



**Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO  
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**LETICIA SONCINI DE SOUZA**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES  
RELACIONADOS À BAIXA DENSIDADE MINERAL  
ÓSSEA: AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA E DE CONDUTA  
TERAPÊUTICA PARA OSTEOPOROSE**

**VITÓRIA  
2013**

**LETICIA SONCINI DE SOUZA**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS  
À BAIXA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA: AVALIAÇÃO  
PROGNÓSTICA E DE CONDUTA TERAPÊUTICA PARA  
OSTEOPOROSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) - Ponto Focal Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ian Victor Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Teodiano Freire Bastos Filho.

**VITÓRIA  
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA BIBLIOTECA CENTRAL - UFES



## **ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À BAIXA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA: AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA E DE CONDOTA TERAPÊUTICA PARA OSTEOPOROSE**

Leticia Soncini de Souza

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (RENORBIO) – Ponto Focal Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ian Victor Silva - Orientador  
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

---

Prof. Dr. Teodiano Freire Bastos Filho – Coorientador  
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

---

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira  
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

---

Prof. Dr. Marco César Cunegundes Guimarães  
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita Gomes Wanderley Pires  
Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

---

Prof. Dr. Jean Christophe Houzel  
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelos ensinamentos aprendidos, pelos momentos felizes e pelos não tão felizes, mas que foram preciosas lições de vida, de perseverança, de compreensão, tolerância e paciência e que fizeram parte dessa pequena bagagem do meu crescimento no dia a dia da minha vida.

Agradeço a minha Família pela base sólida que sempre me deu força para encarar a vida de frente, por me ensinar a percorrer meu próprio caminho nessa trajetória, por levantar meu ânimo nas inúmeras vezes em que me sentia abatida, pelo amor intenso e pelo carinho sempre. Aos meus irmãos que são exemplos de estudo e força de vontade, pela força e pelos auxílios eternos.

Agradeço ao meu amor por me compreender sempre, me aceitar como sou e perdoar minhas falhas, e por compartilhar minhas dores e muitas alegrias.

Agradeço às pacientes por aceitarem participar deste estudo. Sem elas, nada poderia ter sido feito.

Agradeço ao Professor Dr. Ian Victor Silva por acreditar no meu trabalho, pelos conselhos e por ter me apresentado o tema Osteoporose.

Ao Dr. Sérgio Ragi Eis (*in memoriam*), Dr<sup>a</sup> Irani do Carmo Fim Francischetto e ao Dr. Ben Hur Albergaria, do Centro de Diagnóstico e Pesquisa da Osteoporose do Espírito Santo (CEDOES) e ao Dr. Henrique Tommasi e Bruno Tommasi, do Instituto Tommasi de Pesquisa e Desenvolvimento, pelos ensinamentos e por colaborarem diretamente para que esta pesquisa se tornasse realidade.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Leticia Batista Azevedo Rangel, Prof. Dr. Teodiano Freire Bastos Filho, Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira, Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães por todo o apoio, compreensão e carinho apresentados a mim em algum momento desta jornada.

Aos meus antigos amigos que permaneceram comigo mesmo com toda a distância... O carinho é imenso.

Agradeço também aos novos amigos que estiveram comigo, oferecendo-me suas amizades, seus incentivos, seus tempos. Suas generosidades em ações e palavras sempre tão gentis e carinhosas que muito me emocionaram.

Às agências de apoio e financiamento: FACITEC, FAPES e CNPq.

## RESUMO

Uma vez admitindo-se que o conhecimento da regulação dos mecanismos de formação e reabsorção óssea é crucial na busca de alternativas terapêuticas em doenças como a osteoporose, a biologia molecular surge como ferramenta interessante e, indispensável para alcançar tal objetivo. Dentre esses marcadores genéticos, os polimorfismos associados ao gene do receptor de estrogênio alfa (*RE $\alpha$* ) e ao gene da Apolipoproteína “E” (ApoE) têm recebido maior atenção nos últimos anos. O objetivo deste estudo foi analisar a expressão dos polimorfismos PvuII (C→T nt -397) e XbaI (G→A nt -351) presentes no gene do *RE $\alpha$*  e dos polimorfismos presentes no gene da *ApoE* (HhaI -  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3 e  $\epsilon$ 4) em populações de mulheres pós-menopausadas, associando estas alterações gênicas, seus perfis clínicos e bioquímicos com a osteoporose. Após análise dos resultados obtidos, o SNP PvuII, do gene do *RE $\alpha$* , está relacionado com a baixa Densidade Mineral Óssea (DMO), sendo este efeito mais observado em mulheres com idade mais avançada. O alelo P, contudo, correlaciona-se fortemente com alta DMO ( $p < 0,05$ ) em toda a população estudada, e se reproduz quando analisada a população com idade acima de 65 anos, sugerindo um papel protetor à perda de massa mineral óssea. No SNP XbaI do mesmo gene, observou-se uma associação significativa do alelo x em concentrações de triglicerídeos e de lipídios totais, além da dependência da idade dos pacientes e do Índice de Massa Corporal (IMC). Já o SNP HhaI, no gene da *APOE*, o alelo E2 pode estar relacionado como um fator de risco para a baixa DMO, e o alelo E3 pode estar relacionado como um fator protetor em relação à DMO. Esses resultados contribuem para uma melhor compreensão sobre a expressão de genes relacionados à osteoporose e podem fornecer subsídios para uma melhor determinação prognóstica da enfermidade, além de racionalização da conduta terapêutica a ser escolhida, proporcionando uma melhor qualidade de vida de pacientes já na pós-menopausa.

**Palavras-chave:** Polimorfismo; Receptor de Estrogênio alfa, Apolipoproteína E, Menopausa e Osteoporose.

## ABSTRACT

Since that assuming the knowledge of the regulatory mechanisms of bone formation and resorption is crucial in the search for alternative therapies in diseases such as osteoporosis, molecular biology emerges as interesting tool and essential to achieving this goal. Among these genetic markers, gene polymorphisms associated with estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) and the gene Apolipoprotein " E" (ApoE) have received increased attention in recent years. The aim of this study was to analyze the expression of polymorphisms PvuII (C $\rightarrow$ T nt -397) and XbaI (G $\rightarrow$ A nt -351) gene present in RE $\alpha$  and polymorphisms in the gene ApoE (HhaI -  $\epsilon$ 2 ,  $\epsilon$ 3 and  $\epsilon$ 4) in populations of postmenopausal women, associating these gene alterations, and their clinical and biochemical profiles with osteoporosis. After analyzing the results obtained, the PvuII SNP in the gene of ER $\alpha$  is related to low BMD, and this effect is most noticeable in women with advanced age. The P allele, however, correlates strongly with high BMD ( $p < 0.05$ ) in the whole population studied and reproduced when analyzing the population aged over 65 years, suggesting a protective role in the loss of bone mineral. In XbaI SNP, of same gene, a significant association of allele x at concentrations of triglycerides and total lipids and dependence on patient age and Body Mass Index (BMI) was observed. On the other hand, for SNP HhaI, ApoE gene, the E2 allele may be associated as a risk factor for low BMD, and E3 allele may be associated as a protective factor in relation to BMD. These results contribute to a better understanding of the expression of genes related to osteoporosis and can provide information for better prognostic determination of the disease as well as rationalization of therapeutic conduct to be chosen, providing a better quality of life for postmenopausal patients.

**Keywords:** Polymorphism, Estrogen Receptor Alpha, Apolipoprotein E, Menopause and Osteoporosis.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Osso normal e osteoporótico respectivamente .....	19
Figura 2 – Diminuição da estatura com a evolução da idade e da osteoporose.....	20
Figura 3 – Homeostase óssea em adultos saudáveis.....	26
Figura 4 – Desequilíbrio entre a reabsorção e formação óssea na osteoporose.....	27
Figura 5 – Estrutura química dos estrogênios. Estrona (A) e Estradiol (B).....	28
Figura 6 – Mecanismos de ações não genômicas dependentes de receptores de estrogênio membranares em quatro tipos celulares.....	29
Figura 7 – Alguns polimorfismos descritos do gene do ESR1 humano.....	33
Figura 8 – Estrutura da ApoE.....	36
Figura 9 – O papel do HDL na redistribuição de lipídios. FC: colesterol livre; HDL-E: HDL-associado.....	37
Figura 10 – O gene da ApoE.....	39
Figura 11 – O domínio de interação da ApoE4.....	40
Figura 12 – Coleta sanguínea.....	43
Figura 13 – Aparelho de densitometria óssea localizada no Centro de Diagnóstico e Pesquisa da Osteoporose do Espírito Santo (CEDOES).....	44
Figura 14 – Regiões analisadas em exame DXA realizada no CEDOES.....	52
Figura 15 – Resultado de exame DXA realizada no CEDOES.....	53
Figura 16 - Extração de material genômico (DNA).....	58
Figura 17 - Produto amplificado por PCR das amostras de DNA.....	59

Figura 18 – Digestão por enzima de restrição PvuII.....	60
Figura 19 – Digestão por enzima de restrição XbaI.....	60
Figura 20 – Qualificação PCR APOE.....	62
Figura 21 – Digestão por enzima de restrição HhaI.....	63

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Regressão linear das Densidades Minerais Ósseas (DMO's) de todas as pacientes envolvidas no estudo.....	54
Gráfico 2 - Regressão linear da Densidade Mineral Óssea (DMO) da coluna de todas as pacientes envolvidas no estudo.....	55
Gráfico 3 - Regressão linear da Densidade Mineral Óssea (DMO) do fêmur de todas as pacientes envolvidas no estudo.....	55
Gráfico 4 - Regressão linear da Densidade Mineral Óssea (DMO) do colo do fêmur de todas as pacientes envolvidas no estudo.....	56
Gráfico 5 - Regressão linear da Densidade Mineral Óssea (DMO) do rádio de todas as pacientes envolvidas no estudo.....	57
Gráfico 6 – Concentração sérica do fragmento C-terminal de colágeno tipo I (CTx) em pacientes osteoporóticas e normais.....	65
Gráfico 7 – Influência da idade na concentração sérica do fragmento C-terminal de colágeno tipo I (CTx) em pacientes osteoporóticas e normais.....	66
Gráfico 8 – Concentração sérica da osteocalcina em pacientes osteoporóticas e normais.....	67
Gráfico 9 – Influência da idade na concentração sérica da osteocalcina em pacientes osteoporóticas e normais.....	67
Gráfico 10 – Influência da idade na concentração sérica da osteocalcina em pacientes osteoporóticas portadoras dos alelos <b>P</b> (grupos <b>PP</b> e <b>Pp</b> ) e homozigotos ancestrais ( <b>pp</b> ).....	72
Gráfico 11 – Influência da idade na concentração sérica do CTx em pacientes osteoporóticas portadoras dos alelos <b>P</b> (grupos <b>PP</b> e <b>Pp</b> ) e homozigotos ancestrais ( <b>pp</b> ).....	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios Densitométricos da Organização Mundial da Saúde.....	21
Tabela 2 - <i>Primers</i> da região do íntron 1 do <i>REα</i> contendo os SNPs PvuII e XbaI utilizados neste estudo.....	46
Tabela 3 - Padrões de bandas específicas de digestão para o fragmento de 119 pb amplificado a partir do gene do receptor de estrogênio alfa ( <i>REα</i> ).....	47
Tabela 4 - Padrões de bandas específicas de digestão para o fragmento de 186 pb amplificado a partir do gene da Apolipoproteína E (ApoE).....	49
Tabela 5 - Características amostrais das pacientes analisadas no estudo.....	51
Tabela 6 - Distribuição dos genótipos da população normal e osteoporótica.	61
Tabela 7 – Perfil populacional (por genótipo do Gene da ApoE) encontrados no estudo.....	63
Tabela 8 - Perfil sérico das pacientes normais e osteoporóticas envolvidas neste estudo.....	64
Tabela 8 - Agrupamento alélico e a influência destes alelos na DMO da população estudada.....	69
Tabela 9 - Agrupamento alélico e a influência destes alelos na DMO da população estudada.....	69
Tabela 10 - Papel dos alelos <b>P</b> , <b>p</b> , <b>X</b> e <b>x</b> nas concentrações séricas de fosfatase alcalina (FA), fragmento C-terminal de colágeno tipo I (CTx) e osteocalcina em todas as pacientes.....	70
Tabela 11 - Papel dos alelos <b>P</b> , <b>p</b> , <b>X</b> e <b>x</b> nas concentrações séricas de fosfatase alcalina (FA), fragmento C-terminal de colágeno tipo I (CTx) e osteocalcina em pacientes osteoporóticas.....	71
Tabela 12 – Densidade mineral óssea dos sítios em relação aos genótipos encontrados .....	73

Tabela 13 - Presença e ausência dos alelos analisados com a DMO do rádio.....	74
Tabela 14 – Presença e ausência dos alelos analisados e comparados com a DMO na coluna.....	75
Tabela 15 – Presença e ausência dos alelos analisados e comparados com a DMO do Colo do Fêmur.....	75
Tabela 16 – Presença e ausência dos alelos analisados e comparados com a DMO do fêmur.....	76
Tabela 17- Presença e ausência dos alelos analisados e comparados com a DMO total.....	76
Tabela 18 – Presença e ausência dos alelos analisadas com e sem osteoporose na coluna.....	77
Tabela 19 – Presença e ausência dos alelos analisadas com e sem osteoporose no rádio.....	78
Tabela 20 – Presença e ausência dos alelos analisadas com e sem osteoporose no fêmur.....	79
Tabela 21 – Presença e ausência dos alelos analisadas com e sem osteoporose no Colo do Fêmur.....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

APOA	Apolipoproteína A
APOC	Apolipoproteína C
APOE	Apolipoproteína E
Arg	Arginina (aminoácido)
BMP	Proteína Morfogênica Óssea
CE	Ésteres de Colesterol
CEDOES	Centro de Diagnóstico e Pesquisa da Osteoporose do Espírito Santo
CIC	Canal de Cloreto
CTx	Fragmento C-Terminal de Colágeno Tipo I
Cys	Cisteína (aminoácido)
DAE	Doenças Associadas ao Envelhecimento
DMO	Densidade Mineral Óssea
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DXA	Absorciometria por Dupla Emissão de Raios X ( <i>Dual-energy X-ray Absorptiometry</i> )
GH	Hormônio do Crescimento
Glu	Ácido glutâmico (aminoácido)
GM-CSF	Fator Estimulante da Colônia de Macrófagos
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
Hha I	Enzima de Restrição (Gene APOE)
HSP70	Proteína Heat Shock 70
HSP90	Proteína Heat Shock 90
IGF-1	Fator de Crescimento Insulina Símile Tipo 1
IL – 1	Interleucina 1
IL – 4	Interleucina 4

IL – 6	Interleucina 6
LBCE	Laboratório de Biologia Celular do Envelhecimento
LCAT	Lectina Colesterol Acil-transferase
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
<i>mRNA</i>	Ácido Ribonucleico (Tipo: mensageiro)
pB	Pares de Bases
PTH	Hormônio Paratireoidiano
Pvu II	Enzima de Restrição (Gene RE $\alpha$ )
RE $\alpha$	Receptor de Estrogênio alfa
RVD	Receptor de Vitamina D
SERM's	Moduladores Seletivos do Receptor de Estrogênio
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF $\beta$	Fator de Crescimento Tumoral beta
TNF $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
Xba II	Enzima de Restrição (Gene RE $\alpha$ )

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>23</b>
2.1 METABOLISMO ÓSSEO.....	23
<b>2.1.1 FISIOPATOLOGIA ÓSSEA.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1.2 O PAPEL DO ESTROGÊNIO NO TECIDO ÓSSEO.....</b>	<b>27</b>
2.1.2.1 Estrutura e mecanismo de ação do Estrogênio.....	27
2.1.2.2 Polimorfismos do gene do receptor de estrogênio alfa ( <i>RE<math>\alpha</math></i> ).....	32
<b>2.1.3 O PAPEL DA APOLIPOPROTEÍNA “E” (APOE) NO TECIDO ÓSSEO.....</b>	<b>34</b>
2.1.3.1 Estrutura e mecanismo de ação da Apolipoproteína “E” (ApoE).....	35
2.1.3.2 Polimorfismos do gene da Apolipoproteína “E” (APOE) .....	38
<b>3 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>41</b>
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
4.1 APROVAÇÃO DO PROJETO.....	42
4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	42
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA.....	44
4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E POLIMORFISMOS DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (RFLP).....	45
<b>4.4.1 RECEPTOR DE ESTROGÊNIO ALFA (<i>RE<math>\alpha</math></i>).....</b>	<b>45</b>
<b>4.4.2 APOLIPOPROTEÍNA E (APOE).....</b>	<b>48</b>
4.5 ANÁLISE SOROLÓGICA E IMUNOENZIMÁTICA DAS AMOSTRAS.....	49
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
5.1 CARACTERIZAÇÕES DA AMOSTRA.....	51
5.2 EXAMES DE DXA.....	52



5.3 EXTRAÇÃO DE DNA.....	57
5.4 AMPLIFICAÇÃO POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E POLIMORFISMOS DE COMPRIMENTO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (RFLP).....	58
<b>5.4.1 GENE DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO ALFA (RE<math>\alpha</math>)...</b>	<b>58</b>
<b>5.4.2 GENE DA APOLIPOPROTEÍNA E (APOE).....</b>	<b>61</b>
5.5 RESULTADOS SOROLÓGICOS E IMUNOENZIMÁTICOS DE MARCADORES DO METABOLISMO ÓSSEO.....	64
5.6 PAPEL DOS ALELOS EM ALGUNS DOS PARÂMETROS SOROLÓGICOS DO METABOLISMO MINERAL.....	68
<b>5.6.1 GENE DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO ALFA (RE<math>\alpha</math>)...</b>	<b>68</b>
<b>5.6.2 GENE DA APOLIPOPROTEÍNA E (APOE).....</b>	<b>73</b>
6 DISCUSSÃO.....	80
7 CONCLUSÃO.....	87
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
<b>ANEXO I – Parceria do Centro de Densitometria Óssea do Espírito Santo (CEDOES).....</b>	<b>104</b>
<b>ANEXO II – Parceria do Instituto Tommasi de Pesquisa e Desenvolvimento (ITPD).....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO III – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos.....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXO IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....</b>	<b>108</b>
<b>ANEXO V – Anamnese Clínica.....</b>	<b>111</b>
<b>ANEXO VI - ARTIGO PUBLICADO: Revista Maturitas, 2010.....</b>	<b>114</b>
<b>ANEXO VII - ARTIGO SUBMETIDO 1: Revista Molecular Biology Reports, 2013 - Comprovante de submissão do artigo à revista.....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO VIII - ARTIGO SUBMETIDO 2: Revista Molecular Biology Reports, 2013 - Comprovante de submissão do artigo à revista.....</b>	<b>119</b>