCGGCTTTCAGGTG	187
		RV	ATCCTTGTCCGTGTCACATT	
CD248	ENST00000311330	FW	GGTGGCTTCGAGTGTTATTG	151
		RV	CCTCGTCTTCATCTTCCTCA	
TNXB	X71927.1	FW	AGATTCACTGCACCTCTCCT	181
		RV	GTTGCAATTCCAAACAGAGT	
TRAF3IP2	ENST00000340026.10	FW	CACCCTGTGCAGAAGGTTAT	124
		RV	GTGGCTGGTGATGTGGCTG	
ITGA6	ENST00000264107	FW	GGAGATTGGAGCTTTTGTGAT	258
		RV	GTTAGCAGGAACAGGAACGA	
PRDX5	ENST00000265462.8	FW	TAGATGATTGCTGGTGTCC	103
		RV	CCATCTGGTTCCACATTCAG	
RPL27	NM_000988.5	FW	GCAAGAAGAAGATCGCCAAG	236
		RV	AAACCGCAGTTTCTGGAAGA	
GAPDH	NM_002046.7	FW	GAGTCAACGGATTTGGTCGTA	141
		RV	CATGGGTGGAATCATATTGGA	
RPL6	NM_001320139.1	FW	ATGCCTAGATATTATCCTACTGA	204
		RV	CAGAGGTCCAGTCACAAGTAA	
SNTG2	ENST00000308624.9	FW	TCTTCAAGATTTTGACTTTGAG	217
		RV	GAAATCCACCGTGAAACACA	

O *Green Master Mix*, *Primers* e o DNAC foram inseridos no ciclador *StepOne Plus qPCR (Applied Biosystems)*, nas seguintes etapas: 95°C por 2 minutos e 40 ciclos com repetições de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos, seguidas da etapa de dissociação de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras foram testadas em triplicatas.

Para validar as mudanças na expressão gênica, foi usado o método Pfaff para quantificação da expressão relativa⁴⁶. A média geométrica dos dois genes *housekeeping* mais estáveis de acordo com os *microarrays* (RPL27, GAPDH) foi usada para comparar a expressão gênica entre os grupos^{47,48}. Os valores de p foram calculados usando teste t não pareado e intervalos de confiança de 95% foram calculados em R assumindo variâncias desiguais.

4 RESULTADOS

4.1 Características da população estudada

Trinta e seis mulheres com osteoporose foram selecionadas, 24 apresentaram fratura vertebral (FV) e 12 sem fratura vertebral (FVN). Comparando os dois grupos (VF vs. NVF) não foi observada diferença em relação à DMO da coluna lombar, do colo femoral e do fêmur total, frequência de doenças crônicas, hábitos de vida como tabagismo, alcoolismo, atividade física e número de quedas. Com relação aos marcadores bioquímicos e de remodelação óssea (cálcio, fósforo, PTH, fosfatase alcalina, 25 hidroxivitamina D, P1NP e CTX) não foram encontradas diferenças entre os dois grupos. A Tabela 1 apresenta as características dos participantes.

Tabela 1 - Características clínicas, bioquímicas e densitométricas dos participantes

Variáveis	Fratura Vertebral	Sem fratura vertebral	P
Tamanho da amostra	(n=24)	(n=12)	
Idade, anos (DP)	81,46 (4)	81,4 (3,1)	1
Raça			0,10
Branca, n (%)	7 (29,2%)	7 (58,3%)	
Não Branca, n (%)	14 (58,3%)	5 (41,7%)	
Amarela, n (%)	3 (12,5%)	0 (0%)	
Altura, cm (DP)	147,4 (5,9)	146 (3,1)	0,37
Peso, kg (DP)	61,1 (11,8)	57,2 (10,4)	0,34
IMC, kg/m² (DP)	28,1 (5,2)	26,8 (4,6)	0,47
Álcool (≥3U/dia), (%)	4 (16,7%)	2 (16,7%)	1
Tabagismo ou ex-tabagismo, n (%)	3 (12,5%)	1 (8,3%)	1
Atividade física			0,77
Baixa intensidade, n (%)	5 (20,8%)	3 (25%)	
Moderada intensidade, n (%)	15 (62,5%)	8 (66,7%)	
Elevada intensidade, n (%)	4 (16,7%)	1 (8,3%)	
Queda (≥1/ano), %	5 (20,8%)	3 (25%)	1
História familiar de osteoporose			0,38
Não, n (%)	15 (62,5%)	10 (83,3%)	
Sim, n (%)	3 (12,5%)	1 (8,3%)	
Desconhece, n (%)	6 (25%)	1 (8,3%)	
História familiar de fratura			0,19
Não, n (%)	16 (66,7%)	11 (91,7%)	
Sim, n (%)	1 (4,2%)	0 (0%)	
Desconhece, n (%)	7 (29,2%)	1 (8,3%)	
Diabetes, n (%)	3 (12,5%)	3 (25%)	0,378
Hipertensão, n (%)	19 (79,2%)	11 (91,7%)	0,64
IAM, n (%)	3 (12,5%)	1 (8,3%)	1
AVC, n (%)	2 (8,3%)	0 (0%)	0,54
Dislipidemia, n (%)	11 (45,8%)	7 (58,3%)	0,48
Uso de suplementar de cálcio, n (%)	10 (41,7%)	6 (50%)	0,63
Uso de suplementar de vitamina D, n (%)	15 (62,5%)	6 (50%)	0,47
Uso de bisfosfonatos, n (%)	11 (45,8%)	5 (41,7%)	0,81
Creatinina, mg/dL (IC)	0,8 (0,73 - 1,09)	0,79 (0,62 - 0,89)	0,47
Cálcio total, mg/dL (IC)	9,6 (9,5 - 9,8)	9,6 (9,3 - 9,98)	0,85
Fósforo total, mg/dL (IC)	3,6 (3,2 - 3,78)	3,5 (3,15 - 3,68)	0,48
Fosfatase alcalina, U/L (IC)	81 (61,75 - 94,25)	68,5 (62,25 - 86,75)	0,56
Vitamina D sérica (25-OH), ng/mL (DP)	23,5 (6,8)	19 (9)	0,10
iPTH, pg/dL, (DP)	57,3 (22,3)	60,1 (14,3)	0,70
CTX, ng/mL, (DP)	0,27 (0,16)	0,33 (0,19)	0,30
P1NP, ng/mL (IC)	36,65 (17,95 - 48,55)	38,75 (22,9 - 58,83)	0,50
DMO da coluna lombar, g/cm² (DP)	0,770 (0,11)	0,770 (0,15)	0,96
Coluna lombar, T-escore (DP)	-2,89 (1,08)	-2,79 (1,05)	0,80
DMO do fêmur total, g/cm² (DP)	0,710 (0,11)	0,700 (0,08)	0,87
Fêmur total, T-escore (DP)	-2,13 (0,81)	-2,02 (0,62)	0,70
DMO do colo do fêmur, g/cm² (DP)	0,570 (0,10)	0,590 (0,06)	0,66
Colo do fêmur, T-escore (DP)	-2,60 (0,74)	-2,42 (0,57)	0,48

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi usado para avaliar a distribuição normal. Os valores de p foram usados para comparação de médias (Teste T de Student ou Teste de Mann-Whitney) ou proporção (Teste de chi-quadrado, Teste de Fisher ou teste de verossimilhança). p < 0,05 foram considerados significativos.

iPTH = Hormônio da paratireoide intacto. 25OHD = 25-hydroxivitamina D. DMO = Densidade Mineral Óssea. IMC = Índice de Massa Corpórea.

4.2 Identificação de Fraturas Vertebrais

As fraturas vertebrais foram detectadas usando os critérios *Vertebral Fracture Assessment* (VFA) - método Genant. Segundo essa classificação as fraturas vertebrais grau II foram detectadas em 20 (83%) mulheres e grau III em 4 (17%) mulheres, de um total de 24 mulheres com fratura vertebral. O local mais comum onde foram encontradas as fraturas foi na região torácica (72%), e a coluna lombar apresentou 28%. Conforme o tipo de fratura, a forma bicôncava estava presente em 49% das fraturas e em 51% na forma de cunha. Nenhum paciente apresentou fratura em forma de esmagamento. Em relação aos números de fraturas por paciente, foi encontrado que 92% dos pacientes apresentavam mais de uma fratura, sendo 50% com duas fraturas. Os Gráficos de 1 a 4 mostram as características das fraturas: número, local, grau de gravidade e tipo de deformidade.

Gráfico 1 - Fratura de vértebra por paciente (número/paciente)

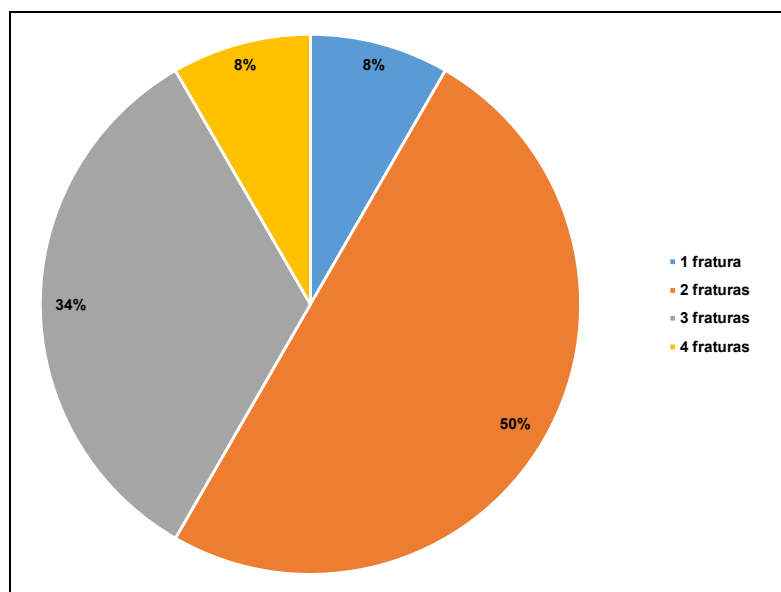


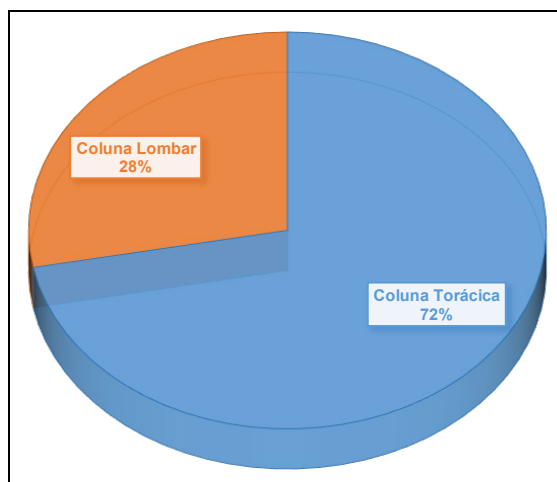
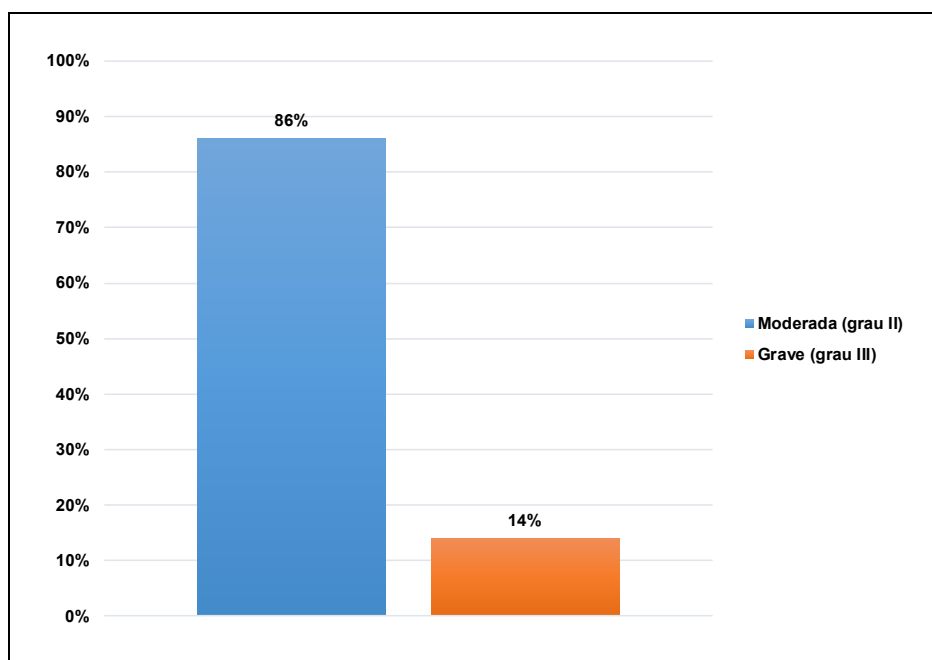
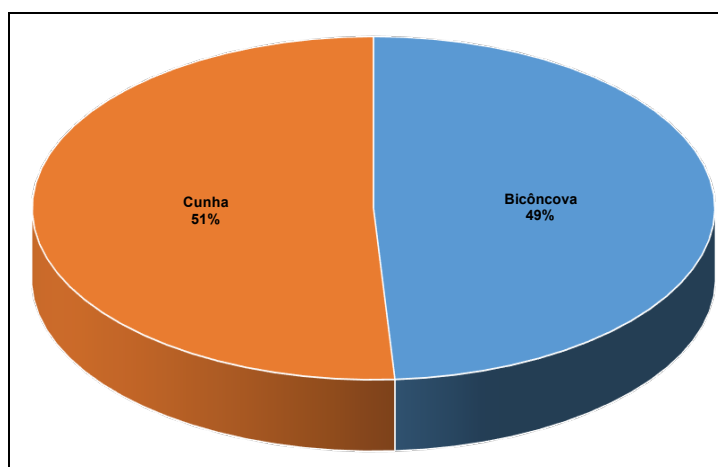
Gráfico 2 - Locais da fratura (coluna vertebral)**Gráfico 3 - Gravidade da fratura vertebral (Genant)**

Gráfico 4 - Tipo da fratura vertebral (Deformidade)

4.3 Análise *DEGs*

Um total de 142 *DEGs* foram identificados ($p \leq 0,01$), comparando os grupos VF com NVF, 57 *DEGs* com expressão aumentada e 85 *DEGs* com expressão reduzida no grupo com FV (Gráfico 5). Os 10 melhores *DEGs* superexpressos e subexpressos são identificados na Tabela 2. A expressão de *SNTG2* apresentou o maior β de associação ($\beta = +31,88$, $p = 0,004$), indicando um risco maior de fratura para esse nível de expressão. Por outro lado, como fator de proteção, o gene Rho GTPase ativando a proteína 8 ($\beta = -19,35$, $p = 0,005$) foi encontrado como o transcrito mais subexpresso. Além disso, genes *LCN1*, *ITGA6* e *TNXB* também foram encontrados superexpressos em mulheres com fraturas vertebrais. Diferentemente, o transcrito *PLTP* foi encontrado subexpresso em mulheres com fraturas vertebrais.

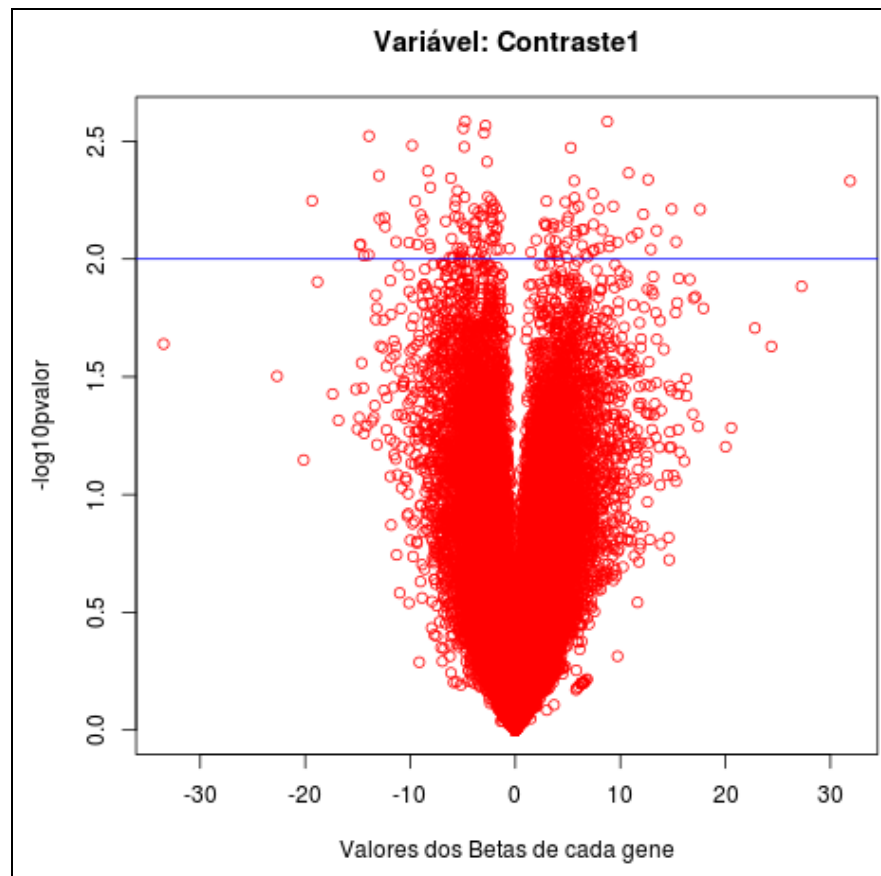
Gráfico 5 - Gráfico vulcano dos genes expressos

Tabela 2 - TOP 10 *DEGs* Superexpressos e subexpressos

Genes	(β)	Regulação	P
<i>SNTG2</i>	31,88	Superexpresso	0,004
<i>PWRN1</i>	17,6	Superexpresso	0,006
<i>KRTAP19-1</i>	15,31	Superexpresso	0,008
<i>LCN1</i>	14,89	Superexpresso	0,006
<i>ENPP2</i>	13,45	Superexpresso	0,007
<i>CYSRT1</i>	12,91	Superexpresso	0,009
<i>CD248</i>	12,64	Superexpresso	0,004
<i>TRAF3IP2</i>	12,18	Superexpresso	0,006
<i>PNO1</i>	11,66	Superexpresso	0,007
<i>GP5</i>	11,09	Superexpresso	0,008
<i>ARHGAP8/PRR5-ARHGAP8</i>	-19,35	Subexpresso	0,005
<i>MLST8</i>	-14,8	Subexpresso	0,008
<i>PLTP</i>	-14,73	Subexpresso	0,008
<i>SYDE1</i>	-14,41	Subexpresso	0,009
<i>GPLD1</i>	-13,96	Subexpresso	0,009
<i>ZNF653</i>	-12,91	Subexpresso	0,003
<i>DPCD</i>	-12,45	Subexpresso	0,004
<i>STK16</i>	-12,39	Subexpresso	0,006
<i>A4GNT</i>	-11,35	Subexpresso	0,006
<i>ECSIT</i>	-9,52	Subexpresso	0,007

No enriquecimento funcional dos *DEGs*, a via de sinalização de mTOR1 foi encontrada significativamente usando conjuntos de genes marcantes (P ajustado = 0,03) sob a influência dos genes *PNO1* e *PDK1*. A análise do enriquecimento por via Wiki também foi conduzida, e a mais significativamente enriquecida foi a via de adesão focal (p ajustada = 0,03) influenciada pelos genes *ITGA6* e *TNXB*. A análise das vias canônicas mostrou interação significativa com as vias do receptor da matriz extra-

celular, via da transdução do sabor e a via da linhagem de células hematopoiéticas, quando comparado com a base de dados genético japonês (KEGG), enriquecida com os genes *ITGA6*, *GP5*, *TNXB*, *TAS2R60* e *TAS2R41*.

A comparação da base de dados GO também foi conduzida e várias funções com resultados significativos foram encontrados. A via do processo biológico da regulação do metabolismo do fósforo foi encontrada significativamente mais expressa no grupo com fratura vertebral, com 6 genes transcritos *WNK1*, *ITGA6*, *PKD1*, *PLCL1*, *TNXB* e *ENPP2*. Outra via que também mostrou um resultado com ≥ 5 genes transcritos envolvidos foi a via da função molecular do receptor ligante, participando desta via os seguintes genes: *SNTG2*, *ITGA6*, *PLCL1*, *TNXB* e *TRAF3IP2*.

Foram encontrados cinco dos top 10 genes mais expressos nas vias metabólicas significativas durante o enriquecimento: *SNTG2*, *TRAF3IP2*, *GP5*, *LCN1* e *PNO1*.

Os resultados do enriquecimento gênico são mostrados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Análise do enriquecimento das vias biológicas dos genes diferencialmente expressos

GENESET HALLMARK	N	p	p-AJUSTADO	GENES
SINALIZANTE DO MTOR1	2	6,02e-4	2,95e-2	<i>PNO1, PDK1</i>
ADESÃO FOCAL	2	5,19e-4	2,59e-2	<i>ITGA6, TNXB</i>
KEGG DATA BASE: RECEPTOR DA MATRIZ EXTRA CELULAR	3	7,01e-7	9,31e-4	<i>ITGA6, GP5, TNXB</i>
KEGG DATA BASE: TRANSDUÇÃO DO PALADAR	2	1,04e-5	6,8e-3	<i>TAS2R60, TAS2R41</i>
KEGG DATA BASE: CÉLULAS DA LINHAGEM HEMATOPOIÉTICA	2	4,83e-5	1,07e-2	<i>ITGA6, GP5</i>

Tabela 4 - Análise do enriquecimento *Gene Ontology* (GO) dos genes diferencialmente expressos entre mulheres idosas com osteoporose e fratura vertebral (Grupo FV) e osteoporose sem fratura vertebral (Grupo controle)

<i>GeneSet</i> GO Processo biológico	<i>n</i>	<i>p</i>	<i>p-Ajustado</i>	<i>Genes</i>
Percepção sensorial do gosto	3	2,64e-7	1,23e-2	TAS2R60, TAS2R41, LCN1
Deteção de estímulos químicos envolvidos nas percepções sensoriais do paladar	2	7,09e-6	1,65e-2	TAS2R60, TAS2R41
Adesão da matriz celular	2	1,31e-4	2,21e-2	ITGA6, TNXB
Processo metabólico de glicerolípidos	3	2,05e-4	2,64e-2	SERINC5, TNXB, ENPP2
Regulação do processo metabólico do fósforo	6	2,82e-4	3,15e-2	WNK1, ITGA6, PDK1, PLCL1, TNXB, ENPP2
Adesão ao substrato celular	2	3,38e-4	3,64e-2	ITGA6, TNXB
Desmontagem de organelas	2	4,80e-4	4,29e-2	PDK1, FAM134B
Matriz extracelular proteica	4	1,02e-5	5,92e-3	CD248, FBLN7, ITGA6, TNXB
Matriz extracelular	4	2,38e-5	6,95e-3	CD248, FBLN7, ITGA6, TNXB
Componente da matriz extracelular	2	1,52e-4	1,61e-2	ITGA6, TNXB
Junção de substrato celular	3	3,13e-4	2,01e-2	RPS29, FBLN7, ITGA6
Junção de ancoragem	3	6,78e-4	3,04e-2	RPS29, FBLN7, ITGA6
Atividade do receptor de sabor amargo	2	1,02e-6	1,49e-4	TAS2R60, TAS2R41
Atividade do receptor de sabor	2	2,05e-6	1,49e-4	TAS2R60, TAS2R41
Atividade de diéster fosfórico hidrolase	2	5,73e-5	1,05e-2	PLCL1, ENPP2
Atividade fosfolipase	2	6,52e-5	1,05e-2	PLCL1, ENPP2
Ligante de carboidratos	3	7,81e-5	1,05e-2	CD248, LGALS14, ENPP2
Ligante de integrina	2	9,06e-5	1,05e-2	ITGA6, TNXB

Continua

				Conclusão
GeneSet	n	p	p-ajustado	Genes
GO Processo biológico				
Atividade da lipase	2	1,25e-4	1,05e-2	PLCL1, ENPP2
Ligante de heparina	2	2,97e-4	1,88e-2	FBLN7, TNXB
Ligante da molécula de adesão celular	2	4,08e-4	2,47e-2	ITGA6, TNXB
Ligante de glicosaminoglicano	2	6,47e-4	2,97e-2	FBLN7, TNXB
Ligante do composto de enxofre	2	9,49e-4	3,67e-2	FBLN7, TNXB
Ligante do receptor	5	1,14e-3	4,07e-2	SNTG2, ITGA6, PLCL1, TNXB, TRAF3IP2

4.4 Análise da interação gênica

A rede de interação construída para todos os genes DEG mostrou enriquecimento significativo de interações entre os genes analisados (enriquecimento PPI, $p = 0,001$). Entre os DEGs em interação, observamos enriquecimento funcional especialmente significativo (p FDR corrigido $< 0,05$) em uma rede contendo oito genes desregulados. Esse enriquecimento foi observado para sinalização de ubiquitina parcialmente sobreposta (*UBXN6*, *CDC34*, *UBE2M*), sistema imunológico adaptativo (*CDC34*, *UBE2M*, *PRR5*) e processamento de antígenos (*CDC34*, *UBE2M*). Outros processos enriquecidos associados à DEGs interagiram com as funções de redoxina (*PRDX5*, *PRDX2*) e a ligação com a matriz extracelular (*ITGA6*, *CD248*). Todos os genes associados a esses processos também mostraram expressão no tecido muscular. *PRDX5* e *UBE2M* também mostraram expressão no tecido ósseo de acordo com *StringApp Software*. A Figura 5 mostra a interação gênica dos DEGs.

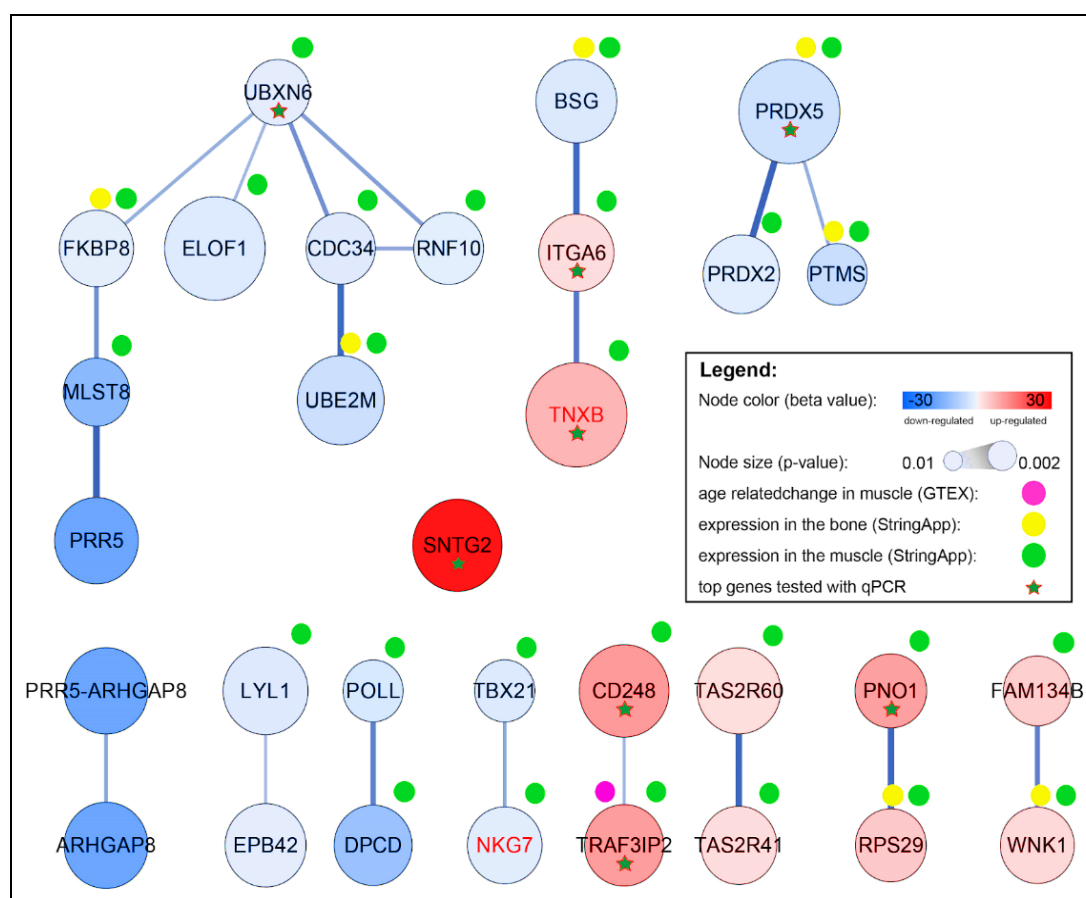


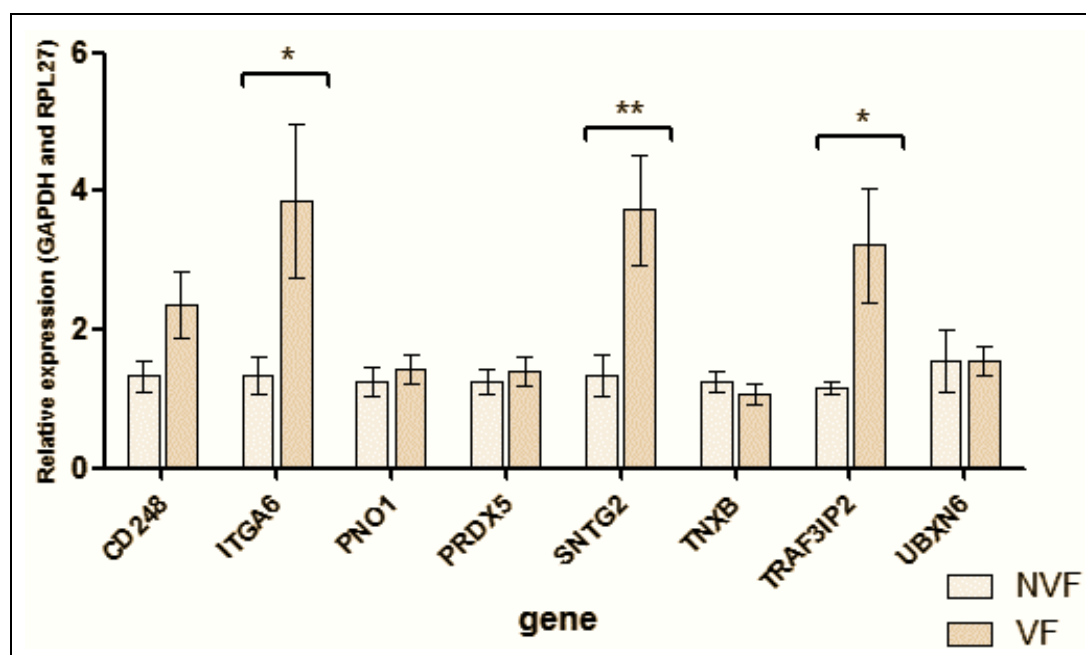
Figura 5 - Interação gênica (Gene-Gene dos DEGs)

4.5 Validação da expressão dos genes indicados pelo *microarray* usando PCR quantitativo em tempo real

Devido à técnica do *microarray* apresentar uma sensibilidade elevada e poder levar ao erro tipo II (falso positivo), utilizamos das análises da bioinformática para selecionar os genes candidatos, e posteriormente fazemos a validação por outro método de expressão gênica, o padrão ouro é o PCR quantitativo em tempo real. Portanto, selecionamos oito *DEGs* observando os seguintes critérios: maiores β , principais vias metabólicas no enriquecimento gênico e interação gênica. Analisamos seis mRNAs hiperexpressos (*SNTG2*, *TRAF3IP2*, *PNO1*, *CD248*, *TNXB*, *ITGA6*) e dois mRNAs subexpressos (*PRDX5* e *UBXN6*).

Para determinar os níveis de expressão desses genes, realizamos qPCR-RT (VF: n = 19, Controle: n = 12). Seis *DEGs* (*SNTG2*; *CD248*; *TRAF3IP2*; *PNO1*; *ITGA6*; *UBXN6*) mostraram direção da regulação da expressão gênica consistente com os resultados do *microarray*. Três deles; *SNTG2*, *ITGA6* e *TRAF3IP2* mostraram alterações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) na expressão na análise de qPCR-RT. O transcrito *CD248* mostrou pequena diferença em relação à significância ($p = 0,06$). As alterações de expressão dos dois genes DEG (*PRDX5*, *TNXB*) não foram significativas. Os resultados da análise de qPCR são mostrados no Gráfico 6 e na Tabela 5.

Gráfico 6 - Validação dos genes por PCR em tempo real



* $p < 0,05$ (estatisticamente significativo), Genes validados: *ITGA6*, *SNTG2*, *TRAF3IP2*.

Tabela 5 - Resumo dos resultados dos genes selecionados para validação

Gene	Top 10: Super expresso	Top 10: Sub Expresso	Interação Gênica (Cytoscape and String App)	Expressão em músculo (GTEX)	Expressão em osso (GTEX)	Enriquecimento (FUMA)	Envelhecimento (GTEX)	qPCR RQ= fold change comparado com o calibrador (RQ SEM)	p
CD248	Sim	-	Sim	Sim	-	-	-	1,78 (0,52)*	0,059
ITGA6	-	-	Sim	Sim	-	Sim	-	2,86 (1,14)*	0,038*
PNO1	Sim	-	Sim	Sim	-	-	-	1,12 (0,30)*	0,622
PRDX5	-	Sim	Sim	Sim	-	-	-	1,14 (0,27)	0,537
SNTG2	Sim	-	-	-	-	Sim	-	2,79 (0,86)*	0,009*
TNXB	-	-	Sim	Sim	-	Sim	-	0,86 (0,21)	0,414
TRAF3/P2	Sim	-	Sim	Sim	-	Sim	Sim	2,79 (0,83)*	0,020*
UBXN6	-	Sim	Sim	Sim	Sim	-	-	0,99 (0,49)*	0,981

*Confirmação da análise do *microarray*. P<0,05.

4.6 Curva ROC do PCR em tempo real dos genes validados

Para avaliar o potencial dos genes validados como um biomarcador, foram analisadas as sensibilidades e a especificidades desses genes associados a fratura vertebral osteoporótica. Nesse estudo foi encontrada uma área estatisticamente significativa sob a curva (AUC) para todos os três genes validados (*ITGA* = 0,68, $p = 0,05$, *SNTG2* = 0,71, $p = 0,01$ e *TRAF3IP2* = 0,71, $p = 0,01$). Após avaliação da AUC, procuramos encontrar o melhor ponto de corte do valor de expressão gênica pelo método PCR em tempo real e seus valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo para os genes validados. A expressão para o melhor ponto de corte do *ITGA6* foi 1,4026, sensibilidade = 70%, especificidade = 67%, valor preditivo positivo = 80%, valor preditivo negativo = 67%. O ponto de corte de expressão para o gene *SNTG2* foi 2,0563, sensibilidade = 56%, especificidade = 92%, valor preditivo positivo = 52%, valor preditivo negativo = 93% e para o gene *TRAF3IP2* o melhor ponto de corte de expressão foi 1,8615, sensibilidade = 52%, especificidade = 100%, valor preditivo positivo = 52%, valor preditivo negativo = 100%. Esses resultados são mostrados nos Gráficos de 7 a 9.

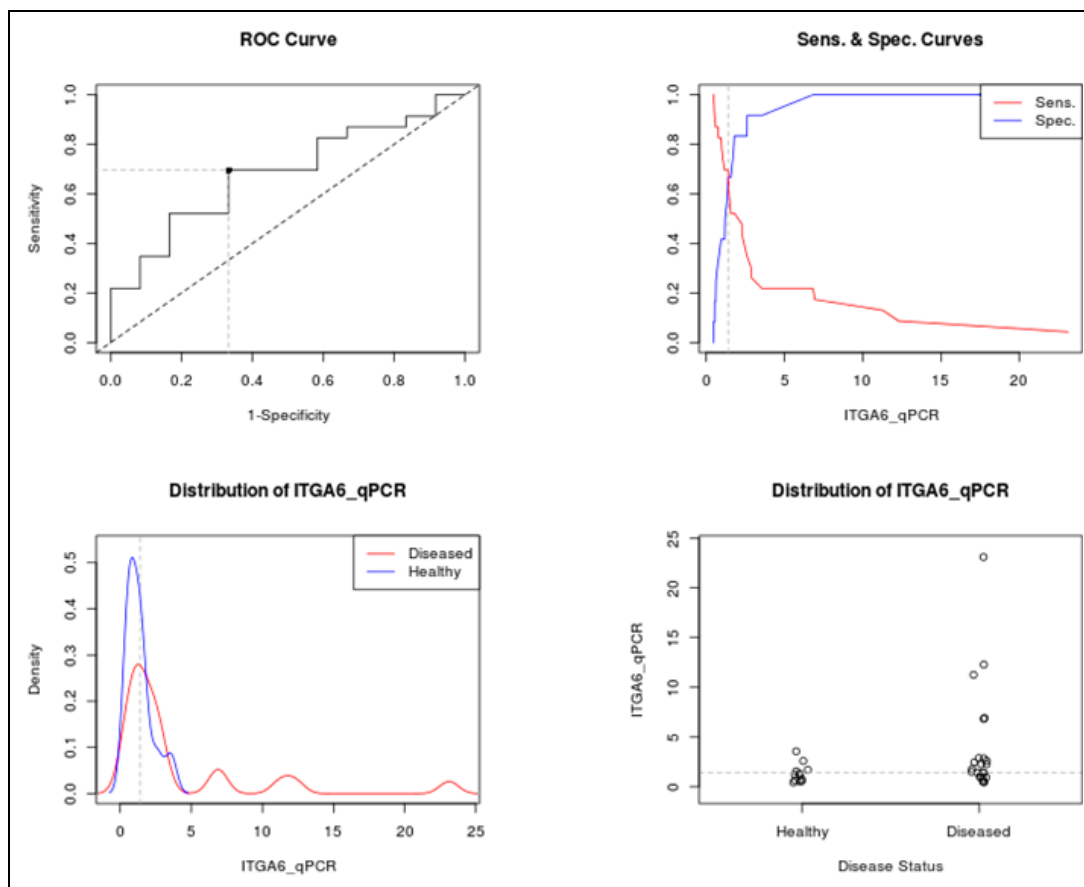
Gráfico 7 - Curva ROC do gene validado ITGA6

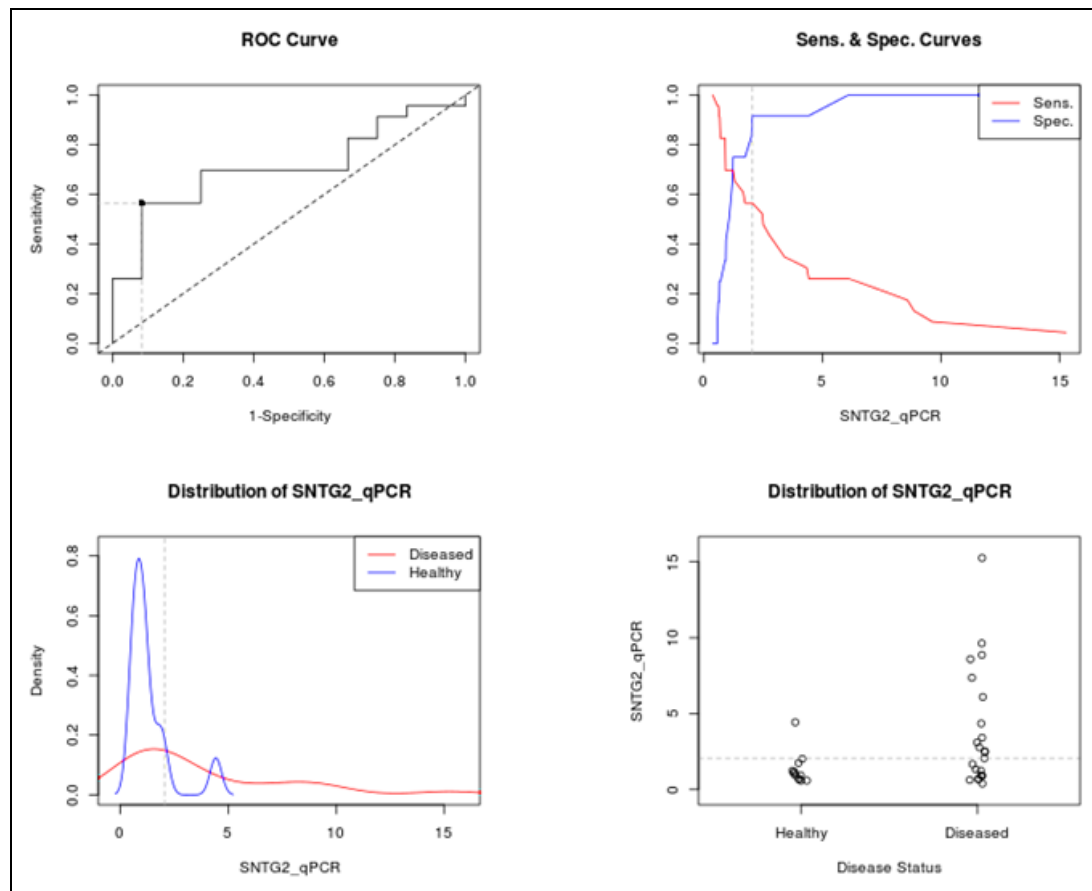
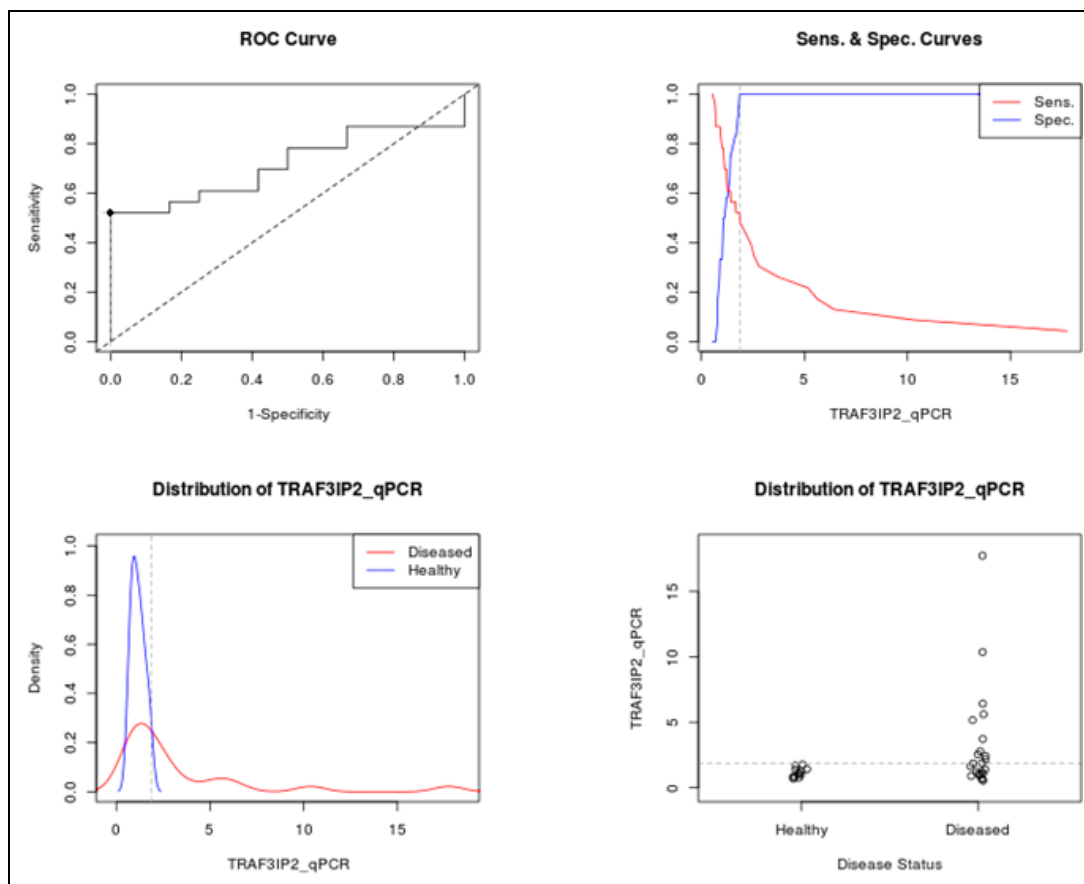
Gráfico 8 - Curva ROC do gene validado SNTG2

Gráfico 9 - Curva ROC do gene validado TRAF3IP2

5 DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou pela primeira vez a superexpressão dos genes transcritos relacionados às fraturas vertebrais em mulheres idosas com osteoporose. Demonstramos que a superexpressão do *SNTG2* se correlaciona fortemente com a predisposição para a fratura vertebral. O *SNTG2* pertence à família das sintrofinas, que é altamente expressa no sistema músculo-esquelético⁴⁹. As sintrofinas são proteínas da membrana periférica citoplasmática que se ligam aos componentes dos canais de sódio mecanossensíveis e ao domínio extremo do terminal carboxil da distrofina e proteínas relacionadas à distrofina. O *SNTG2* está especialmente presente na junção neuromuscular⁵⁰. A interação da musculatura paraespinal com a coluna vertebral, podendo gerar fraqueza muscular e fraturas compressivas espontâneas já foram relatados, chegando a atingir 30% em pacientes com osteoporose grave⁵¹. Nossos dados reforçam a hipótese da potencial interação entre o sistema muscular e ósseo na gênese das fraturas vertebrais osteoporóticas.

Os transcritos de *TRAF3IP2*, *ITGA6* e *CD248* também apresentaram uma elevada expressão gênica. O *TRAF3IP2* interage com o fator 3 associado ao receptor de TNF e é um importante regulador da produção de citocinas e interferons do tipo I⁵². O TRAF3 desempenha um papel em várias doenças autoimunes e inflamatórias^{52,53}. Além disso, o *TRAF3IP2* também está envolvido na regulação da formação de osteoclastos induzidos por RANKL⁵⁴. O

TRAF3IP2 também mostrou expressão aumentada no tecido muscular e com o processo de envelhecimento, de acordo com o banco de dados do GTEx, que merece a atenção da sua provável importância no envelhecimento ósseo e implicações na fisiopatologia das fraturas vertebrais. A análise da rede de interação mostrou que o *TRAF3IP2* interage com o *CD248* (Endosialina), que foi regulado positivamente, cuja expressão também testamos com qPCR com *fold change* de expressão de 1,78 ($p = 0,058$). Estudos demonstraram que o *CD248* é um regulador negativo da formação óssea em camundongos e está elevado em processos inflamatórios. Naylor *et al.*⁵⁵ demonstraram em estudos experimentais que camundongos *Knockout* do gene do receptor *CD248* apresentavam aumento de massa óssea. Observou-se nesse estudo uma maior expressão do gene do receptor *CD248* no grupo com fratura vertebral. Foi encontrada sua relação na interação gênica com o gene *TRAF3IP2*, o que sugere o papel do processo inflamatório no risco da fratura vertebral.

A análise da interação gênica mostrou que o *ITGA6* interagiu com outro gene superregulado, o *TNXB*, que é associado à via de adesão focal e à via das integrinas. As integrinas podem contribuir para a adesão óssea dos osteoclastos e aumentar a reabsorção da matriz óssea, portanto, aumentando o risco de fraturas vertebrais. Landowski *et al.*⁵⁶ demonstraram que a inibição da clivagem por *ITGA6 in vivo* diminuiu a atividade do tumor osteolítico e induziu a reação esclerótica das lesões ósseas. A integrina $\alpha 6$ (*ITGA6*) também é expressa por células-troncos hematopoiéticas humanas com abundante laminina 511 (LN511) no osso humano normal⁵⁷. O LN511 é um componente essencial do nicho das células-troncos e suportam a sua sobrevivência,

independentemente de citocinas ou fatores de crescimentos⁵⁸. Ambos os genes foram mostrados na análise de enriquecimento como um componente da matriz extracelular, podendo funcionar formando estrutura ou ligando células do tecido conjuntivo.

A análise da interação gênica também mostrou que o enriquecimento sobreposto da ubiquitina e a sua sinalização, o sistema imunológico adaptativo e o processamento de antígenos estavam associados com a desregulação do gene *CDC34* ($p = 0,008$, $\beta = -2,38$). O *CDC34* foi demonstrado anteriormente como capaz de reverter a resistência à IL-6 na regulação da apoptose⁵⁹. É especialmente interessante no contexto que a IL6 também atua como modulador de diferenciação de osteoclastos e medeia a perda óssea^{60,61}.

A lipocalina 1 (*LCN1*) foi outro transcrito encontrado no presente estudo como significativamente aumentado ($p = 0,006$) em nossa análise de microarranjos. Esses achados vão de acordo com a literatura, pois de fato Lim *et al.*⁶² demonstraram que altos níveis de uma família similar de membros da lipocalina (*LCN2*) podem prever o risco de fraturas osteoporóticas graves em uma coorte de mulheres idosas.

Além disso, esse estudo mostrou que a via de sinalização da mTOR1 com dois genes *PNO1* e *PDK1* foi estatisticamente significativa. A análise da rede de interação também mostrou que o *PNO1* interage com o gene *RPS29*. Ambos os genes também mostraram expressão afetada com o envelhecimento, de acordo com a base de dados GTEX. O *PNO1* mostrou alterações de expressão relacionadas ao envelhecimento cardíaco e ao

tecido adiposo, interação com o gene *RPS29* no tecido adiposo e no sangue⁶³. A literatura demonstra uma associação do maior risco de fratura com maior porcentagem de gordura⁶⁴, assim, esses genes estariam relacionados indiretamente a uma maior quantidade de tecido adiposo, contribuindo para o maior risco de fratura vertebral.

Além disso, Glantschnig *et al.*⁶⁵ mostraram que através da via mTOR, os fatores RANKL, TNF e M-CSF promovem a sobrevivência dos osteoclastos, inibindo a apoptose dos mesmos. A apoptose de células ósseas, incluindo osteoclastos, osteoblastos e osteócitos, foi reconhecida como um mecanismo essencial para a regulação da massa óssea e da osteoporose. Por exemplo, fármacos para osteoporose, da classe dos bifosfonatos, podem inibir a reabsorção óssea aumentada ao induzir apoptose por osteoclastos⁶⁶. Estudos experimentais demonstraram a influência da rapamicina (um inibidor da via mTOR) em camundongos, levando ao aumento da massa óssea por inibição da diferenciação dos osteoclastos. Também em camundongos com osteoporose senil, a rapamicina poderia restaurar as propriedades biológicas da medula óssea envelhecida derivadas de células-tronco mesenquimais (BMMSCs) levando ao aumento da diferenciação e proliferação osteogênica⁶⁷. De fato, os autores demonstraram que a ativação da autofagia restaurou a perda óssea em camundongos idosos, sugerindo que o mecanismo da autofagia desempenha um papel central no envelhecimento das BMMSCs, e que a ativação da autofagia pode reverter parcialmente o envelhecimento dessas células⁶⁸.

O sistema imune apresenta uma função relevante no remodelamento ósseo por meio das citocinas pró-inflamatórias. A senilidade é um fator notável para a aceleração de enfermidades que estão cada vez mais atribuídas a uma inflamação, tais como aterosclerose, doença de Alzheimer, asma e osteoporose. Várias citocinas, incluindo IL-1, TNF- α , IL-6, são elevadas durante a senescência e desempenham um papel direto na patogênese dessas doenças⁶⁹⁻⁷¹.

Diversas citocinas e seus receptores participam da fisiopatologia da osteoporose, entre esses fatores genéticos na patogênese da osteoporose, a IL-1 foi demonstrado ser a citocina mais importante na modulação do crescimento de células de reabsorção óssea em mulheres pós menopausa, pois iniciam uma cascata de sinal de transdução para estimular uma resposta pró-inflamatória que inicia a reabsorção óssea pelos osteoclastos⁷². Provavelmente, devido a esse mecanismo, a osteoporose e as fraturas por fragilidade são mais prevalentes em doenças inflamatórias, como exemplo na artrite reumatoide, no lúpus e na DPOC⁷³.

A força do presente trabalho é o estudo de mulheres idosas com osteoporose (escore T $\leq$ -2,5), com e sem fraturas vertebrais, pois a fratura vertebral é o desfecho clínico mais prevalente na osteoporose. Como a maioria dos estudos genéticos foram realizados estimando a hereditariedade concentrada nas medições da DMO, e foi encontrado que há uma mistura de influências genéticas compartilhadas e específicas para a DMO, essas diferenças poderiam estar associadas à magnitude do efeito genético nos locais esqueléticos distintos. Sabe-se que cerca de 50% das mulheres com

osteoporose com baixa DMO não desenvolvem fraturas no futuro. Alguns estudos mostraram que não apenas a DMO era hereditária, mas também o risco da própria fratura^{18,74}. Nesse estudo, encontramos um resultado da expressão gênica associado à fratura vertebral, independentemente da DMO.

Além disso, os participantes deste estudo foram selecionados da coorte de idosos da comunidade brasileira de São Paulo (SPAH). A falta do viés de seleção permite que esses achados sejam extrapolados para a população de idosos nas comunidades brasileiras. Também excluímos grau 1 (leve) de deformidades da coluna vertebral, pois alguns autores acreditam que esse grau não representa uma verdadeira fratura vertebral, podendo ser uma deformidade não relacionada a fratura, que era uma limitação de um estudo anterior sobre fratura vertebral⁷⁵.

O presente estudo apresenta algumas limitações. Primeiro, o tamanho da amostra é pequeno e os dados desse estudo devem ser revalidados em estudos de larga escala e em outras populações com diferentes raças ou regiões. A confiabilidade dos resultados pode parecer limitada pelo pequeno número de indivíduos, mas o alto poder do valor da análise estatística dos dados (Poder da amostra de 90%) nos dá motivo à confiança na solidez dos resultados, suficiente para revelar diferenças expressas dos genes⁷⁶. Segundo, como usamos sangue total, que não expressam todas as proteínas das células ósseas, portanto, algumas alterações na tradução de proteínas podem ter passado despercebidas durante o nosso estudo. No entanto, a pesquisa foi realizada usando o mRNA do sangue total, que tem a

vantagem de ser um método menos invasivo e poder medir a expressão gênica de doenças sistêmicas, tornando-o mais útil e seguro na prática clínica.

O mRNA também reflete o estado funcional das células e integra respostas a fatores genéticos e epigenéticos da regulação de genes, tornando-o um caminho promissor para explorar a progressão da doença^{77,78}. Outras limitações do estudo foram alterações muito baixas na expressão gênica do *fold change* do *microarray*. Explicamos esse efeito como associado ao fenótipo muito semelhante entre os dois grupos analisados. Devido o uso de coortes relativamente grandes e a regressão logística foi permitido identificar até mudanças muito leves na expressão dos genes. A validação adicional por qPCR, outro método de expressão gênica, além do *microarray* realizado inicialmente, permitiu selecionar as transcrições mais promissoras associadas ao estudo. O qPCR confirmou a direção das mudanças de expressão para a maioria dos transcritos, apoiando a significância dos resultados obtidos por *microarrays*.

6 CONCLUSÃO

Os dados apresentados permitem identificar e validar as superexpressões dos transcritos *SNTG2*, *TRAF3IP2* e *ITGA6* associados às fraturas vertebrais osteoporóticas em mulheres idosas, independentemente da densidade mineral óssea. Esses resultados sugerem que esses transcritos têm potencial significado clínico e podem ajudar a explicar os mecanismos moleculares e as funções biológicas da fratura vertebral osteoporótica. Esse estudo poderá ser utilizado como base para novas pesquisas, para confirmar a importância dessas moléculas como biomarcadores ou novos alvos terapêuticos da fratura vertebral osteoporótica.

7 ANEXOS

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME:

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

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

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:SEXO: M ☐ F ☐

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

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

**Avaliação da síndrome metabólica, calcificação coronariana e novos marcadores
do metabolismo ósseo em idosos da comunidade da coorte de Sao Paulo Ageing
& Health Study (SPAH)**

PESQUISADOR: Rosa Maria Rodrigues Pereira

CARGO/FUNÇÃO: Profa. Assistente Dra. - INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 45920

UNIDADE DO HCFMUSP: LIM-17

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☐	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	X	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses.

I – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO

1 – Desenho do estudo e objetivo(s); 2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros; 3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados; 4 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3; 5 – Benefícios para o participante; 6 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos.

A Osteoporose ocorre principalmente em mulheres depois da menopausa e em homens acima de 60 anos. Nesta faixa etária, ocorre também a aterosclerose vascular (aparecimento de placas de gordura nos vasos do corpo e aumento do risco de ter infarto e derrame cerebral). Estas doenças representam um grave problema de saúde pública e parecem estar relacionadas. Nós estamos convocando o senhor (a) para participar desta pesquisa, para estudarmos quantas pessoas teriam risco maior de apresentar osteoporose e aterosclerose. Como estas doenças parecem ter um componente hereditário, o estudo também irá retirar uma amostra de sangue para estudo genético destas doenças. Caso o senhor (a) aceite, então vai fazer os seguintes exames: densitometria óssea (que ver a quantidade de osso no corpo); tomografia do osso (para ver a qualidade do osso); tomografia de coronárias (para ver as placas nos vasos do coração) e exames de sangue para ver como está o cálcio, fósforo e hormônios relacionados ao osso. Existe risco baixo na realização da densitometria óssea e tomografias do osso e dos vasos já que a dose total de radiação destes exames em conjunto é menor do que a dose de um raio X de pulmão. Na coleta dos exames de sangue pode haver apenas pouca dor no local da picada e às vezes arroxamento do local.

II- ESCLARECIMENTO DOS DADOS PELO PESQUISADOR E DAS GARANTIAS E DIREITOS DO SUJEITO DA PESQUISA

- Em qualquer etapa do estudo, o senhor(a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é a Dra Rosa Maria Rodrigues Pereira, que pode ser encontrada no endereço : Faculdade de Medicina da USP – Av. Dr Arnaldo, 455 – 3º. andar – sala 3105, Telefone(s): 11-30617213, 11-30617490. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br.
- Sua participação é voluntária e será mantida em sigilo, não sendo divulgada sua identificação;
- Não há despesas pessoais para o senhor(a) em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
- Em caso de dano pessoal causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos no estudo, o senhor(a) tem direito a tratamento médico na Instituição, e também às indenizações legalmente estabelecidas.
- Os dados e resultados obtidos com a pesquisa serão usados somente para este estudo.

III – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **“Avaliação da síndrome metabólica, calcificação coronariana e novos marcadores do metabolismo ósseo em idosos da comunidade da coorte de Sao Paulo Ageing & Health Study (SPAH)”**. Eu discuti com Dra Rosa Maria Rodrigues Pereira sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os

procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

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

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

Anexo B - Aprovação pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq # 1904155)



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação da síndrome metabólica, calcificação coronariana e novos marcadores do metabolismo ósseo em idosos da comunidade da coorte de São Paulo Ageing & Health Study (SPAH)

Pesquisador: Rosa Maria Rodrigues Pereira

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 4

CAAE: 29175814.0.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.904.155

Apresentação do Projeto:

A apresentação do projeto é clara e expõem adequadamente seus fundamentos e objetivos. A inclusão do pesquisador Levy Higino Jales Neto e do caráter acadêmico de seu subprojeto intitulado "Estudo genético

por microarray em mulheres idosas com fratura vertebral por osteoporose" estão bem documentados, bem como o relatório de 2016.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da pesquisa é identificar expressão diferencial de genes comparando indivíduos com e sem fraturas e em relação à osteoporose.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos relacionados à pesquisa não diferem daqueles inerentes aos exames clínicos comumente realizados na abordagem da osteoporose e dos escores de cálcio.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A aplicação dos testes de microarray conferem um grande alcance na avaliação das partes relevantes do genoma.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 1.904.155

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE esclarece os eventuais participantes sobre os procedimentos e sobre suas prerrogativas.

Recomendações:

O texto do TCLE pode ser melhorado com a remoção de subtítulos numerados e instruções normativas copiadas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto pode ser aprovado pela comissão quanto à sua inclusão de pesquisador e seu relatório anual.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_825440 E1.pdf	22/11/2016 11:39:51		Aceito
Outros	Relatorio_2016.doc	22/11/2016 11:38:39	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
Outros	Projeto_Levi.docx	22/11/2016 11:36:20	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
Outros	12065_Inclusao_Levi.pdf	11/11/2016 16:44:38	Rosa Maria Rodrigues Pereira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	23/05/2014 16:12:22		Aceito

Outros	CPP - 12065.pdf	02/04/2014 10:14:56		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto - 12065.pdf	02/04/2014 10:13:05		Aceito
Outros	carta de anuência do incor.pdf	18/03/2014 10:30:44		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de pesquisa março2013.doc	18/03/2014 10:30:23		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

~~Necessita Apreciação da CONEP~~
Não

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 1.904.155

SAO PAULO, 01 de Fevereiro de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Anexo C - Questionário aplicado

Laboratório de Metabolismo Osseo –LIM 17- Reumatologia/ FMUSP

FPARTICID-----Profª. Dra. Rosa M. R. Pereira

CPF: _____

FPARTICID _____ ESTADO CIVIL: _____

RGHC: _____ NATURALIDADE: _____

NOME: _____

ENDEREÇO: _____

TELEFONE: _____

CEP: _____

5. DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____

6. DATA DA ENTREVISTA: ____/____/____

7. IDADE: _____

8. Estação do ano: (1) Primavera (2) Verão (3) Outono (4) Inverno

9. Raça: (1) Branca (2) Não Branca (3) Asiática

CONSIDERAR: (1) Branca = PAIS E AVÓS BRANCOS

(2) Não Branca = AO MENOS UM DECENDENTE NEGRO OU ÍNDIO (PAIS OU AVÓS)

10. {altura}: atual _____

11 {peso}: _____

12. {sexo}: (1) feminino (0) masculino

13. Idade da {menarca} _____ (0) = não lembra

14. Idade da menopausa _____ (0) = não lembra

15. menopausa cirúrgica: (1) SIM (0) NÃO

16. Se sim – tirou os ovários? (1) SIM (0) NÃO

17. Uso de trh: (1) SIM (0) NÃO

18. Tempo de uso de TRH: _____

19. Número de {gestação} a termo _____

20. Número de aborto: _____

21. Tempo de {amamentação} = _____ meses/ filhos X _____ N. filhos

{Alcoolismo} - Desde a primeira entrevista:

22. O Sr/Sra. Tem bebido? (1) bebo atual (2) bebi últimos 3-4 anos (3) nunca (4) social

23. Por quanto tempo o senhor (a) tem bebido? Tempo de {álcool}ismo

24. Se parou, há quanto tempo? Tempo de parada de

{álcool}ismo _____

25. O que o Sr.(a) bebe ou bebia com mais frequência? Tipo de {bebida} alcoólica

(5) cerveja (40) pinga (12) vinho (30) uísque

26. Número de {doses} por dia _____

27. Volume de {BEBIDA} por dia: (50) destilado (90) vinho (350) cerveja

{TABACO}:

28. Tem fumado? (1) fumo atual (2) fumei últimos 3-4 anos (3) nunca

29. O que o sr.(a) fuma com mais frequência?

{tipo de tabaco}: (1) cigarro (2) fumo palha (3) cachimbo

30. {Gramatabaco}:(1) cigarro (5) fumo palha (0.5) cachimbo
 31. Por quanto tempo? Tempo de parada de {tabaco} _____
 32. Se parou, há quanto tempo? Tempo de parada de {tabaco} _____
 33. Quantos cigarros por dia? Anotar número de maço/dia _____ Número de {maço}=cigarros/20

{CAFÉ}

34. O sr/ sra.toma café? (1)SIM(0)NÃO
 Se sim, quantas xícaras por dia? (Considerar xícara=50 ml)
 Número de xícaras de {café} _____

INGESTÃO DE {CÁLCIO}

35. Com que frequência o sr.(a) toma leite? (1) Nunca(2) 2 a 3x/ por semana (3) diário
 36. Pensando em copo de requeijão, quantos copos/ dia
 {N}úmero de copos de [leite]por dia _____(considerar 1 copo=200ml=copo de requeijão=2/3copo de extrato de tomate pequeno)
 37. Com que frequência você bebe {iogurte} (1) nunca (2) vezes/sem (3) diário
 38. Número de copos de {iogurte} por dia _____
 39. Com que frequência o sr.(a) come {queijo}:(1) Nunca (2)vezes/sem (3) diário
 40. número de fatias de {queijo}por dia _____

Grau de atividade {física}

- (1) baixa (não faz nem serviços domésticos)
 (2) moderada= trabalhos domésticos, jardinagem, caminhada não regular.....
 (3) alta= atividade física regular fora da rotina de habitual; caminhada, dança....
 Pelo menos 2x /semana por 30 minutos
 42. Se alta, quantas vezes por semana? _____
 43. Quantas horas/dia? _____
 44. {H}oras de atividade {física}dia = número de vezes x número de horas _____

Quedas

45. O Sr(a) caiu neste último ano? História {queda} último ano: (1) SIM (0) NÃO
 46. Se sim quantas vezes? Número de {quedas} no último ano _____

Hist. Fratura Espontânea ou Trauma Mínimo – considerar sim se trauma mínimo.
 Não se acidente automobilístico etc....

47. A Sra. quebrou algum osso após a data da primeira entrevista?(1) SIM (0) NÃO
 Como quebrou? _____
 48. O Sr. já quebrou algum osso após a data da primeira entrevista?(1) SIM (0) NÃO
 Como quebrou? _____
 49. {Tipo} de Fratura - Onde quebrou. Qual osso?
 (1)punho (2) pé(3) tornozelo (4) úmero (5) costela (6) quadril (7) outras
 50. Outros locais -----

51. **Histórico familiar OP-** Na sua família tem alguém com osteoporose?
 SIM (1) NÃO(0) NÃO SABE(2)

52. Histórico familiar fratura:

(sua mãe ou irmã. Pai ou irmão), quebrou algum osso depois dos 45 anos? Como?

Considerar sim, se relacionado a trauma mínimo (1)SIM (0) NÃO (2) NÃO SABE

53. {Enxerga} bem:(1)SIM (0) NÃO

54. Medicação dormir {diazepínico}: (1) SIM (0) NÃO

55. Medicação {convulsão}:(1) SIM (0)NÃO

56. {Antidepressivo}:(1) SIM (0) NÃO

57. {Cálcio} suplementar: (1) SIM (0) NÃO

58. {Dose} de {cálcio} supl: _____

59. {t} {uso} {cálcio}: _____

60. {vit D} supl.:(1) SIM (0) NÃO

61.{Dose Vit D} UI: _____

62. {T} tempo de uso de {Vit D}: _____

63. Uso de {bisfosfonato}: (1) SIM (0) NÃO

64. {T} tempo de uso de {bisfosfonato} -----

65. (T) tempo de {parada} {bisfosf} _____

66. Outros – qual? _____

Anti-hipertensivos

67. Uso atual de captopril ou outro inibidor da ECA:(1) SIM (0) NÃO

68. Tempo de uso (ECA): _____

69. Uso atual {tiazídico}:(1) SIM (0)NÃO

70. Tempo de uso {tiazídico}: _____

71. Uso atual de {BLOQCÁLCIO}? (1) SIM (0) NÃO

72. Tempo de uso {BLOQCÁLCIO}: _____

73. Uso atual de {BBLOQ}:(1) SIM (0) NÃO

74. Tempo de uso {BBLOQ}: _____

75. Uso atual {estatina}? (1) SIM(0) NÃO

76. Tempo de uso de {estatina}: _____

77. Uso de AAS crônico? (1) SIM(0) NÃO

78. Tempo de uso de AAS _____

79. Uso de hormônio {tireóide}:(1) SIM (0)NÃO

80. Tempo hormônio {tireóide}: _____

81. Uso de {lítio}? (1) SIM (0) NÃO

82. Tempo de{lítio}: _____

83. Uso de {marevan}? (1)SIM (0) NÃO

84. Uso de {protetor} solar? (1)SIM (0) NÃO

85. Uso de {corticóide}? (1)SIM (0) NÃO

86. {Dor} em {coluna} dorsal ou lombar? (1)SIM (0) NÃO

87. Grau de dor {EVA}: _____

88. Quando o sr/ sra está com dor na coluna tem dificuldade para:

89. {curvar}-se para pegar objetos:(0) (1) (2) (3)

90. {levantar} um objeto de aproximadamente 500 g do chão:(0) (1) (2) (3)

91. {Alcançar} objetos em cima da mesa:(0) (1) (2) (3)

92. {Calçar meias}:(0) (1) (2) (3)

93. Entrar ou sair do {carro}: (0) (1) (2) (3)
 94. Ficar {em} {pé} por pelo menos {2} {h}oras: (0) (1) (2) (3)
 95. Incapacidade devido a {dor lombar}: (1) pouca (2) moderada (3) incapaz
 96. O sr/sra diminui suas atividades por causa da dor nas costas? (1) SIM (0) NÃO
 97. O sr/sra chega a ficar de cama por causa da dor nas costas? (1) SIM (0) NÃO

98. {Perda} de {altura} > 2cm

Perdeu altura desde a última entrevista? (1) SIM (2) NÃO (3) NÃO SABE
 Considerar sim se, a diferença de altura for maior ou igual a 2cm

99. {Diabetes}? (1) SIM (0) NÃO

100. Tempo de {diabetes}: _____
 101. {Insulina}? (1) SIM (0) NÃO
 102. Tempo de {insulina}: _____
 103. {HAS}? (1) SIM (0) NÃO
 104. Evento {ECV} Após 1 entrevista: (1) SIM (0) NÃO
 105. {Qual ECV}: (1) ANGINA (2) IAM (3) AVC
 106. N episódios {IAM}: _____
 107. N episódios {AVC}: _____
 108. intervenção ? (1) SIM (0) NÃO
 109. {Cirurgia}: (1) SIM (0) NÃO
 110. Angioplastia? (1) SIM (0) NÃO
 111. {DLP}? (1) SIM (0) NÃO
 112. Tempo DLP _____
 113. {TVP}? (1) SIM (0) NÃO
 114. {Dcarótida}? (1) SIM (0) NÃO
 115. Na sua família algum parente próximo (pai, mãe e irmãos) já teve derrame ou infarto ou angina? (1) SIM (0) NÃO
 116. {PAS}: _____
 117. {PAD}: _____
 118. Outras {doenças} (lembrar de osteoartrose coluna ou joelho- anotar locais): _____
 119. {Cálcio} serio total: _____
 120. {HDL}: _____
 121. {LDL}: _____
 122. {Colesterol} total: _____
 123. {Creatinina}: _____
 124. {Fosfatase} alcalina: _____
 125. {Fósforo}: _____
 126. {Glicemia}: _____
 127. {Albumina}: _____
 128. {Triglicerídeos}: _____
 129. {TSH}: _____
 130. {T4 livre}: _____
 131. {PTH}: _____
 132. {Vitamina D}: _____
 133. {OP}: (0) NÃO (1) SIM (2) Osteopenia
 134. {local OP}: (1) coluna (2) quadril (3) ambos

135. {Localpenia} **(1)** coluna **(2)** quadril**(3)** ambos
136. Circunferência abdominal: _____
137. {PCR}: _____
138. {VHS}: _____
139. {Insulina}: _____
140. {Ácido úrico}: _____
141. {CTX}: _____
142. O sr/sra.fez algum tipo de tratamento de osteoporose neste período?
(1)SIM **(0)** NÃO
143. Como o sr/ sra.tomava a medicação? _____
144. Se parou, quanto tempo ficou sem a medicação? _____
() 25% () 50% () 75% () 100%

8 REFERÊNCIAS

1. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med.* 1993, 94(6):646-50.
2. Brunton S, Carmichael B, Gold D, Hull B, Kauffman TL, Koehler B, Papaioannou A, Rasch RFR, Stracke HHG, Truumes E. Osteoporosis and spine fractures. In: Kauffman TL, Scorr R, Barr J, Moran ML. *A comprehensive guide to geriatric rehabilitation.* 2014. p. 124-133.
3. Samelson EJ, Hannan MT, Zhang Y, Genant HK, Felson DT, Kiel DP. Incidence and risk factors for vertebral fracture in women and men: 25-year follow-up results from the population-based Framingham study. *J Bone Miner Res.* 2006;21(8):1207-14.
4. Van der Klift M, De Laet CEDH, McCloskey EV, Hofman A, Pols HAP. The incidence of vertebral fractures in men and women: the Rotterdam Study. *J Bone Miner Res.* 2002;17(6):1051-6.
5. European Prospective Osteoporosis Study (EPOS) Group, Felsenberg D, Silman AJ, et al. Incidence of vertebral fracture in europe: results from the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS). *J Bone Miner Res.* 2002;17(4):716-24

6. Ross PD. Clinical consequences of vertebral fractures. *Am J Med.* 1997;103(2A):30S-43S.
7. Gold DT. The clinical impact of vertebral fractures: Quality of life in women with osteoporosis. *Bone.* 1996;18(3 Suppl):185S-9S.
8. Oleksik AM, Ewing S, Shen W, van Schoor NM, Lips P. Impact of incident vertebral fractures on health related quality of life (HRQOL) in postmenopausal women with prevalent vertebral fractures. *Osteoporos Int.* 2005;16(8):861-70.
9. Bliuc D, Nguyen ND, Milch VE, Nguyen TV, Eisman JA, Center JR. Mortality risk associated with low-trauma osteoporotic fracture and subsequent fracture in men and women. *JAMA.* 2009;301(5):513-21.
10. Ensrud KE, Thompson DE, Cauley JA, Nevitt MC, Kado DM, Hochberg MC, et al. Prevalent vertebral deformities predict mortality and hospitalization in older women with low bone mass. Fracture Intervention Trial Research Group. *J Am Geriatr Soc.* 2000;48(3):241-9.
11. Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Wong JB, King A, Tosteson A. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *J Bone Miner Res.* 2007;22(3):465-75.

12. Melton LJ III, Atkinson EJ, Cooper C, O'Fallon WM, Riggs BL. Vertebral fractures predict subsequent fractures *Osteoporos Int.* 1999;10(3):214-21.
13. Domiciano DS, Machado LG, Lopes JB, Figueiredo CP, Caparbo VF, Takayama L, Oliveira RM, Menezes PR, Pereiro RMR. Incidence and risk factors for osteoporotic vertebral fracture in low-income community-dwelling elderly: a population-based prospective cohort study in Brazil. The São Paulo Ageing & Health (SPAHE) Study. *Osteoporos Int.* 2014;25(12):2805-15.
14. Lindsay R, Silverman SL, Cooper C, Hanley DA, Barton I, Broy SB, et al. Risk of new vertebral fracture in the year following a fracture. *JAMA.* 2001;285(3):320-3.
15. Marshall D, Johnell O, Wedel H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *BMJ.* 1996;312(7041):1254-9.
16. Recker RR, Barger-Lux MJ. Bone remodeling findings in osteoporosis. In: *Osteoporosis*. San Diego: Academic Press; 2001. p. 59-70.
17. Grynpas MD. The role of bone quality on bone loss and bone fragility. *Bone loss and osteoporosis*. ew York: Kluwer Plenum Academic Press 2003. p. 33-44.

18. Liu C-T, Karasik D, Zhou Y, Hsu Y-H, Genant HK, Broe KE, Lang TF, Samelson EJ, Demissie S, Brouxsein ML, Cupples LA, Kiel DP. Heritability of prevalent vertebral fracture and volumetric bone mineral density and geometry at the lumbar spine in three generations of the Framingham study. *J Bone Miner Res.* 2012;27(4):954-8.
19. Kanis JA, Johansson H, Oden A, Johnell O, De Laet C, Eisman JA, McCloskey EV, Mellstrom d, Melton LJ, Pols HAP, Reeve J, Silman AJ, Tenenhouse A. A family history of fracture and fracture risk: a meta-analysis. *Bone.* 2004;35(5):1029-37.
20. Deng H-W, Chen W-M, Recker S, Stegman MR, Li J-L, Davies KM, Zhou Y, Deng H, Heaney R, Recker RR. Genetic Determination of colles' fracture and differential bone mass in women with and without colles' fracture. *J Bone Miner Res.* 2000;15(7):1243-52.
21. Pope FM, Nicholls AC, McPheat J, Talmud P, Owen R. Collagen genes and proteins in osteogenesis imperfecta. *J Med Genet.* 1985;22(6):466-78.
22. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, et al. LDL Receptor-Related Protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell.* 2001;107(4):513-23.

23. Balemans W, Ebeling M, Patel N, Van Hul E, Olson P, Dioszegi M, Lacza C, Wuyts W, Van Den Ende J, Willems P, Paes-alves AF, Hill S, Bueno M, Ramos FJ, Tacconi P, Dikkers FG, Stratakis C, Lindpainter K, Vickery B, Foernzler D, Van Huul W. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet.* 2001;10(5):537-43.

24. Frattini A, Orchard PJ, Sobacchi C, Giliani S, Abinun M, Mattsson JP, Keeling DJ, andersson AK, Wallbrandt P, Zecca L, Notarangelo L, Vezzoni P, Villa A. Defects in TCIRG1 subunit of the vacuolar proton pump are responsible for a subset of human autosomal recessive osteopetrosis. *Nat Genet.* 2000;25(3):343-6.

25. Richards JB, Kavvoura FK, Rivadeneira F, Styrkársdóttir U, Estrada K, Halldórsson BV, et al. Collaborative meta-analysis: associations of 150 candidate genes with osteoporosis and osteoporotic fracture. *Ann Intern Med.* 2009;151(8):528-37.

26. Albagha OME. Association of oestrogen receptor gene polymorphisms with postmenopausal bone loss, bone mass, and quantitative ultrasound properties of bone. *J Med Genet.* 2005;42(3):240-6.

27. Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, Pastinen TM, Soranzo N, Wilson SG, Andrew T, Falchi M, Gwilliam R, Ahmadi KR, Valdes AM, Arp P, Whittaker P, Verlaan DJ, Jhamai M, Kumanduri V, Moorhouse M, van Meurs JB, Hofman A, Pols HAP, Hart D, Zhai G, Kato BS, Mullin BH, Zhang F, Deloukas P, Uitterlinden AG, Spector TD. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet*. 2008;371(9623):1505-12.
28. Manolio TA. Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. *N Engl J Med*. 2010;363(2):166-76.
29. Rivadeneira F, Styrkarsdottir U, Estrada K, Halldorsson B, Hsu Y, Richards JB, et al. Twenty loci associated with bone mineral density identified by large-scale meta-analysis of genome-wide association datasets. *Nat Genet*. 2009;41(11):1199-206
30. Estrada K, Styrkarsdottir U, Evangelou E, Hsu Y-H, Duncan EL, Ntzani EE, et al. Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nat Genet*. 2012;44(5):491-501.
31. Kerr MK. Design considerations for efficient and effective microarray studies. *Biometrics*. 2003;59(4):822-8.

32. Wu RZ, Bailey SN, Sabatini DM. Cell-biological applications of transfected-cell microarrays. *Trends Cell Biol.* 2002;12(10):485-8.
33. Atak A, Srivastava S. Cell-free expression based microarrays: applications and future prospects. In: Grunwald P. *Biocatalysis and nanotechnology*. Singapura: Pan Stanfor Publishing Pte. 2017. p. 751-774.
34. Zhang Y, Wang N, Ma J, Chen XC, Li Z, Zhao W. Expression profile analysis of new candidate genes for the therapy of primary osteoporosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(3):433-40.
35. Lopes JB, Figueiredo CP, Caparbo VF, Takayama L, Menezes PR, Scazufca M, Pereira RMR. Osteoporotic fractures in the Brazilian community-dwelling elderly: prevalence and risk factors. *J Clin Densitom.* 2011;14(3):359-66.
36. Bennett HS, Dienstfrey A, Hudson LT, Oreskovic T, Fuerst T, Shepherd J. Standards and measurements for assessing bone health-workshop report co-sponsored by the International Society for Clinical Densitometry (ISCD) and the National Institute of Standards and Technology (NIST). *J Clin Densitom.* 2006;9(4):399-405.
37. Genant HK, Wu CY, van Kuijk C, Nevitt MC. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *J Bone Miner Res.* 1993;8(9):1137-48.

38. Parmigiani G, Garrett ES, Irizarry RA, Zeger SL. *The analysis of gene expression data: methods and software*. New York: Springer Science & Business Media; 2006. 456 p.
39. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003;4(2):249-64.
40. Hulsegege I, Kommadath A, Smits MA. Globaltest and GOEAST: two different approaches for Gene Ontology analysis. *BMC Proc*. 2009;3 Suppl 4(Suppl 4):S10.
41. Watanabe K, Taskesen E, van Bochoven A, Posthuma D. Functional mapping and annotation of genetic associations with FUMA. *Nat Commun*. 2017;8(1):1826.
42. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3 - New capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(15):e11..
43. Kibbe WA. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Web Server issue):W43-6.

44. Owczarzy R. Predicting melting and folding of nucleic acids: comment on “DNA melting and energetics of double helix” by Alexander Vologodskii and Maxim D. Frank-Kamenetskii. *Phys Life Rev.* 2018;25:24-5.
45. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* de 2012;13:134.
46. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
47. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 2007;8(2):R19.
48. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3(7):RESEARCH0034.
49. Moon JY, Choi SJ, Heo CH, Kim HM, Kim HS. α -Syntrophin stabilizes catalase to reduce endogenous reactive oxygen species levels during myoblast differentiation. *FEBS J.* 2017;284(13):2052-65.

50. Inoue M, Wakayama Y, Jimi T, Shibuya S, Hara H, Unaki A, Kenmochi K. Skeletal muscle syntrophin interactors revealed by yeast two-hybrid assay. *Nagoya J Med Sci.* 2008;70(3-4):117-26.
51. Garfin SR, Yuan HA, Reiley MA. New technologies in spine: kyphoplasty and vertebroplasty for the treatment of painful osteoporotic compression fractures. *Spine.* 2001;26(14):1511-5.
52. Tseng P-H, Matsuzawa A, Zhang W, Mino T, Vignali DAA, Karin M. Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. *Nat Immunol.* 2010;11(1):70-5.
53. Boyce BF, Li J, Xing L, Yao Z. Bone remodeling and the role of TRAF3 in osteoclastic bone resorption. *Front Immunol.* 2018;9:2263.
54. Xiu Y, Xu H, Zhao C, Li J, Morita Y, Yao Z, Xing L, Boyce BF. Chloroquine reduces osteoclastogenesis in murine osteoporosis by preventing TRAF3 degradation. *J Clin Invest.* 2014;124(1):297-310.
55. Naylor AJ, Azzam E, Smith S, Croft A, Poyser C, Duffield JS, Huso DL, Steffen G, Ospelt C, Cooper MS, Isacke C, Goodyear SR, Rogers MJ, Buckley CD. The mesenchymal stem cell marker CD248 (endosialin) is a negative regulator of bone formation in mice. *Arthritis Rheum.* 2012;64(10):3334-43.

56. Landowski TH, Gard J, Pond E, Pond GD, Nagle RB, Geffre CP, Cress AE. Targeting Integrin $\alpha 6$ stimulates curative-type bone metastasis lesions in a xenograft model. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(6):1558-66.
57. Qian H, Georges-Labouesse E, Nyström A, Domogatskaya A, Tryggvason K, Jacobsen SEW, Ekblom M. Distinct roles of integrins $\alpha 6$ and $\alpha 4$ in homing of fetal liver hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2007;110(7):2399-407.
58. Graf L, Heimfeld S, Torok-Storb B. Comparison of gene expression in CD34 cells from bone marrow and G-CSF-mobilized peripheral blood by high-density oligonucleotide array analysis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001;7(9):486-94.
59. Chauhan D, Li G, Hideshima T, Podar K, Shringarpure R, Mitsiades C, et al. Blockade of ubiquitin-conjugating enzyme CDC34 enhances anti-myeloma activity of Bortezomib/Proteasome inhibitor PS-341. *Oncogene*. 29 de abril de 2004;23(20):3597-602.
60. Harmer D, Falank C, Reagan MR. Interleukin-6 Interweaves the Bone Marrow Microenvironment, Bone Loss, and Multiple Myeloma. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;9:788.
61. Kwan Tat S, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF- α /IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15(1):49-60.

62. Lim WH, Wong G, Lim EM, Byrnes E, Zhu K, Devine A, Pavlos N, Prince RL, Lewis JR. Circulating Lipocalin 2 levels predict fracture-related hospitalizations in elderly women: a prospective cohort study. *J Bone Miner Res.* 2015;30(11):2078-85.
63. Yang J, Huang T, Petralia F, Long Q, Zhang B, Argmann C, Zhao Y, Mobbs CV, Schadt EE, Zhu J, Tu Z, GTEx Consortium. Corrigendum: Synchronized age-related gene expression changes across multiple tissues in human and the link to complex diseases. *Sci Rep.* 2016;6:19384.
64. Sjøgaard AJ, Holvik K, Omsland TK, Tell GS, Dahl C, Schei B, Falch JA, Eisman JA, Meyer HE. Abdominal obesity increases the risk of hip fracture. A population-based study of 43,000 women and men aged 60-79 years followed for 8 years. Cohort of Norway. *J Intern Med.* 2015;277(3):306-17.
65. Glantschnig H, Fisher JE, Wesolowski G, Rodan GA, Reszka AA. M-CSF, TNFalpha and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase. *Cell Death Differ.* 2003;10(10):1165-77.
66. Hughes DE, Boyce BF. Apoptosis in bone physiology and diseases. *Mol Pathol.* 1997;50(3):132-37.

67. Dai Q, Xie F, Han Y, Ma X, Zhou S, Jiang L, Zou W, Wang J. Inactivation of Regulatory-associated Protein of mTOR (Raptor)/Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Signaling in Osteoclasts Increases Bone Mass by Inhibiting Osteoclast Differentiation in Mice. *J Biol Chem*. 2017;292(1):196-204.
68. Ma Y, Qi M, An Y, Zhang L, Yang R, Doro DH, Liu W, Jin Y. Autophagy controls mesenchymal stem cell properties and senescence during bone aging. *Aging Cell*. 2018;17(1):e12709.
69. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, de Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. Inflamm-aging: An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;908:244-54.
70. Brüünsgaard H, Pedersen BK. Age-related inflammatory cytokines and disease. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2003;23(1):15-39.
71. Ginaldi L, De Martinis M, Monti D, Franceschi C. Chronic antigenic load and apoptosis in immunosenescence. *Trends Immunol*. 2005;26(2):79-84.
72. Zarrabeitia MT, Riancho JA, Amado JA, Napal J, Gonzalez-Macias J. Cytokine production by peripheral blood cells in postmenopausal osteoporosis. *Bone Miner*. 1991;14(2):161-7.

73. Lacativa PGS, de Farias MLF. Osteoporosis and inflammation. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2010;54(2):123-32.
74. Oei L, Hsu Y-H, Stykarsdottir U, Eussen BH, de Klein A, Peters MJ, et al. A genome-wide copy number association study of osteoporotic fractures points to the 6p25.1 locus. *J Med Genet*. 2014;51(2):122-31.
75. Grados F, Fechtenbaum J, Flipon E, Kolta S, Roux C, Fardellone P. Radiographic methods for evaluating osteoporotic vertebral fractures. *Joint Bone Spine*. 2009;76(3):241-7.
76. van Iterson M, 't Hoen PAC, Pedotti P, Hooiveld GJEJ, den Dunnen JT, van Ommen GJB, Boer JM, Menezes RX. Relative power and sample size analysis on gene expression profiling data. *BMC Genomics*. 2009;10:439.
77. Mohr S, Liew C-C. The peripheral-blood transcriptome: new insights into disease and risk assessment. *Trends Mol Med*. 2007;13(10):422-32.
78. Riedmaier I, Pfaffl MW. Transcriptional biomarkers--high throughput screening, quantitative verification, and bioinformatical validation methods. *Methods*. 2013;59(1):3-9.

APÊNDICES

Apêndice A - Artigo submetido para publicação

Molecular Genetics & Genomic Medicine - Manuscript ID MGG3-2020-03-0468 [email ref: SE-6-a]  

Molecular Genetics & Genomic Medicine <onbehalfof@manuscriptcentral.com>
para rosamariarp, mim, zofiawicik, georgea_hf, liliamtgy, caparbo, neuzaledes1, alexandre.pereira

qua., 1 de abr. 11:06 (há 12 dias) ☆ ↵

🌐 inglês > português Traduzir mensagem

Desativar para: inglês ✕

01-Apr-2020

Dear Dr. Pereira:

Your manuscript entitled "Overexpression of SNTG2, TRAF3IP2 and ITGA6 Genes Transcripts is Associated with Osteoporotic Vertebral Fracture in Elderly Women from Community" by Jales Neto, Levi; Wicik, Zofia; Torres, Georgea; Takayama, Liliam; Caparbo, Valeria; Lopes, Neuza; Pereira, Alexandre; Pereira, Rosa M R, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Molecular Genetics & Genomic Medicine.

Please note that Molecular Genetics & Genomic Medicine is an Open Access journal, and thus, there is a publication fee if your paper is accepted by the journal.

The submitting author is the contact author for this paper, as such all further correspondence will be sent to Dr. Rosa M R Pereira.

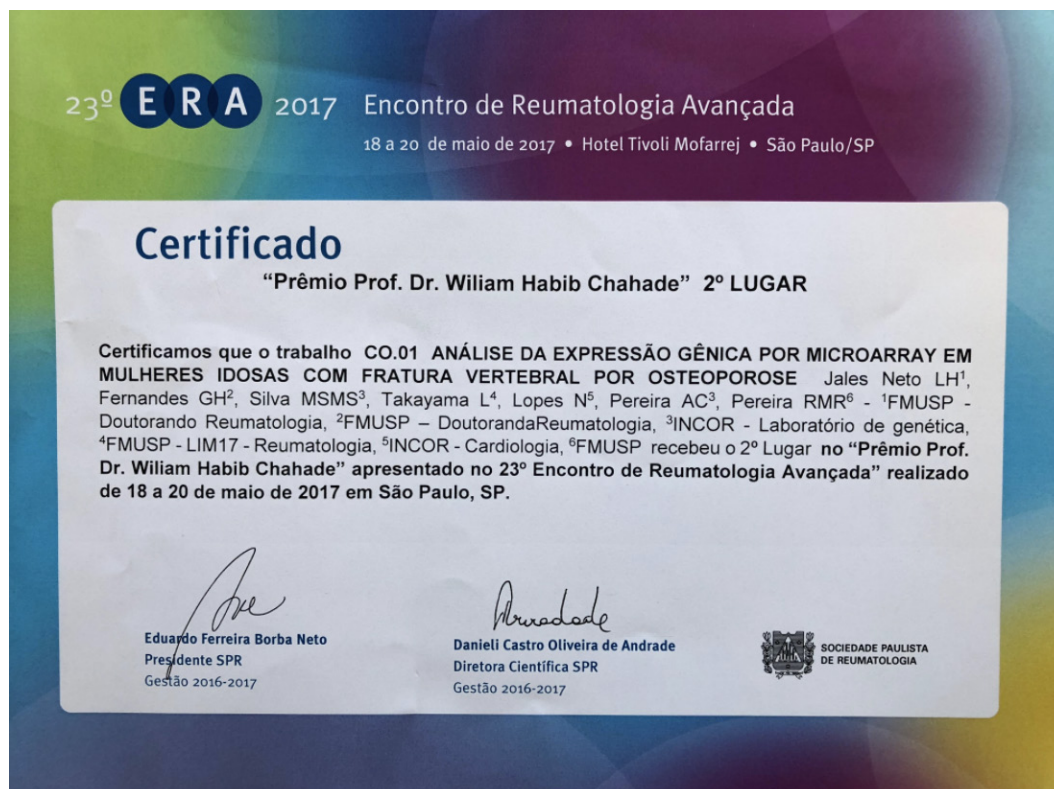
Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is MGG3-2020-03-0468.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/mggm> and edit your user information as appropriate.

Apêndice B - Apresentações nacionais e prêmios**Congresso Brasileiro de Densitometria Osteoporose e
Osteometabolismo - 2016 (Prêmio - 1º Lugar)**

Encontro de Reumatologia Avançada 2017 (Prêmio - 2º Lugar)



Encontro de Reumatologia Avançada 2019 (Prêmio - 3º Lugar)



Apêndice C - Apresentação em Congresso Internacional

Apresentação no 2019 ACR/ARHP Annual Meeting (Atlanta)



2019 ACR/ARHP Annual Meeting
Atlanta, GA • November 8-13

Dear Levi Jales Neto,

We are pleased to inform you that the ACR/ARHP Abstract Selection Committee has accepted your abstract titled "Identification and Validation of Transcriptional Genes Associated with Osteoporotic Vertebral Fractures by Microarray Study, in Community Elderly Women" for presentation at the 2019 ACR/ARHP Annual Meeting, to be held in Atlanta, GA, November 8-13.

ABSTRACT ACCEPTANCE INFORMATION

Program Type: ACR

Presentation Type: **Poster**

Abstract ID: 697722

Abstract Title: Identification and Validation of Transcriptional Genes Associated with Osteoporotic Vertebral Fractures by Microarray Study, in Community Elderly Women

This is a courtesy notification to all coauthors of the above abstract. Scheduling information and all future communications regarding this abstract will be sent only to the presenting author. The primary contact for information about your abstract is the presenting author. Please visit the [Annual Meeting Website](#) for more details about the meeting.