



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS

BIANCA MARIA RIBEIRO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *MYD88* E *IRAK3*
EM PACIENTES COM OSTEOPOROSE E SUA RELAÇÃO
COM A RESPOSTA AO TRATAMENTO COM
BISFOSFONATOS**

Recife
2023

BIANCA MARIA RIBEIRO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *MYD88* E *IRAK3*
EM PACIENTES COM OSTEOPOROSE E SUA RELAÇÃO
COM A RESPOSTA AO TRATAMENTO COM
BISFOSFONATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Werbson Lima Guaraná

Coorientadora: Camilla Albertina Dantas de Lima

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Ribeiro de Oliveira, Bianca Maria .

Avaliação da expressão dos genes MYD88 e IRAK3 em pacientes com osteoporose e sua relação com a resposta ao tratamento com bisfosfonatos / Bianca Maria Ribeiro de Oliveira. - Recife, 2023.

50 p. : il., tab.

Orientador(a): Werbson Lima Guaraná

Coorientador(a): Camilla Albertina Dantas de Lima

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, , 2023.

Inclui referências, apêndices, anexos.

1. Genética. 2. Osteoporose. 3. Respostas ao tratamento . 4. Via TLR4/ NF-kB1. I. Guaraná, Werbson Lima. (Orientação). II. Dantas de Lima, Camilla Albertina. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

BIANCA MARIA RIBEIRO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *MYD88* E *IRAK3*
EM PACIENTES COM OSTEOPOROSE E SUA RELAÇÃO
COM A RESPOSTA AO TRATAMENTO COM
BISFOSFONATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr.
Instituição/ Departamento

Prof. Dr.
Instituição/ Departamento

Prof. Dr.
Instituição/ Departamento

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho contou com a colaboração de todos os integrantes do grupo de pesquisa, sem os quais, não seria possível a conclusão desse projeto. Portanto, agradeço primeiramente ao meu orientador Werbson Lima Guaraná, a coorientadora Camilla Albertina e a professora Paula Sandrin Garcia por todo suporte, incentivo e contribuição acadêmica. E aos demais integrantes do grupo, doutorandos, mestrandos e colegas de iniciação científica, pela colaboração direta ou indireta no desenvolvimento desse trabalho.

Gostaria de agradecer também à minha família e amigos que acreditaram em mim e me apoiaram durante toda essa caminhada.

Agradeço a Deus pela oportunidade, pelo propósito cumprido e sonho realizado. Ebenézer, até aqui nos ajudou o Senhor.

Oliveira, Bianca. **AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *MYD88* E *IRAK3* EM PACIENTES COM OSTEOPOROSE E SUA RELAÇÃO COM A RESPOSTA AO TRATAMENTO COM BISFOSFONATOS**. 2023. 46. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

A osteoporose (OP) é uma doença crônica, sistêmica e multifatorial que afeta principalmente mulheres na pós menopausa devido à diminuição nos níveis de estrogênio. A doença é caracterizada pela alta atividade dos osteoclastos (OC), células responsáveis pela reabsorção óssea, levando ao declínio da densidade mineral óssea (DMO) e, por consequência, à fragilidade óssea. O aumento da proliferação e diferenciação de OCs é estimulado pelo fator nuclear *kappa* Beta (NF- κ B1), produto da via TLR4/MYD88, que tem como regulador negativo o receptor de interleucina associado a quinase 3 (IRAK3). Por outro lado, existem uma diversa gama de fármacos para o tratamento da OP, tendo como primeira linha, os antirreabsortivos, como os bisfosfonatos que visam diminuir o número e, por consequência, a atividade dos OCs. Entretanto, uma parcela dos pacientes mesmo em tratamento com bisfosfonatos não apresenta o aumento esperado da DMO, sendo considerados não responsivos ao tratamento. Nesse contexto a maior atividade da via TLR4/MYD88 poderia contribuir para uma pior resposta ao tratamento com bisfosfonatos em pacientes com osteoporose, devido à uma maior produção do NF- κ B1. Assim, o projeto teve como objetivo avaliar o perfil de expressão dos genes *MYD88* e *IRAK3* diante da resposta terapêutica de pacientes com OP, além de correlacionar com os dados clínicos e laboratoriais presentes nos prontuários. Para isso, foram utilizadas amostras de RNA divididas em 20 pacientes responsivas (OP-R) e 20 não-responsivas (OP-NR), atendidas no ambulatório de reumatologia do Hospital das Clínicas / UFPE. Foi realizada síntese de cDNA para todas as amostras e o ensaio de expressão gênica para os genes alvos e de referência, *GAPDH* e *RPLP0*. Para todas as análises e os respectivos gráficos foi utilizado o Software GraphPad Prism versão 8.00. Foi realizado o teste Spearman para análises de correlação com os marcadores séricos, cálcio, vitamina D e hormônio da paratireoide (PTH). O teste Mann-Whitney foi utilizado para os valores de p da expressão relativa dos genes. Os resultados mostraram uma maior expressão dos genes *MYD88* ($FC=2,23 \pm 1,54$, $p= 0,0016$) e *IRAK3* ($FC=2,02 \pm 0,46$, $p= 0,0032$) no grupo de pacientes OP-NR em comparação com o grupo OP-R. Contudo, não foi observado correlação entre os níveis de expressão dos genes com os marcadores séricos Vitamina D, PTH e cálcio. Desta forma concluímos que o aumento da expressão dos genes *IRAK3* e *MYD88* pode ter impacto no perfil de resposta à terapia com bisfosfonatos, servindo como base para estudos futuros de novos marcadores de resposta terapêuticos para tratamento da osteoporose.

Palavras-chave: Osteoporose. Menopausa. Osteoclasto. DMO.

Oliveira, Bianca. **AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *MYD88* E *IRAK3* EM PACIENTES COM OSTEOPOROSE E SUA RELAÇÃO COM A RESPOSTA AO TRATAMENTO COM BISFOSFONATOS**. 2023. 46. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

Osteoporosis (OP) is a chronic, systemic, and multifactorial disease that primarily affects postmenopausal women due to decreased estrogen levels. The disease is characterized by high activity of osteoclasts (OC), cells responsible for bone resorption, leading to a decline in bone mineral density (BMD) and, consequently, bone fragility. The increase in proliferation and differentiation of OCs is stimulated by the nuclear factor kappa Beta (NF- κ B1), a product of the TLR4/MYD88 pathway, which has the interleukin-associated kinase 3 receptor (IRAK3) as a negative regulator. On the other hand, there are a diverse range of drugs for the treatment of OP, with antiresorptives, such as bisphosphonates that aim to decrease the number and, consequently, the activity of OCs, being the first-choice of treatment. However, a portion of patients even under treatment with bisphosphonates do not present the expected increase in BMD, being considered non-responsive to treatment. In this context, greater activity of the TLR4/MYD88 pathway could contribute to a worse response to treatment with bisphosphonates in patients with osteoporosis, due to greater production of NF- κ B1. Thus, the project aimed to evaluate the expression profile of *MYD88* and *IRAK3* genes in compare to therapeutic response in patients with OP, in addition to correlating with clinical and laboratory data present in medical records. For this, RNA samples from a total of 40 patients divided into responsive (OP-R) and non-responsive (OP-NR), attended at the rheumatology clinic of Hospital das Clínicas / UFPE were used. The cDNA synthesis and gene expression assay were performed for the housekeeping genes GAPDH and RPLP0. For all analyses and their respective graphs, GraphPad Prism version 8.00 statistical software was used. The Spearman test was performed for correlation analyses with serum markers, calcium, vitamin D and parathyroid hormone (PTH). The Mann-Whitney test was used for p values of relative gene expression. The results showed a higher expression of *MYD88* ($FC=2.23 \pm 1.54$, $p=0.0016$) and *IRAK3* ($FC=2.02 \pm 0.46$, $p=0.0032$) genes in the OP-NR group compared to the OP-R group. However, no correlation was observed between gene expression levels with serum markers Vitamin D, PTH and calcium. Thus we conclude that increased expression of *IRAK3* and *MYD88* genes may impact the response profile to therapy with bisphosphonates, serving as a basis for future studies of new therapeutic response markers for osteoporosis treatment.

Key words: Osteoporosis. Menopause. Osteoclast. BMD.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura óssea	18
Figura 2 – Remodelação óssea	19
Figura 3 – Diferença do osso trabecular saudável e osteoporótico	20
Figura 4 – Papel do estrogênio no ciclo de remodelação óssea	22
Figura 5 – Mecanismo de ação dos bisfosfonatos	25
Figura 6 – Via MYD88/ NF- κ B1	28
Figura 7 – Localização do gene <i>MYD88</i>	29
Figura 8 – Localização do gene <i>IRAK3</i>	30
Figura 9 – Vias do NF- κ B1	32
Figura 10 – Esquema geral da metodologia utilizada	35
Figura 11 – Expressão relativa do <i>MYD88</i> em pacientes com osteoporose	39
Figura 12 – Expressão relativa do <i>IRAK3</i> em pacientes com osteoporose	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação de osteoporose em T-score de acordo com a OMS	24
Tabela 2 – Características clínico-demográficas da população de estudo	37
Tabela 3 – Marcadores bioquímicos	38
Tabela 4 – Análise de correlação do <i>MYD88</i> com marcadores bioquímicos	38
Tabela 5 – Análise de correlação do <i>IRAK3</i> com marcadores bioquímicos	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	DNA complementar
Cq	Ciclo de quantificação
CTX	Telopeptídeo de ligação cruzada carboxi-terminal do colágeno tipo I
DAMP's	Padrões moleculares associados ao dano
DD	Domínio de morte N-terminal
DMO	Densidade mineral óssea
DEXA	Absorciometria por raios-X com dupla energia
FC	Fold Change
FN	Fator de Normalização
FPPS	Farnesil pirofosfato sintase
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
IL	Interleucina
IL-R	Receptor de Interleucina
INT	Domínio intermediário
IRAK	Quinase associada ao receptor de interleucina 1
IKB	Proteína inibidora de NF-Kb
mAb	Anticorpo monoclonal
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos
MYD88	Proteína de resposta primária de diferenciação Mieloide
NF-Kb1	Fator nuclear kappa Beta
NTX	Ligante do receptor do ativador do fator nuclear kappa B
OB	Osteoblasto
OC	Osteoclasto
OMS	Organização Mundial da Saúde
OP	Osteoporose
OPG	Osteoprotegerina
PAMP's	Padrões moleculares associados ao patógeno
PTH	Hormônio da paratireoide
QR	Quantidade relativa
QRN	Quantidade relativa normalizada

RANKL	Interleucina do fator nuclear kappa beta
RNA	Ácido desoxiribonucleico
RPLP0	Proteína ribossomal P0
SBEM-SP	Sociedade Brasileira de endocrinologia e metabologia regional
SPSERMs	Modulador seletivo do receptor de estrogênio
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
TIR	Toll/il-1
TIRAP	Proteína da membrana proximal do receptor
TLR4	Receptor Toll-like4
TNFa	Fator de necrose tumoral alfa
TRAF6	Receptor TNF associado ao fator 6

Sumário

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	Tecido ósseo	17
2.1.1	Estrutura	17
2.1.2	Ciclo de remodelação óssea.....	17
2.2	Osteoporose	19
2.2.1	Epidemiologia	19
2.2.2	Tipos De Osteoporose	20
2.3	Patogênese da OP pós menopausa	20
2.4	Diagnóstico da OP	22
2.5	Tratamento da OP.....	23
2.5.1	Drogas Antirreabsortivas	24
2.5.2	Drogas anabólicas	25
2.5.3	Resistência ao Tratamento	26
2.6	A via MYD88/ NF-KB1	26
2.6.1	MYD88	27
2.6.2	IRAK3	28
2.6.3	NF-kB1.....	30
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo Geral	32
3.2	Objetivos Específicos.....	32
4	METODOLOGIA	33
4.1	Desenho do estudo	33
4.2	Isolamento de mRNA e síntese de Cdna	33
4.3	Ensaio de expressão gênica	34
4.4	Análise estatística	35
5	RESULTADOS	36
5.1	Características clínicas da população do estudo	36
5.2	Análise de expressão gênica	38
7	CONCLUSÃO	44

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose (OP) é uma doença metabólica e silenciosa que afeta a densidade mineral óssea (DMO), caracterizada por um aumento na proliferação, diferenciação e sobrevivência dos osteoclastos. Estímulos de quimiocinas, hormônios e fatores de crescimento interferem diretamente nessas células, assim, a reabsorção do tecido ósseo ultrapassa o limiar fisiológico, e à medida em que a DMO declina, o osso trabecular se afina, tornando-se mais frágil e mais suscetível a fraturas. A menopausa é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento dessa doença, devido à baixa de estrogênio que entre outras funções, funciona como regulador negativo da via de diferenciação dos osteoclastos (OCs).

A terapia de escolha para a diminuição da perda da DMO na OP são os antirreabsortivos, que têm como principal representante os fármacos da classe dos bisfosfonatos. A terapia com bisfosfonatos tem como objetivo a diminuição do processo de reabsorção óssea pela inibição da atividade dos OCs. Contudo, apesar de sua eficácia comprovada, uma parcela dos pacientes continua apresentando declínio na DMO mesmo com o uso de bisfosfonatos mais potentes.

Um dos possíveis fatores responsáveis pela falha terapêutica no tratamento da OP pode ter relação com as vias de regulam a multiplicação e diferenciação dos OCs como a via MYD88/NF- κ B1. Essa via é ativada pelo receptor toll-like 4 (TLR4) ou pelo receptor de interleucina 1 (IL-1R) e regulada negativamente pelo receptor de interleucina associado a quinase 3 (IRAK3). Contudo, na literatura essa via apresentou resultados conflitantes em relação ao seu papel na regeneração óssea.

Diante dessa perspectiva, o presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão dos genes *MYD88* e *IRAK3*, em pacientes com osteoporose para melhor elucidação da interferência da via nessa doença, além de correlacionar a expressão dos genes com marcadores bioquímicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tecido ósseo

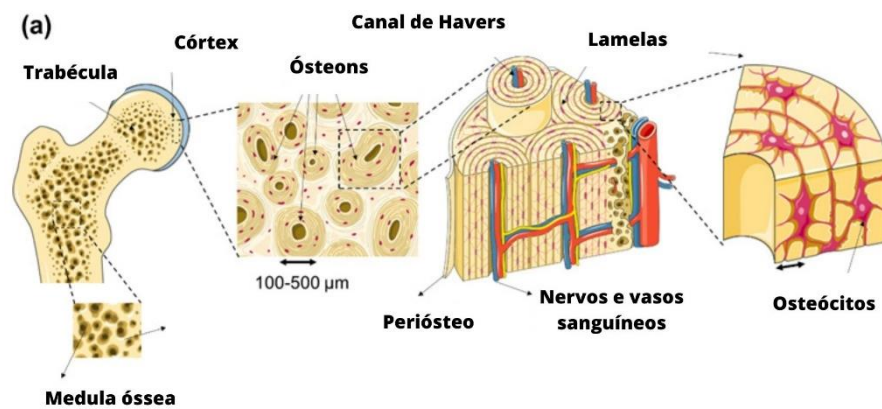
O osso é formado por uma porção compacta, que corresponde a parte mais externa e a porção esponjosa que é preenchida pela medula óssea, sendo essa parte, remodelada de forma mais acelerada. HART et al., 2020;

A nível celular, três células são responsáveis pela atividade do tecido, osteoclastos, osteoblastos e osteócitos. Os OCs que são células catabólicas, e derivam do sistema monócito-macrófago, quando essas células são estimuladas pelo fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) e ativador do receptor de NF-kB ligante (RANKL), elas se fundem formando a célula reabsortiva que tem tempo de vida limitado em até quatro semanas após a osteoclastogênese. De modo contrário, funcionam os osteoblastos (OBs), responsáveis por sintetizar a matriz óssea. Após isso, podem sofrer apoptose ou ainda se diferenciar em células de superfície ou osteócitos. As células de superfície formam uma rede sinalizadora do osso, funcionando como uma célula reguladora, por meio dela, os estímulos se transformam em sinais, sejam eles de síntese ou reabsorção. (ARMAS; RECKER, 2012)

2.1.1 Estrutura

O sistema de Havers é a parte funcional do tecido, a reabsorção forma lacunas, que são posteriormente preenchidas pelos osteoblastos, as lacunas se dispõem ao redor do canal de Havers onde estão os vasos sanguíneos e os nervos. Estima-se que a cada ano aproximadamente 10% do esqueleto seja reconstituído. Desse modo, osteoblastos, osteoclastos e osteócitos trabalham em conjunto para a manutenção do tecido, que ocorre de maneira fisiológica. (HART et al., 2020; LOPES et al., 2018) **(Figura1)**

Figura 1 : Estrutura óssea



O osso se divide em córtex e trabécula, onde está contida a medula óssea, o tecido se apresenta em forma de lamelas, que são os ósteons onde ocorre a reabsorção. Dentro deles está o canal de havers responsável por nutrir o osso. Fonte: Adaptado Lopes et al ., (2018).

2.1.2 Ciclo de remodelação óssea

A remodelação óssea pode ser dividida em cinco fases, a chegada de precursores osteoclásticos marcam o período de ativação onde a superfície do osso é exposta. As células podem ser direcionadas para um local específico do osso em casos de fraturas ou distribuídas de modo aleatório quando trata-se de um processo sistêmico, como é o caso da OP. Na reabsorção o OC induz uma alteração de pH tornando-o ácido, de modo que enzimas como metaloproteinases de matriz e proteases sejam ativadas e ocorra destruição de colágeno e dos cristais de hidroxiapatita. A próxima fase, que é a reversão, acontece por meio da interleucina (IL) 6 e outras citocinas. Através da sinalização os osteoblastos e seus precursores são recrutados para a fase seguinte, a formação, onde a matriz é reconstituída e tem-se um novo processo de mineralização. A quinta e última fase é a de terminação, que é caracterizada pela diferenciação dos OBs em osteócitos. **(Figura 2)** (BHATNAGAR; KEKATPURE, 2022).

Figura 2: Remodelação óssea

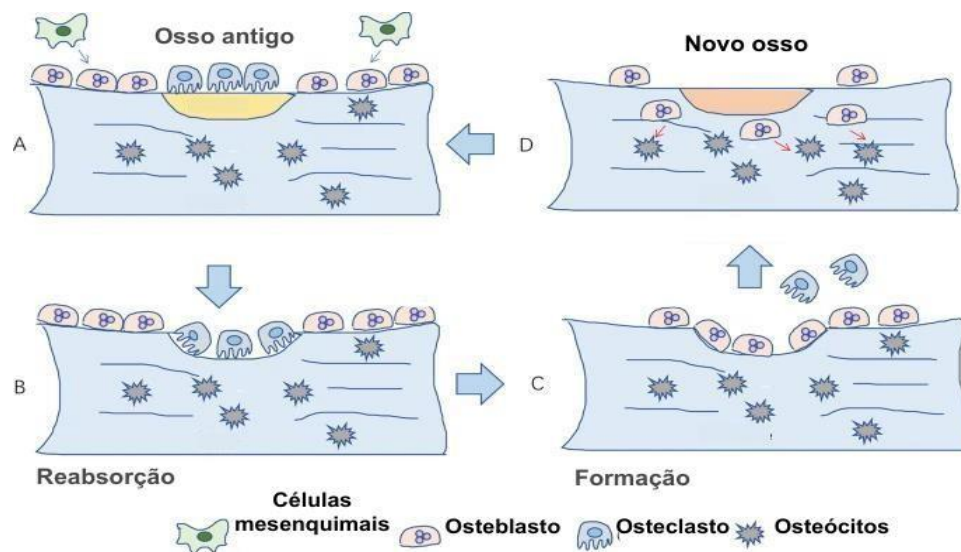


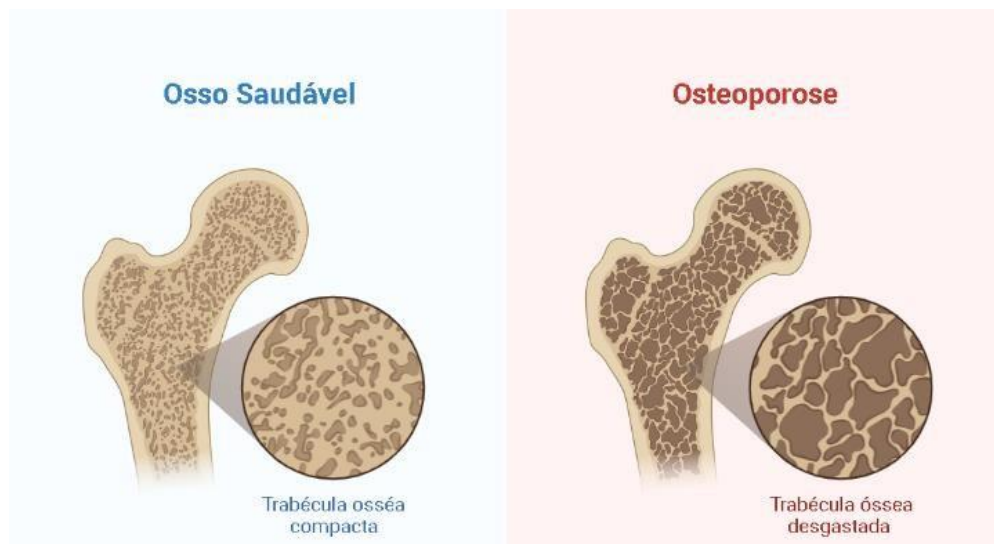
Figura 2: A: recrutamento de osteoclastos para local de dano. B: Degradação do conteúdo ósseo pelos osteoclastos. C: Fase 3 e 4 reversão e início da atividade dos osteoclastos. D: Fase De terminação, onde os osteoblastos se diferenciam. Fonte: adaptado Liang (2022).

Todo esse processo de remodelamento ósseo ocorre ao decorrer da vida, tendo início ainda na fase uterina, mas esse processo vai se tornando mais lento logo após a puberdade e inicia um processo de declínio com o envelhecimento. Em mulheres, ocorre cerca de quatro anos antes da menopausa, alterando diretamente a estrutura óssea. Indivíduos abaixo dos 40 anos apresentam o perióstio espesso, rico em OBs. Na cortical, possuem grande quantidade de canais Havers e trabéculas do osso esponjoso espessas. Enquanto indivíduos com mais de 65 anos apresentam perióstio fino, pobre em células osteogênicas, e substituição gradual da camada osteogênica por tecido fibroso, correspondendo a um desequilíbrio do turnover ósseo e redução da atividade osteoblástica. (GIORDANO et al., 2016)

2.2 Osteoporose

O metabolismo ósseo é um processo fisiológico saudável quando em equilíbrio, no entanto, fatores imunes, genéticos e hormonais podem gerar um desbalanço entre absorção e reabsorção, ocasionando a OP. A OP é uma doença crônica, metabólica e silenciosa, caracterizada pela perda acelerada do conteúdo mineral do osso, alterando uma de suas principais características, a resistência (**Figura 3**). A coluna vertebral e o fêmur são os locais mais afetados. Na maioria dos casos, a OP é descoberta após ocorrência de fraturas, o que afeta diretamente a qualidade de vida dos indivíduos acometidos pela doença. De modo geral, ocorre um estímulo aumentado dos osteoclastos, seja no aumento da diferenciação ou da sobrevivência dessas células. Dessa forma, há a diminuição da DMO enquanto há o aumento da fragilidade por não ter resposta de formação óssea compensatória. (LOPES et al., 2018; CHENG et al., 2022)

Figura 3: Diferença do osso trabecular saudável e osteoporótico



Fonte: elaborado pelo autor pelo BioRender (2023)

2.2.1 Epidemiologia

Os dados epidemiológicos da osteoporose são considerados subclassificados, isso se dá por dois motivos, o primeiro é o diagnóstico tardio por se tratar de uma doença silenciosa e o segundo se deve à falta de estudos mais recentes. De acordo com a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia Regional São Paulo (SBEM-SP) 200 milhões de pessoas no mundo são afetadas pela doença, 5% desse

número corresponde ao território brasileiro. Apesar de serem menos susceptíveis estima-se que a incidência de OP nos homens deve aumentar consideravelmente até 2050.

Os Relatórios de recomendação do Ministério da Saúde apontam que uma em cada três mulheres e um em cada três homens no mundo, acima de 50 anos irão ter algum tipo de fratura osteoporótica sendo essa a consequência mais grave OP e a principal responsável por internamentos e cirurgias. Os principais sítios de fratura são o antebraço distal (30%), quadril (12%), úmero (8%), costelas (6%) e coluna (4%). O custo anual aproximado no Brasil devido a OP é de 310 milhões de dólares.

2.2.2 Tipos De Osteoporose

De modo geral a osteoporose é a perda da DMO, e pode ser classificada em primária e secundária. Nos casos de OP primária, tem-se a perda tecidual com causa óssea isolada. Como é o caso da OP juvenil, que é marcada pela idade do paciente e seu score ósseo, junto ao histórico de fraturas, sendo o fator genético principal responsável, como mutações na via WNT. A OP pós menopausa também é classificada por primária e ocorre devido à baixa de estrogênio, é a forma mais prevalente, e se agrava com o avanço da idade, com o maior comprometimento do osso trabecular, enquanto o osso cortical mantém metabolismo estabilizado. (VLASHI et al., 2022)

Nos homens predomina-se a OP secundária, entretanto também podem ocorrer casos relacionados a senilidade e classificam-se, portanto, como OP primária. Na OP secundária tem-se o declínio da DMO associado a distúrbios metabólicos seja pela doença propriamente dita ou pelo uso de medicamentos, como por exemplo, glicocorticoides que inibem a atividade de osteoblastos enquanto estimulam osteoclastos. Além disso, pode-se citar como outras causas de OP secundária o estado hiperglicêmico na diabetes mellitus e o mieloma múltiplo que estimula apoptose de osteoblastos e inflamação sistêmica e estéril. (NUTI et al., 2018).

2.3 Patogênese da OP pós menopausa

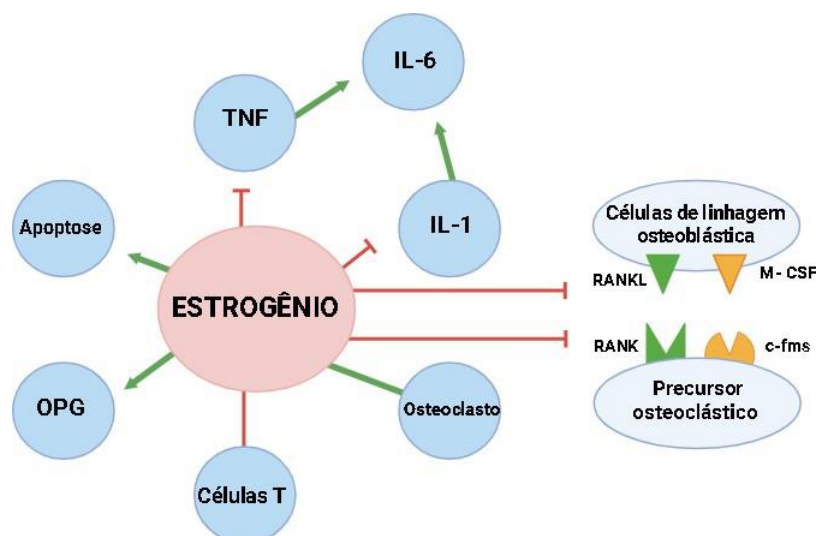
De acordo com o Ministério da Saúde, a menopausa é o período em que a mulher perde a capacidade de ter filho, sendo marcado por quedas

hormonais, principalmente do estrogênio, ocorrendo em média aos 51 anos de idade e sendo confirmada após um período de 12 meses sem menstruação.

O estrogênio tem efeito protetivo contra a osteoporose, seus receptores estão expressos em todas as células ósseas, tendo atividade significativa nesse tecido, tornando a menopausa um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença. No sistema imune a baixa de estrogênio aumenta a liberação de citocinas pró inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF α), IL-1 com a polarização de monócitos M1 (principal fonte de OCs) além promover a super ativação de linfócitos T CD4 com alta expressão do receptor ativador do ligante do fator nuclear kappa Beta (RANKL). (CHENG et al.,2022; ZHANG et al.,2022).

O estrogênio também é responsável por ativar a via Wnt/ β -catenina. Quando o ligante Wnt se acopla ao receptor, a β -catenina não é marcada para degradação e se transloca para o núcleo permitindo a transcrição de genes alvos que favorecem a osteoblastogênese, potencializando a síntese óssea. A via da osteoprotegerina (OPG), RANK/RANKL, tem como produto o fator nuclear kappa Beta (NF- κ B) que estimula a atividade osteoclástica. Na presença de estrógeno, a OPG é liberada e impede a ligação de receptor do ativador do NF- κ B (RANK) com o RANKL. **(Figura 4)** (VLASHI et al., 2022).

Figura 4: Papel do estrogênio no ciclo de remodelação óssea



O estrogênio é um importante fator protetivo contra a osteoporose, ele atua na diminuição da maturação dos osteoclastos, inibindo citocinas pró inflamatórias como TNF, IL-6 e IL-1 e fatores de crescimento RANKL e M-CSF. Além de diminuir a sobrevivência dos osteoclastos. Fonte: Adaptado BHATNAGAR,(2022)

Entretanto, na menopausa, esse estímulo protetivo é interrompido e a ligação gera fatores de transcrição que estimulam a maturação e diferenciação de OCs (BHATNAGAR; KEKATPURE, 2022)

2.4. Diagnóstico da OP

O rastreio da OP em mulheres é obrigatório a partir dos 65 anos, contudo, histórico familiar de osteoporose grave, amenorréia pré-menopausa por um período superior a 6 meses, ingestão inadequada de cálcio (< 1200 mg/dia), tabagismo e alcoolismo, são considerados fatores de risco e a presença de dois ou mais desses fatores sugerem rastreio a partir dos 45 anos de idade. (KANIS et al., 2019)

O diagnóstico é realizado através de exames de imagem, onde se avalia o conteúdo mineral ósseo dado em g/cm² e risco de fratura. O padrão ouro é a densitometria de raio X (DXA) que foi incluída no Sistema Único de Saúde desde 1999 pela portaria Nº 1.327.

O exame é realizado no fêmur e coluna lombar, através do densitômetro. O feixe de Raio X duplo permite melhor visualização dos tecidos mais espessos e mais densos, como o osso A DMO fornece a quantidade de massa óssea por unidade de área permitindo a análise dos dados, que é feita por meio de scores. A média de valores da DMO gera um desvio padrão onde se classifica a perda de massa óssea. O T-score é o critério utilizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e usa como parâmetro a média da DMO de pessoas com 20 anos, que classifica os pacientes de acordo com o declínio da DMO. Quando o resultado é maior ou igual a -1, faz referência a perda óssea natural, valores entre -1 e -2,5 são classificados como osteopenia e indica uma perda óssea discreta que quando não tratada pode evoluir para a OP, menor de -2,5 o indivíduo se enquadra como osteoporótico nesse caso é quando há risco de fratura. Enquanto a presença de fraturas e T-score menor que dois e meio é indício de um quadro de osteoporose grave (**Tabela 1**). (SOUZA, 2010).

Tabela 1. Classificação de osteoporose em T-score de acordo com a OMS.

T- score	Classificação
$\geq - 1.0$	Normal
$< - 1.0 \geq - 2.5$	Osteopenia
$\leq - 2.5$	Osteoporose
$\leq - 2.5$ com fratura	Osteoporose severa

Fonte: Adaptado, Baccaro et al (2015)

A periodicidade da reavaliação varia de acordo com a idade e diagnóstico anterior, mulheres abaixo de 65 anos que não apresentam debilidade óssea realizam o exame a cada 5 a 10 anos, e as com histórico de osteopenia podem variar de 1 a 5 anos, a depender do grau de perda óssea. Enquanto é recomendado para mulheres acima de 65 anos um período máximo de cinco anos entre os exames mesmo sem diagnóstico prévio de OP. Outros exames de imagem também podem auxiliar no manejo da OP como o ultrassom ósseo que fornece parâmetros de integridade e é realizado nos ossos da mão e calcâneo, além da ressonância magnética da coluna usada para avaliar fraturas. (BACCARO et al., 2015).

A renovação óssea gera produtos que funcionam como biomarcadores, que apesar de não diagnosticarem servem como base para prognóstico, e acompanhamento de tratamento. O telopeptídeo de ligação cruzada amino-terminal do colágeno tipo I (NTX) e telopeptídeo de ligação cruzada carboxi-terminal do colágeno tipo I (CTX) funcionam como marcadores de reabsorção, são produtos derivados da degradação do colágeno e estão mais expressos em pacientes com osteoporose, diminuindo no decorrer do tratamento (NAGY et al., 2020).

Enquanto a fosfatase alcalina serve como marcador de formação. Essa molécula é liberada pelo OBs no seu processo inicial de diferenciação, enquanto a osteocalcina corresponde a parte de diferenciação em osteócitos, o aumento dessas moléculas indicam uma formação óssea eficaz. (QU et al., 2019).

2.5. Tratamento da OP

O tratamento da osteoporose é dividido entre duas classes medicamentosas, as antirreabsortivas e as drogas anabólicas. Além disso, pode ser necessário a

suplementação de cálcio e vitamina D, principal mineral contido no osso e o regulador da sua absorção respectivamente, para uma melhor taxa de remineralização. Ao mesmo tempo, é recomendada a prática de atividade física que confere força e resistência ósseo-esquelética sendo de grande importância para a prevenção de fraturas osteoporóticas. (LIANG et al., 2022).

2.5.1. Drogas Antirreabsortivas

Essa classe tem como alvo a inibição da atividade e maturação dos osteoclastos. Nela estão inclusos os bisfosfonatos e os anticorpos monoclonais. Os bisfosfonatos são a primeira linha de tratamento, e possuem dois sítios de ação, o primeiro deles é na superfície óssea, bloqueando a liberação de citocinas inflamatórias. Já o segundo sítio é enzimático e depende da estrutura química do fármaco. Bisfosfonatos nitrogenados como por exemplo alendronato de sódio e ácido zoledrônico, se ligam na enzima farnesil pirofosfato sintase (FPPS), inibindo a via do mevalonato e levando à apoptose do OC. Como exemplo dos bisfosfonatos não nitrogenados podemos citar o etidronato, que ao ser absorvido pela célula funciona como uma forma inativa de adenosina trifosfato (ATP), levando a perda de função e morte da célula. O uso prolongado dessas drogas se associa a efeitos gastrintestinais pela citotoxicidade e baixa biodisponibilidade, além de osteonecrose mandibular (TONK et al., 2022). **(Figura 5)**

Figura 5: Mecanismos de ação dos bifosfonatos

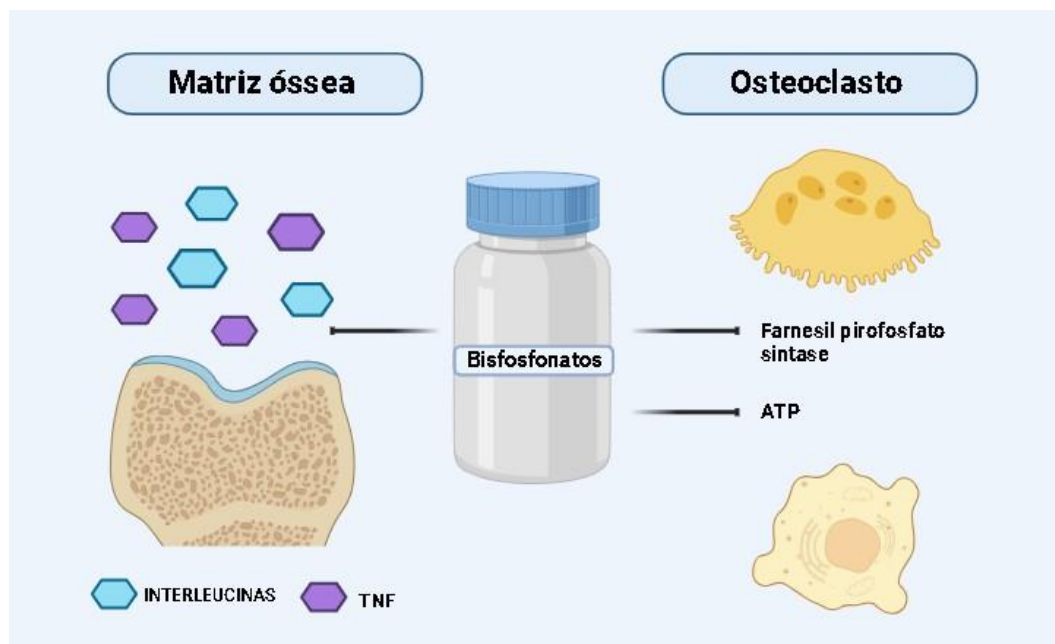


Figura 5: Os bifosfonatos são divididos em nitrogenados e não nitrogenados, os nitrogenados agem tanto inibindo a liberação de citocinas pela matriz óssea quando na inibição da enzima farnesil pirofosfato sintase, enquanto os não nitrogenados funcionam como uma forma inativa de ATP, ambos promovem a apoptose do osteoclasto por uma inibição do metabolismo celular. Fonte: elaborado pelo próprio autor pelo BioRender (2023)

Denosumabe, é um anticorpo monoclonal (mAb), contra RANKL, essa é uma molécula liberada pelos OBs que pode se ligar a OC e seus precursores estimulando sua diferenciação, ao se ligar com o RANKL o denosumabe impede a ligação RANK-RANKL diminuindo a ativação e diferenciação dos OCs. Apesar de efeitos comprovados, a descontinuação do fármaco está relacionada com efeito rebote, diminuindo a DMO de forma rápida. Moduladores seletivos de receptores de estrogênio (SERMs) como o raloxifeno, são um terceiro tipo de droga que se enquadram como antirreabsortiva, atuando nos receptores de estrogênio mimetizando sua ação, tem efeitos diferentes em cada tipo de tecido, funcionam como agonistas dos receptores de estrogênio no tecido ósseo suprimindo RANKL e consequentemente, a atividade dos OCs, enquanto tem função antagonistas nas mamas, vantagem que se sobrepõe à terapia hormonal de estrogênio pois o estímulo simulado de estrogênio é considerado um fator de risco para o câncer de mama (CHANDRA; RAJAWAT, 2021).

2.5.2 Drogas anabólicas

Os fármacos pertencentes a esse grupo, atuam aumentando a função e viabilidade dos osteoblastos e por consequência aumentando deposição de íons cálcio e fosfato no tecido ósseo, estimulando a mineralização óssea. Drogas associadas ao Paratormônio como a Teriparatida, que é um análogo do hormônio da paratireoide (PTH), atua como o hormônio mobilizando cálcio e estimulando os osteoblastos na construção de matriz óssea, entretanto tem efeitos dose dependente e o aumento desse estímulo pode afetar positivamente os OCs. (TONK et al., 2022).

Pertecem ainda a essa classe, um outro tipo de mAB, diferente do já citados, o Romosozumab que possui função anabólica, age nos OCs e tem como alvo a esclerotina. Essa molécula se torna mais expressa com o envelhecimento e funciona como um feedback negativo para a via WNT. Esse fármaco, bloqueia a atividade da esclerotina e mantém ativa a via WNT, responsável pela transcrição de fatores ligados à osteogênese. (TONK et al., 2022).

2.5.3 Resistência ao Tratamento

Os bisfosfonatos são os fármacos prescritos com maior frequência, devido ao baixo custo e uma boa resposta na redução da fragilidade óssea. Contudo, uma parcela da população não apresenta resposta ou uma resposta inadequada a esse tratamento (DIEZ-PEREZ et al., 2012).

Os pacientes que fazem uso dos fármacos de forma correta e apresentam declínio da DMO ou reincidência de fraturas são considerados refratários. Para esses casos, são recomendados uma nova abordagem terapêutica, tendo como alternativas a troca de antirreabsortivos ou ainda a adição de drogas anabólicas (CAIRES et al., 2017). Além disso, a falha no tratamento pode ser causada por diversos fatores como período de duração do tratamento, causas secundárias à osteoporose ou fatores genéticos. (Villagómez et al., 2023)

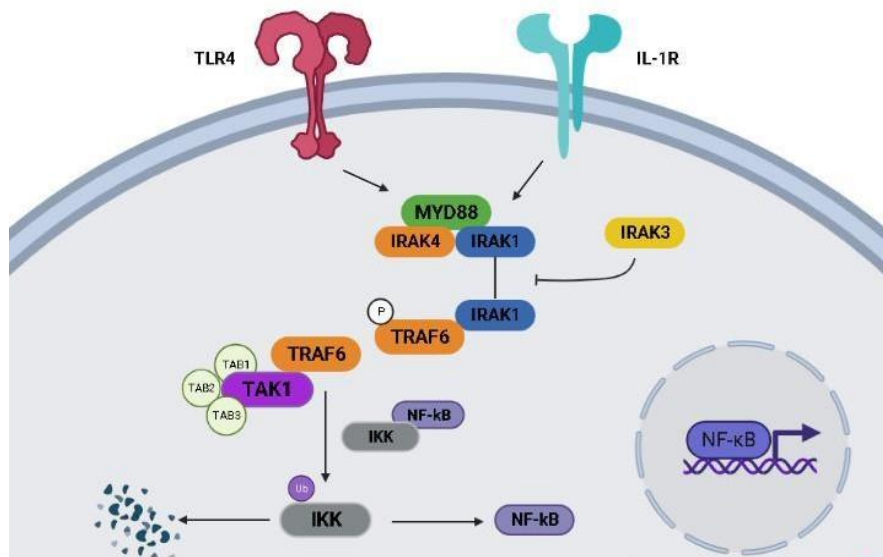
2.6 A via MYD88/ NF-KB1

A via dependente da proteína de resposta primária de diferenciação mielóide 88 (MYD88) possui 2 tipos de iniciadores, o TLR4 e o IL-1R, ambos receptores transmembranares contendo na porção citoplasmática o domínio do receptor Toll/IL-1 (TIR). A diferenciação se dá na porção extracelular, o TLR4 é rico em leucinas enquanto o IL-1R possui cerca de três domínios semelhantes a imunoglobulinas. Esses receptores estão expressos nas células ósseas e imunes e a sinalização iniciada por TLR4 e IL-1R se relaciona com osteoclastogênese e aumento da sobrevivência de OC's respectivamente. (BRAUN; ZWERINA, 2011; ZHOU et al., 2022; DE NARDO, 2015; TAKEDA, 2004).

Os TLR4 reconhecem Padrões moleculares associados ao dano (DAMP's) e Padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP'S) formando homo ou heterodímeros enquanto o IL-1R se liga a interleucina-1 para iniciar a via. A porção TIR, comum a esses receptores, é reconhecida pela proteína da membrana proximal do receptor (TIRAP), essa molécula recruta outras para formação de um centro organizador supramolecular (SMOC), também conhecido como mydssoma. Neste complexo estão de 6 a 8 moléculas de MYD88, interagindo com até 4 moléculas de quinase associada ao receptor de interleucina-1 (IRAK) IRAK 1, 2 e 4. **(Figura 6)** (KAWASAKI; KAWAI, 2014; VERSTAK et al., 2014)

Figura 6: Via MYD88/NF- κ B.

bin



A via MYD88/NF- κ B pode ser ativada pelo TLR4 com também pelo IL-1R, a partir disso é recrutada uma proteína adaptadora, a MYD88 que se acopla a família de quinases e resulta na ativação do TRAF6 e posteriormente de TAK1, dessa forma a porção inibitória do NF- κ B é marcada para a degradação via proteossoma, enquanto os dímeros de NF- κ B se translocam pra o núcleo. Fonte: elaborado pelo autor (2023).

O IRAK1 tem interação temporária no mydssoma, ele promove a fosforilação e a ubiquitinação do receptor TNF associado ao fator 6 (TRAF6) através da E3 ubiquitina ligase TRAF6. Após esse processo a TRAF6 é ativada e passa a interagir com TAK1 e suas subunidades regulatórias TAB1, TAB2 e TAB. (KAWASAKI; KAWAI, 2014; VERSTAK et al., 2014)

TAK1 se liga ao complexo Ikb quinase (IKK), formado pelas porções IKK α , IKK β e IKK γ . Quando ativado, o complexo IKK fosforila a proteína inibidora de NF- κ B (I κ B α), marcando-a para degradação no proteossoma. O NF- κ B se localiza no citoplasma celular pode então se translocar livremente para o núcleo para iniciar transcrição de fatores inflamatórios como pró interleucinas. (BIN LV et al., 2022)

2.6.1 MYD88

No citosol, a proteína MYD88 é responsável por interagir com os demais componentes da via, configurando a ela a função de adaptadora por meio dos seus domínios, onde ocorrem diferentes ligações. O domínio TIR C-terminal medeia a interação com outras proteínas contendo o domínio TIR, sendo capaz de se ligar de forma homóloga com outras moléculas MYD88 e de forma heteróloga interagindo com o domínio TIR dos receptores.

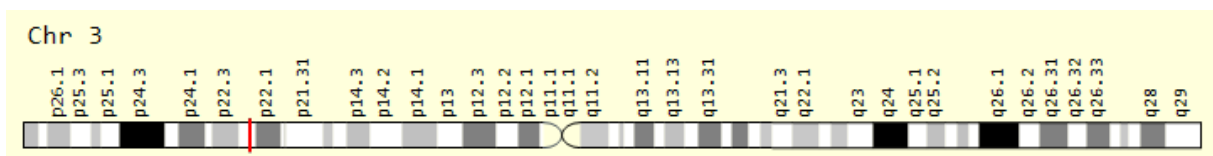
O domínio de morte N-terminal (DD) associa-se aos membros da família IRAK enquanto o domínio intermediário (INT) de MYD88 une as porções TIR e o DD, além de auxiliar na ativação do IRAK4. De acordo com Su-Chang Lin (2010), a estrutura protéica do mydssoma seria dividida em 4 camadas, sendo as

inferiores de MYD88, que recrutaria primeiro IRAK4 e o complexo MYD88/IRAK4 permitiria a interação do IRAK2 (DEGUINE; BARTON, 2014; LIN; LO; WU, 2010; DELIZ-AGUIRRE et al., 2021)

2.6.1.1 Gene *MYD88*

O gene *MYD88* está localizado no cromossomo 3, braço curto, região dois, banda dois, sub- banda dois (3p22.2), (**Figura 7**). Possui cinco éxons e 15 transcritos podem ser resultados do splicing alternativo. Este gene codifica uma proteína adaptadora citosólica que desempenha um papel central na resposta imune inata e adaptativa, o MYD88 que serve como adaptador de transdução de sinal. (ID Ensembl: ENSG00000172936) (ID NCBI:4615)

Figura 7: Localização do gene *MYD88*.



Fonte: ID GeneCars: gc03p038211

2.6.1.2 *MYD88* na osteoporose

O estudo de VIJAYAN (2013) comprovou os níveis elevados de MYD88 em camundongos com menopausa induzida. Os níveis de MYD88 foram elevados, quando comparados ao grupo controle, e reduziram gradativamente com alendronato de sódio e a metionina. Além disso, o aumento da sinalização de MYD88 correspondeu ao aumento da fosfatase ácida B resistente ao târtaro (TRAP5b), marcador específico da atividade de OC's.

Além disso em outras doenças associadas ao desequilíbrio do metabolismo ósseo, como a osteomielite, culturas de células que tiveram o MYD88 silenciado obtiveram menor formação de osteoclastos, apesar de ainda sofrerem diferenciação ao serem estimuladas por RANKL. (PUTNAM et al., 2019)

2.6.2 IRAK3

A família de IRAK's é composta por 4 tipos de quinases, possuem em comum o domínio de morte N-terminal (DDs) de aproximadamente 100 aminoácidos que facilitam a oligomerização com as moléculas MYD88, e regiões ricas em resíduos de prolina, serina e treonina local, onde ocorre hiperfosforilação durante a sinalização. IRAK 1, 2 e 3 podem interagir com o TRAF6 através do domínio C-terminal, além disso possuem domínios quinase, exceto o IRAK3 que não possui resíduos de aspartato no sítio ativo, perdendo sua função, por esse motivo é denominado pseudoquinase (DU et al., 2014).

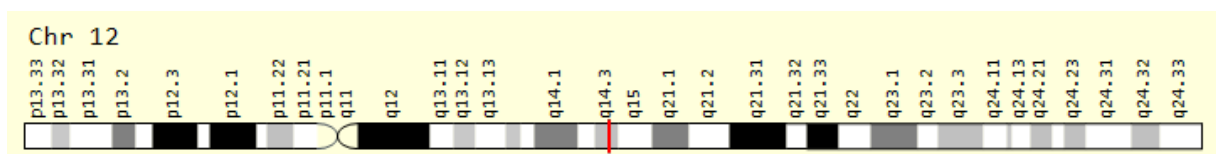
IRAK3, também chamado de IRAK-M expressa em células imunes, tem função regulatória na via de TLRs e IL-1R. No domínio pseudoquinase contém guanilato ciclase, sendo capaz de produzir monofosfato de guanosina e inibir a dissociação MYD88/IRAK de modo que o TRAF6 se mantenha inativo. A cGMP foi capaz de reduzir atividade de NFκB. (TRANG HONG NGUYEN et al., 2022)

Entretanto em vias de sinalização iniciadas por outros receptores toll-like a proteína IRAK3, pode estimular a ativação de NFκB na ausência de IRAK2 e 3 (ZHOU et al., 2013).

2.6.2.1 Gene IRAK3

O gene codifica a proteína IRAK3 é um membro da família de proteínas quinases associadas ao IL-1R, sendo essencial para transdução de sinal imune Toll/IL-R. Está localizado no braço longo do cromossomo 12, na região um, banda quatro e sub banda três (12q14.3), possuindo 12 éxons e três transcritos associados (**Figura 8**). AP-1, ATF-2, c-Jun e NF-κB1 são uns dos principais fatores de transcrição que se ligam à região promotora de IRAK3 (ID Ensembl: ENSG00000090376) (ID NCBI:11213).

Figura 8: Localização do gene *IRAK3*.



Fonte: ID GeneCars:GC12P066400

2.6.2.2 IRAK3 na osteoporose

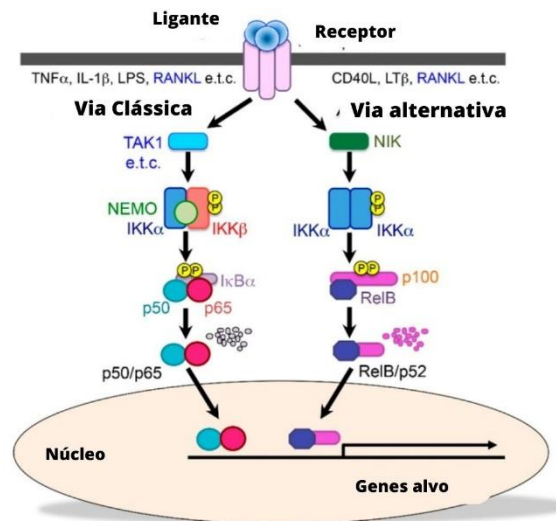
O domínio pseudoquinase do IRAK3 atribui a essa proteína, um papel regulatório na via do NF- κ B1. A deleção de IRAK3 em cultivos celulares, acelera a degradação I κ B α , e consequentemente a transformação do NF- κ B1 em dímeros ativos, aumentando sua atividade. Essa função também é vista em doenças inflamatórias onde a expressão de IRAK3 é inversamente proporcional a de MYD88, logo, o aumento de IRAK3 corresponde a uma diminuição da sinalização do NF- κ B1 (GOMES DA SILVA et al., 2021).

Com estímulo osteoclastogênicos de IL-1, M-CSF e RANK, o IRAK3 confere uma tolerância à resposta, ou seja, é necessária uma maior concentração de citocinas para acionar a osteoclastogênese. Nesse sentido a ausência de IRAK3 em camundongos é associada à osteoclastogênese acelerada; aumento da sobrevivência dos OCs, a hiperativação das vias de sinalização de NF- κ B, e osteoporose. (LI et al., 2005)

2.6.3 NF- κ B1

O NF- κ B1 trata-se de uma família de fatores de transcrição p50/p105, p52/p100, p65 (relA), c-Rel e RelB, que se dispõem no citoplasma celular onde se mantêm inativos por uma grande variedade de I κ B (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ e I κ B γ). Essas moléculas inibidoras possuem de cinco a sete repetições de anquirina por meio do qual interage com o NF- κ B. Outras proteínas como p105 e p100, que contêm região carboxi-terminal homóloga de I κ B também exercem função inibitória. (SUN, 2017)

A via de sinalização canônica ativa TAK1 que posteriormente ativa o complexo IKK, responsável por fosforilar e ubiquitinar o I κ B, marcando-o para degradação, enquanto p105 e p100 são marcadas para um processamento seletivo também pelo proteassoma na região C-terminal produzindo NF- κ B1 p50 e NF- κ B2 p52 maduros e perdendo função inibidora. Desse modo formam-se homô e heterodímeros de NF- κ B1 p50-RELA e NF- κ B1 p50-c-REL que se translocam para o núcleo se ligando a regiões específicas do DNA e induzindo a expressão de genes alvos. (JIMI et al., 2019) **(Figura 9)**

Figura 9: Vias do NF- κ B1

O NF- κ B1 pode ser ativado pela via clássica (imagem esquerda), essa via é dependente da TAK1 e tem como característica a rápida degradação da porção inibidora (IKK). A via à esquerda é a via alternativa que sinaliza por meio na molécula NIK e tem degradação lenta do IKK. Fonte: Adaptado, JIMI et al., (2019)

2.6.3.1 NF- κ B1 na osteoporose

A diminuição do estrogênio na menopausa leva à regulação positiva de citocinas inflamatórias, como TNF α e IL-1 β que induzem a vias de sinalização da via NF- κ B1. Defeitos no processamento da p100 bloqueiam a formação dos dímeros de NF- κ B1, acarretando em baixa resposta ao RANKL para a osteoclastogênese. O bloqueio da expressão de p105/p50 e p100/p52, causa osteopetrose, distúrbio onde não há processo de reabsorção óssea por falta de OCs (NOVACK, 2010)

A ativação de NF- κ B1 em OBs bloqueia a diferenciação da célula, pois inibe Runx2, uns dos fatores de transcrição necessários para o compromisso com a linhagem osteoblástica. Corroborando com esse resultado, células de osteosarcoma que tiveram o NF- κ B silenciado, obtiveram maior expressão dos genes como fosfatase alcalina, Runx2 e osteocalcina, marcadores de diferenciação de OBs. (SOYSA et al., 2009; MARUYAMA et al., 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a associação da expressão dos genes MYD88 e IRAK3 com a resposta ao tratamento em pacientes com osteoporose primária pós-menopausa

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os dados clínicos e laboratoriais entre as pacientes com OP primária pós-menopausa responsivas e não-responsivas ao tratamento farmacológico;
- Avaliar a expressão do gene MYD88 e IRAK3 entre as pacientes com OP primária pós-menopausa responsivas e não responsivas
- Analisar a correlação entre os níveis de expressão dos genes MYD88 e IRAK3 como os níveis séricos de marcadores bioquímicos ósseo

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo

Foram selecionadas um total de 40 pacientes, divididas igualmente entre o grupos responsivo e não responsivas. Todas foram diagnosticadas com OP pós-menopausa de acordo como o critério da OMS (baseado no T-Score do exame de DMO) e com no mínimo dois anos de tratamento com bisfosfonatos, residentes no estado de Pernambuco e atendidas no ambulatório clínico de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE).

Foram classificadas como subgrupo OP não-responsivos (OP-NR) todas as pacientes em tratamento com bisfosfonatos que apresentaram, com base nos exames de densitometria, diminuição de DMO em relação aos últimos exames por um período mínimo de dois anos. Dessa forma, o subgrupo OP-R (responsivo aos bisfosfonatos) foi composto por pacientes que apresentaram estabilização ou aumento de DMO após dois anos de tratamento.

Mulheres osteopênicas, com outras doenças reumáticas e de caráter inflamatório foram excluídas deste estudo. Além disso, informações clínicas como: idade, idade da menopausa, Vitamina D, cálcio, PTH foram obtidas dos prontuários para posterior análise de correlação

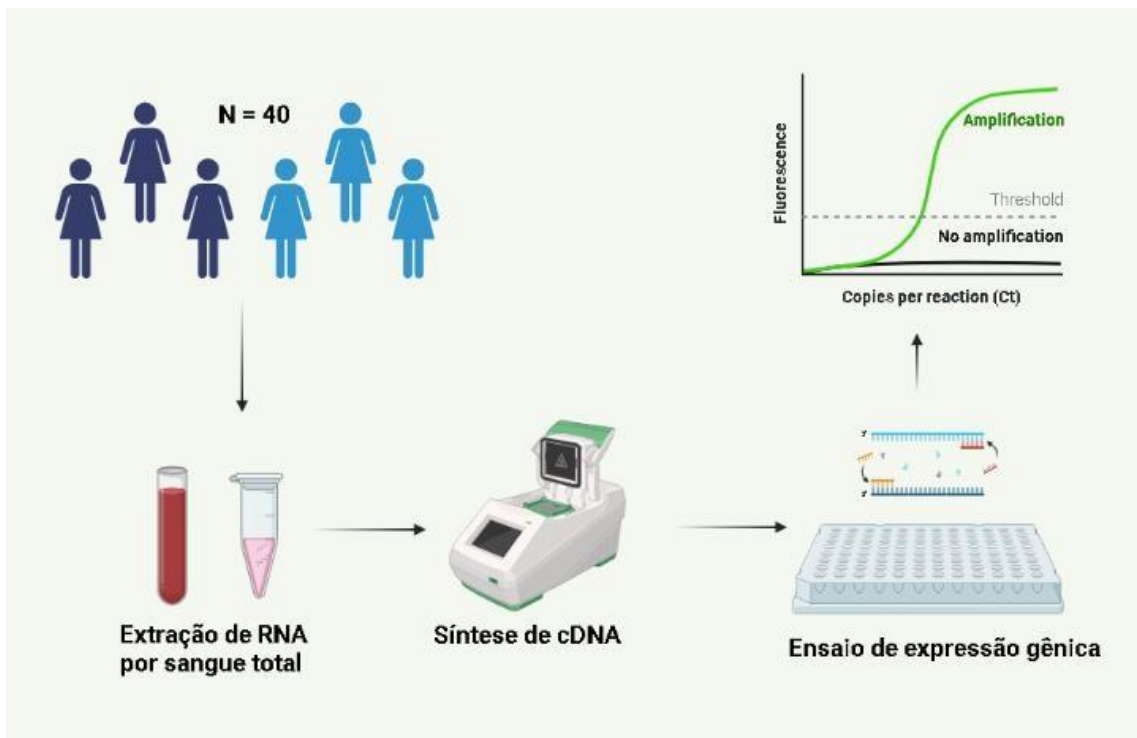
Todas as pacientes assinaram o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE nº 513/11).

4.2 Isolamento de mRNA e síntese de Cdna

O RNA total extraído de sangue periférico por Trizol® (Invitrogen, USA), já se encontrava armazenado no freezer -80°C do banco de amostras do grupo de pesquisa. As amostras de RNA foram então quantificadas no NanoDrop 2000, e padronizadas para concentração em um input de 500ng para síntese de cDNA. Foi utilizado o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, USA) para confecção do cDNA. Em seguida, a solução foi submetida ao termociclador para um único ciclo de 90 minutos, desses, cinco minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C e 15 minutos a 70°C. Ao finalizar, foi adicionado água para se obter uma concentração final

de 5 ng/ul de cDNA de cada amostra para realização do ensaio de expressão. **(Figura 10)**

Figura 10: Esquema geral da metodologia utilizada



O grupo foi dividido em responsivos e não responsivos de acordo com o exame dexta no período de 2 anos. Foi extraído RNA do sangue total, foi realizado cDNA para todas as amostras e ensaio de expressão gênica para genes alvos e de referência. Fonte: elaborado pelo autor pelo BioRender (2023)

4.3 Ensaio de expressão gênica

Os ensaios de expressão gênica foram feitos em triplicata utilizando sondas de expressão Taqman®, por meio do sistema de detecção Real-Time PCR ABI 7500 (Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA). Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), proteína ribossomal P0 (RPLP0) foram usados como genes de referência, previamente validados para normalização dos dados. A reação de PCR em tempo real foi ajustada para as seguintes condições: 95°C por 10 minutos, seguida por 40 de 95°C por 30 segundos e 60°C por um minuto em meio.

A quantidade relativa (QR) do RNA mensageiro foi medida (ciclo de quantificação), os valores foram organizados com média e desvio padrão.

O fator de normalização (FN) foi calculado pela média geométrica dos genes de referência, para a quantidade relativa normalizada (QRN) de cada gene foi dividido QR pelo FN. Os valores foram utilizados para cálculo de Fold Change (FC), que representa o valor de expressão de cada gene na amostra teste normalizado pelo valor da amostra controle. Dessa forma, conseguimos detectar quantas vezes o gene de interesse se encontra mais ou menos expresso em relação ao grupo controle (OP-R) estudado.

4.4 Análise estatística

Para análise dos dados foi utilizado o software GraphPadPrism® versão 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Primeiramente foi realizado a análise de normalidade usando o teste Kolmogorov-Smirnov. A estatística descritiva foi feita com base na média e desvio padrão. Os resultados expressos em p foram obtidos através do teste T não pareado para dados paramétricos e do teste Mann-Whitney para os dados não paramétricos. E o teste Spearman para análise de correlação. Valores com significância estatística foi considerado $p\text{-value} < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Características clínicas da população do estudo

Foram coletadas informações clínicas dos prontuários das pacientes, que correspondem a um N total de 40. O grupo avaliado teve como média de idade 69,4 com desvio padrão de 7,9 sendo formado predominantemente por mulheres idosas. A etnia foi dividida em três grupos sendo 42,5% de mulheres que se autodeclararam brancas, e 27,5% não brancas, isso inclui negras e pardas, os 30% restante não tiveram essa informação adicionada no prontuário médico. Mais de 70% não tiveram fraturas anteriores ou não consta no prontuário, entretanto 22,5% possui histórico de fraturas anteriores, não informando o local atingido. Das 40 pacientes avaliadas, 12 afirmaram ter histórico familiar de osteoporose, 13 afirmaram não ter histórico e 15 não tiveram essa informação adicionada no prontuário médico. **(Tabela 2)**

Tabela 2: Características Clínico-demográficas da população de estudo

Caraterística clínico-demográficas	Média ± Desvio padrão
Idade	69,4 ± 7,9
Menopausa	44,1 ± 7,62
Histórico de fraturas Sim / Não / Não Consta	9/ 18/ 13 (22,5%/ 45%/ 32,5)
Histórico familiar Sim / Não / Não Consta	12/ 13/ 15 (30%/ 32,5%/ 37,5)

Avaliação dos critérios clínicos das pacientes incluídas no estudo, as informações foram retiradas dos prontuários médico. Fonte: elaborado pelo autor (2023)

Na análise das médias dos marcadores séricos, entre os grupos responsivos e não responsivos, não houve significância estatística $p = >0,05$ **(Tabela 3)**.

Tabela 3: Marcadores bioquímicos

MARCADORES	OP-R	OP-NR	
Cálcio	29,84 ± 18,63	18,63 ± 28,95	p= 0,38
PTH	62,21 ± 27,53	158,5 ± 257,2	p= 0,65
Vitamina D	77,33 ± 105,3	69,3 ± 106,3	p= 0,67

Teste de comparação entre as médias dos marcadores séricos dos paciente, não foram obtidos valores estatisticamente significativo ($p > 0,05$). PTH= paratormônio; OP-R = osteoporose responsivos; OP-NR= osteoporose não responsivos. Fonte:elaborado pelo autor (2023)

Também foram analisados os valores dos marcadores bioquímicos relacionados a osteoporose do grupo não responsivo em relação ao grupo controle. Nas análises de correlação nos pacientes responsivos (OP-R) não houve significância estatística para expressão de *MYD88* e vitamina D, PTH e cálcio. $P = > 0,05$. **(Tabela 4)**

Tabela 4: Análise de correlação MYD88

Gene	Parâmetros	Cálcio	Vit.D	PTH
OP-R				
	CP	-0,101	0,262	0,252
MYD88	p-value	0,752	0,469	0,404
OP-NR				
	CP	-0,066	-0,095	-0,233
MYD88	p-value	0,857	0,840	0,551

Análise de correlação entre a expressão do gene *MYD88*. Não foram obtidos valores estatisticamente significativo ($p > 0,05$). PTH= paratormônio; OP-R = osteoporose responsivos; OP-NR= osteoporose não responsivos. Fonte:elaborado pelo autor (2023)

Resultados semelhantes foram encontrados na correlação de OP-R com expressão do *IRAK3*, $P = > 0,05$ para vitamina D e PTH. Entretanto, o mesmo grupo de pacientes apresentou uma tendência ao aumento de cálcio em relação ao aumento da expressão do *IRAK3*, $p = 0,055$. No grupo de pacientes não responsivos (OP-NR) também não foram encontrados correlação dos genes *MYD88*, e para *IRAK3* $p = > 0,05$ para os mesmos marcadores. **(Tabela 5)**

Tabela 5: Análise de correlação IRAK3

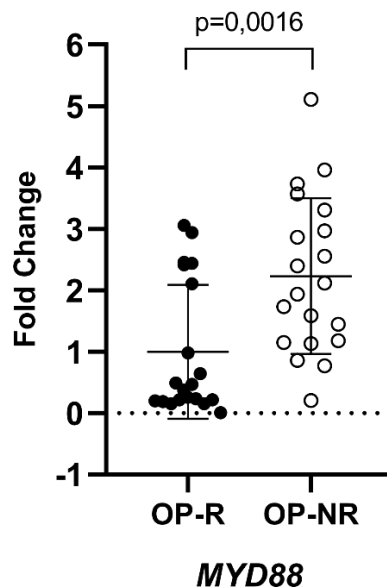
Gene	Parâmetros	Cálcio	Vit.D	PTH
OP-R	CP	0,571	0,55	-0,203
	p-value	0,055	0,10	0,50
OP-NR	CP	0,304	-0,214	-0,533
	P-value	0,391	0,619	0,147

Análise de correlação entre a expressão do gene *IRAK3*. Não foram obtidos valores estatisticamente significativo ($p > 0,05$). Entretanto demonstrou tendência positiva entre cálcio e *IRAK3*. PTH= paratormônio; OP-R = osteoporose responsivos; OP-NR= osteoporose não responsivos. Fonte: elaborado pelo autor (2023)

5.2 Análise de expressão gênica

Na análise da expressão do gene *MYD88*, quando comparamos os níveis de expressão de pacientes OP-R e OP-NR, verificamos uma diferença estatisticamente significativa na expressão do gene *MYD88* no grupo de pacientes não-responsivas. O grupo de pacientes OP-NR apresentou uma expressão 2,23 vezes maior quando comparado ao grupo responsivo ($FC = 2,23 \pm 1,54$, $p = 0,0016$) (**Figura 11**)

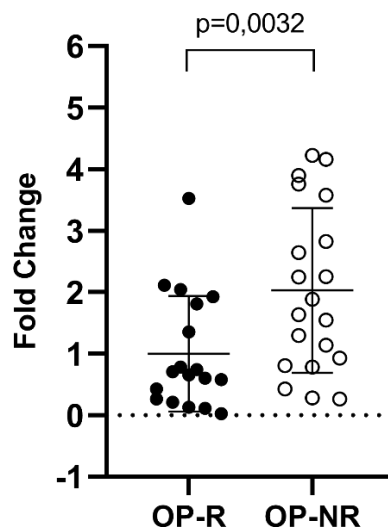
Figura 11: Expressão relativa do MYD88 em pacientes com osteoporose



Os níveis de expressão dos grupos osteoporose responsivos (OP-R) e osteoporose não-responsivos (OP-NR) foram normalizados com os genes de referência GAPDH e RPLP0 e estão expressos em relação aos valores do grupo controle OP-R, que apresenta um valor arbitrário de 1. Na análise de expressão relativa os pacientes OP-NR tiveram o gene *MYD88* mais expresso ($FC=2,22 \pm 1,53$, $p=0,0016$). Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Na análise da expressão do gene *IRAK3*, na comparação dos níveis de expressão de pacientes OP-NR em relação a OP-R, também foi observado uma maior expressão estatisticamente significativa do *IRAK3* na grupo OP-NR. O grupo de pacientes OP-NR apresentou uma expressão 2,02 vezes maior quando comparado ao grupo responsivo ($FC=2,02 \pm 0,46$, $p=0,0032$) (**Figura 12**).

Figura 12: Expressão relativa do *IRAK3* em pacientes com osteoporose



Os níveis de expressão dos grupos osteoporose responsivos (OP-R) e osteoporose não-responsivos (OP-NR) foram normalizados com os genes de referência GAPDH e RPLP0 e estão expressos em relação aos valores do grupo controle OP-R, que apresenta um valor arbitrário de 1. Na análise de expressão relativa os pacientes OP-NR tiveram o gene *IRAK3* mais expresso ($FC=2,02 \pm 0,46$, $p=0,0032$). Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstraram a alta incidência da osteoporose em mulheres idosas, no total de 40 pacientes, apenas 2 tinham idade inferior a 60 anos. A senilidade é um fator de risco já constatado por outros autores como BACCARO e colaboradores (2013) em um estudo com mulheres acima dos 50 anos, todas residentes na cidade de campinas e RODRIGUES & BARROS em 2016 em um estudo transversal onde foram avaliados a população idosa de campinas/SP com um N de 1.419, onde a prevalência foi duas vezes maior em idosos com mais de 80 anos do que os estavam entre 60 e 69 anos. Isso ocorre pelo próprio metabolismo ósseo, que funciona de maneira diferente em cada idade, sendo extremamente ativo na juventude, e se estabilizando por volta dos 25 até os 50 anos, posterior a isso inicia-se a fase de declínio, com aumento considerável da velocidade de reabsorção. Em mulheres essa perda é de aproximadamente metade do seu osso trabecular e 35% de seu osso cortical durante sua vida.

A idade da menopausa teve média de 44,1 anos com desvio padrão de 7,62. Esse, também é um importante fator para a OP, apesar da menopausa ser considerada precoce apenas quando ocorre em mulheres abaixo dos 40 anos quanto mais cedo ela ocorrer, menor a exposição da mulher ao estrogênio, que tem uma forte função anti reabsortiva, além de sua interferência no metabolismo do cálcio, aumentando assim a perda óssea. (COSTA-PAIVA et al., 2003)

A ocorrência de fraturas, mencionadas por 22,5% das pacientes foi associada por Delmas e colaboradores em 2003 em um estudo randomizado com 7705 mulheres no pós menopausa demonstrou que mulheres com histórico de fraturas, em especial as graves, tinham maior incidência de novas fraturas. Contudo, o risco de novas fraturas pode ser mensurado pelo FRAX, uma ferramenta de cálculo baseada em computador que calcula a probabilidade individual de 10 anos de fraturas osteoporóticas graves e leva em consideração outros fatores de risco além do histórico de fraturas. (CHOTIYARNWONG et al., 2022; TARANTINO et al., 2017;

O Histórico familiar apesar de ser relatado em menor porcentagem pelo grupo avaliado, é visto como um forte fator de risco, em um estudo com mulheres jordanianas no pós menopausa foi encontrado significância estatística entre um histórico familiar positivo e o aumento da propensão ao desenvolvimento da OP. (HYASSAT et al., 2017).

Em relação aos marcadores séricos da OP, os valores das dosagens do PTH, vitamina D e cálcio estão relacionados ao estado ósseo, servem para auxiliar na análise do paciente e podem refletir maiores chances para o desenvolvimento da osteoporose. Os marcadores citados se relacionam com o metabolismo do cálcio, um fator de extrema importância para a osteoporose. A diminuição desse íon, é um fator predisponente à osteopenia que quando não tratada, pode levar à osteoporose. Quando o cálcio sérico diminui o PTH é secretado, estimulando a retirada de cálcio do osso, e fragilizando o mesmo. Nesse sentido, PTH elevado pode ser um fator predisponente à osteoporose. Já a vitamina D estimula a absorção do cálcio servindo como um fator protetivo. (VLASHI et al., 2022)

No que diz respeito a vitamina D, um estudo realizado por Saadeh e colaboradores em 2022, foram avaliadas 884 mulheres jordanianas no pós menopausas demonstrou que indivíduos que não suplementavam vitamina D, eram mais propensos a desenvolver OP. Outro artigo apontou que a maioria dos indivíduos submetidos a cirurgias possuíam hipovitaminose (VALLE et al., 2021)

Na menopausa, a baixa de estrogênio afeta diretamente a absorção do cálcio, isso afeta negativamente a formação óssea, a autora Narula em 2013 demonstrou que a suplementação de cálcio e vitamina D induzem aumento da DMO, mesmo em mulheres pós menopausa. Onde pacientes com deficiência de vitamina D, absorviam no máximo 15% do cálcio ingerido na dieta, pessoas com taxas de vitamina D dentro dos padrões absorviam de 30 a 80%.

O PTH atua nos OC's, estimulando a reabsorção óssea e em um artigo de revisão de terapias combinadas o PTH foi descrito por Zhang e colaboradores como um estimulador da formação óssea quando somado a uma terapia com bisfosfonatos, melhorando a espessura da trabécula óssea.

Nas comparações da média dos marcadores séricos não foi obtido significância estatística, apesar disso é possível ver um aumento do cálcio nas mulheres responsivas, seja esse aumento natural ou devido a suplementação é um fator positivo na terapêutica. Enquanto o PTH se encontra em maior quantidade nas pacientes não responsivas, apontando para uma maior mobilização do cálcio ósseo devido a uma deficiência já descrita anteriormente.

Na análise de correlação não é possível associar o cálcio como um adjuvante na melhor atividade de inibição da proteína IRAK3, devido a suplementação de cálcio que as pacientes incluídas no estudo fazem.

Na avaliação das expressões gênicas, a expressão do *MYD88* demonstrou estar mais expresso no grupo de pacientes osteoporóticos que não responderam ao tratamento com bisfosfonatos, apresentando uma diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo OP-R ($FC=2,23 \pm 1,54$, $p= 0,0016$) Embasando a hipótesedo trabalho, de que há uma interferência da via TLR4/NF- κ B1 na OP.

Dawen Liu (2010) relacionou o silenciamento do *MYD88* em células mononucleares, com menor função quimiotática, além disso, essas mesmas células quando cultivadas em um meio diferencial obtiveram menor diferenciação para OC's quando comparada com as células não silenciadas. Nesse caso, o *MYD88* seria o

responsável pela expressão de moléculas quimiotáticas, fundamentais para o processo de diferenciação.

Outro estudo de osteoclastogênese induzida também relatou resultados semelhantes, onde a co cultura de OB's *MYD88*^{-/-} correspondeu a um menor número de OC'S diferenciados. Associando assim, a indução da osteoclastogênese através dos OB's. Além disso, terapias que demonstraram inibir quimiocinas com a MCP-1 e RANKL foram responsáveis por inibir também a formação do complexo TLR4/MYD88. Desse modo, seja por aumentar o recrutamento de células precursoras, ou quimiocinas, gerar inflamação e até mesmo acionar vias de sinalização nos OB's o *MYD88* mantém uma relação direta com a funcionalidade do metabolismo ósseo. Podendo acelerar o processo de maturação das células reabsortivas e contribuir para o desenvolvimento da OP. (NAKAO et al., 2014; SATO et al., 2004)

Outros estudos se opõem a esses resultados, correlacionando a ativação da via do TLR4 e MYD88 com aumento de diferenciação osteogênica, aumento de deposição de cálcio e fosfatase alcalina. Um estudo comparando a expressão do TLR4 mostrou uma menor expressão desse receptor em células mesenquimais do que nas células mononucleares do sangue periférico, desse modo, a via teria uma boa funcionalidade na diferenciação osteogênica mas não interferindo na taxa de proliferação. (HE et al., 2016; MO et al., 2008)

Um dos fatores pelos quais os resultados podem se contrapor é devido ao tempo em que a via se manteve estimulada nos estudos e a relação dose dependente com o estimulador. Portanto de acordo com os artigos citados, o MYD88 pode se apresentar como um fator estimulador da função osteogênica, mas a depender do seu nível de expressão e associação com os fatores de risco para a osteoporose pode induzir o aumento da reabsorção óssea de forma indireta, ao aumentar a osteoclastogênese.

Na análise do gene *IRAK3*, também foi observada uma maior expressão nos pacientes OP-NR em comparação com o grupo OP-R ($FC=2,02 \pm 0,46$, $p=0,0032$). Como o *IRAK3* tem sua transcrição estimulada pelo próprio NF- κ B1 como um mecanismo regulatório para a via TLR4/NF- κ B1, o aumento da expressão pode ser uma resposta a super ativação da via. A indução de *IRAK3* em resposta ao estímulo de outros TLR's também foi mencionada em outros estudos que constataram ativação reduzida de NF- κ B diante da presença de *IRAK3*. (HUBBARD; MOORE, 2010)

Um estudo publicado por Norton e colaboradores em 2011, relatou que o estímulo de MYD88 não afetou os níveis de RNA mensageiro do *IRAK3*, no entanto os níveis da proteína se mostraram reduzidos, levantando a hipótese de um mecanismo pós transducional interferindo na codificação da proteína, desse modo, a via como um todo se manteria constantemente ativada, aumentando a atividade do NF- κ B1, e interferindo na resposta ao tratamento.

O NF- κ B1 também é acionado pela via alternativa, que não depende do MYD88, e conduz à translocação nuclear de RelB / p52, um estudo realizado com cultura de células mononucleares silenciadas para *IRAK3* demonstrou uma acentuada expressão de RelB quando comparada com as células selvagens, relacionando a atividade inibitória do *IRAK3* apenas à via não canônica. (SU et al., 2008)

Na literatura também há uma indicação de que o *IRAK3* possa funcionar como um mediador do MYD88, na ausência de outros mediadores como o *IRAK2* e *IRAK3* que propagam a sinalização da via. (ZHOU et al., 2013)

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados é possível concluir que:

- A expressão diferencial dos genes MYD88 e IRAK3 em pacientes com osteoporose reforça a hipótese que a via MYD88/NF-Kb1 se relaciona com a OP. Principalmente nos pacientes não responsivos ao tratamento, o aumento de estímulos osteoclastogênicos pode ter servido como um interferente no quadro de osteoporose refratária.
- Os marcadores bioquímicos não apresentaram correlação com a expressão dos genes, exceto os pacientes responsivos que demonstraram uma tendência do aumento do cálcio em relação ao IRAK3.

8 REFERÊNCIAS

ALONSO-PÉREZ, A. et al. Role of Toll-Like Receptor 4 on Osteoblast Metabolism and Function. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 504, 8 maio 2018.

ARMAS, L. A. G.; RECKER, R. R. Pathophysiology of osteoporosis: new mechanistic insights. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 41, n. 3, p. 475–486, 1 set. 2012.

BACCARO, L. F. et al. Factors associated with osteoporosis in Brazilian women: a population-based household survey. **Archives of Osteoporosis**, v. 8, p. 138, 2013.

BACCARO, L. F. et al. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. **Clinical Interventions in Aging**, v. 10, p. 583–591, 20 mar. 2015.

BHATNAGAR, A.; KEKATPURE, A. L. Postmenopausal Osteoporosis: A Literature Review. **Cureus**, v. 14, n. 9, 20 set. 2022.

BIN LV et al. Strategies for Biomaterial-Based Spinal Cord Injury Repair via the TLR4-NF- κ B Signaling Pathway. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 29 abr. 2022.

BRAUN, T.; ZWERINA, J. Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 13, n. 4, p. 235, 2011.

CAIRES, E. L. P. et al. Tratamento da osteoporose pós-menopáusica: um algoritmo baseado na literatura para uso no sistema público de saúde. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, n. 3, p. 254–263, maio 2017.

CHANDRA, A.; RAJAWAT, J. Skeletal Aging and Osteoporosis: Mechanisms and Therapeutics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3553, 29 mar. 2021.

CHENG, C.-H.; CHEN, L.-R.; CHEN, K.-H. Osteoporosis Due to Hormone Imbalance: An Overview of the Effects of Estrogen Deficiency and Glucocorticoid Overuse on Bone Turnover. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1376, 25 jan. 2022.

CHOTIYARNWONG, P. et al. Is it time to consider population screening for fracture risk in postmenopausal women? A position paper from the International Osteoporosis Foundation Epidemiology/Quality of Life Working Group. **Archives of Osteoporosis**, v. 17, n. 1, p. 87, 28 jun. 2022.

COSTA-PAIVA, L. et al. Prevalência de osteoporose em mulheres na pós-menopausa e associação com fatores clínicos e reprodutivos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25, n. 7, ago. 2003.

DE NARDO, D. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. **Cytokine**, v. 74, n. 2, p. 181–189, ago. 2015.

DECRAUSAZ, S. et al. Evaluation of dual-energy X-ray absorptiometry compared to magnetic resonance imaging for collecting measurements of the human bony pelvis. **American Journal of Human Biology**, v. 34, n. 8, 23 abr. 2022.

DEGUINE, J.; BARTON, G. M. MyD88: a central player in innate immune signaling. **F1000Prime Reports**, v. 6, 4 nov. 2014.

DELIZ-AGUIRRE, R. et al. MyD88 oligomer size functions as a physical threshold to trigger IL1R Myddosome signaling. **Journal of Cell Biology**, v. 220, n. 7, 6 maio 2021.

DELMAS, P. D. et al. Severity of prevalent vertebral fractures and the risk of subsequent vertebral and nonvertebral fractures: results from the MORE trial. **Bone**, v. 33, n. 4, p. 522–532, out. 2003.

DIEZ-PEREZ, A. et al. Risk factors for prediction of inadequate response to antiresorptives. **journal of bone and mineral reserch**, v. 27, n. 4, p. 817–824, 20 mar. 2012a.

DIEZ-PEREZ, A. et al. Treatment failure in osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 23, n. 12, p. 2769–2774, 27 jul. 2012b.

DU, J. et al. The structure function of the death domain of human IRAK-M. **Cell Commun Signal**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2014.

FITZGERALD, K. A.; KAGAN, J. C. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. **Cell**, v. 180, n. 6, p. 1044–1066, mar. 2020.

GIORDANO, V. et al. Age-related changes in bone architecture. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 43, n. 4, p. 276–285, ago. 2016.

GOMES DA SILVA, I. I. F. et al. MYD88, IRAK3 and Rheumatoid Arthritis pathogenesis: Analysis of differential gene expression in CD14 + monocytes and the inflammatory cytokine levels. **Immunobiology**, v. 226, n. 6, p. 152152, nov. 2021.

HART, N. H. et al. Biological basis of bone strength: anatomy, physiology and measurement. **Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions**, v. 20, n. 3, p. 347–371, 2020.

HE, X. et al. TLR4 Activation Promotes Bone Marrow MSC Proliferation and Osteogenic Differentiation via Wnt3a and Wnt5a Signaling. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0149876, 1 mar. 2016.

HUBBARD, L. L. N.; MOORE, B. B. IRAK-M regulation and function in host defense and immune homeostasis. **Infectious Disease Reports**, v. 2, n. 1, p. 9, 30 jun. 2010.

HYASSAT, D. et al. Prevalence and Risk Factors of Osteoporosis Among Jordanian Postmenopausal Women Attending the National Center for Diabetes, Endocrinology and Genetics in Jordan. **BioResearch Open Access**, v. 6, n. 1, p. 85–93, dez. 2017.

JIMI, E. et al. Molecular mechanisms of BMP-induced bone formation: Cross-talk between BMP and NF- κ B signaling pathways in osteoblastogenesis. **Japanese Dental Science Review**, v. 46, n. 1, p. 33–42, fev. 2010.

- JIMI, E. et al. The Role of NF- κ B in Physiological Bone Development and Inflammatory Bone Diseases: Is NF- κ B Inhibition “Killing Two Birds with One Stone”? **Cells**, v. 8, n. 12, p. 1636, 14 dez. 2019.
- KANIS, J. A. et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. **Osteoporosis International**, v. 30, n. 1, p. 3–44, 2019.
- KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 461, 25 set. 2014.
- LI, H. et al. IL-1 receptor–associated kinase M is a central regulator of osteoclast differentiation and activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 7, p. 1169–1177, 4 abr. 2005.
- LIANG, B. et al. Osteoporosis pathogenesis and treatment: existing and emerging avenues. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 27, n. 1, 4 set. 2022.
- LIN, S.-C.; LO, Y.-C.; WU, H. Helical assembly in the MyD88–IRAK4–IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. **Nature**, v. 465, n. 7300, p. 885–890, 19 maio 2010.
- LIU, D.; YAO, S.; WISE, G. E. MyD88 expression in the rat dental follicle: implications for osteoclastogenesis and tooth eruption. **European Journal of Oral Sciences**, v. 118, n. 4, p. 333–341, 12 jul. 2010.
- LOPES, D. et al. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. **Biomaterials**, v. 185, p. 240–275, dez. 2018.
- MARUYAMA, T. et al. Processing of the NF- κ B2 Precursor, p100, to p52 is Critical for RANKL-Induced Osteoclast Differentiation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 5, p. 091029141139034-31, 29 out. 2009.
- MO, I. F. Y. et al. Prolonged exposure to bacterial toxins downregulated expression of toll-like receptors in mesenchymal stromal cell-derived osteoprogenitors. **BMC Cell Biology**, v. 9, n. 1, 18 set. 2008.
- NAGY, E. et al. Soluble Biomarkers of Osteoporosis and Osteoarthritis, from Pathway Mapping to Clinical Trials: An Update. **Clinical Interventions in Aging**, v. Volume 15, p. 501–518, abr. 2020.
- NAKAO, J. et al. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) inhibits LPS-induced inflammatory responses of osteoblasts through TLR4–MyD88 dissociation. **Bone**, v. 58, p. 17–25, 1 jan. 2014.
- NARULA, R. Vitamin D Deficiency Among Postmenopausal Women with Osteoporosis. **JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH**, v. 7, n. 2, 2013.
- NORTON, J. T. et al. Role of IL-1 receptor-associated kinase-M (IRAK-M) in priming of immune and inflammatory responses by nitrogen bisphosphonates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 27, p. 11163–11168, 5 jul. 2011.

NOVACK, D. V. Role of NF- κ B in the skeleton. **Cell Research**, v. 21, n. 1, p. 169–182, 16 nov. 2010.

NUTI, R. et al. Guidelines for the management of osteoporosis and fragility fractures. **Internal and Emergency Medicine**, v. 14, n. 1, p. 85–102, 13 jun. 2018.

PUTNAM, N. E. et al. MyD88 and IL-1R signaling drive antibacterial immunity and osteoclast-driven bone loss during *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. **British journal of pharmacology**, v. 15, n. 4, p. e1007744–e1007744, 12 abr. 2019.

QU, X. et al. Bone Turnover Markers and Bone Mineral Density to Predict Osteoporotic Fractures in Older Women: A Retrospective Comparative Study. **Orthopaedic Surgery**, v. 12, n. 1, p. 116–123, 27 dez. 2019.

RODRIGUES, I. G.; BARROS, M. B. DE A. Osteoporosis self-reported in the elderly: a population-based survey in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 19, n. 2, p. 294–306, 2016.

SAADEH, R. et al. Osteoporosis among Postmenopausal Women in Jordan: A National Cross-Sectional Study. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 14, p. 8803, 20 jul. 2022.

SATO, N. et al. MyD88 But Not TRIF Is Essential for Osteoclastogenesis Induced by Lipopolysaccharide, Diacyl Lipopeptide, and IL-1 α . **Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 5, p. 601–611, 6 set. 2004.

SOUZA, M. P. G. DE. Diagnóstico e tratamento da osteoporoze. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 45, n. 3, p. 220–229, jun. 2010.

SOYSA, N. S. et al. The Pivotal Role of the Alternative NF- κ B Pathway in Maintenance of Basal Bone Homeostasis and Osteoclastogenesis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 4, p. 091019190442039-34, 19 out. 2009.

SU, J. et al. The Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase M Selectively Inhibits the Alternative, Instead of the Classical NF κ B Pathway. **Journal of Innate Immunity**, v. 1, n. 2, p. 164–174, 25 set. 2008.

SUN, S.-C. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 9, p. 545–558, 5 jun. 2017.

TAKEDA, K. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, v. 17, n. 1, p. 1–14, 22 nov. 2004.

TARANTINO, U. et al. Clinical guidelines for the prevention and treatment of osteoporosis: summary statements and recommendations from the Italian Society for Orthopaedics and Traumatology. **Journal of Orthopaedics and Traumatology**, v. 18, n. S1, p. 3–36, 20 out. 2017.

TONK, C. H. et al. Therapeutic Treatments for Osteoporosis—Which Combination of Pills Is the Best among the Bad? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1393, 26 jan. 2022.

TRANG HONG NGUYEN et al. Modulation of Inflammatory Cytokine Production in Human Monocytes by cGMP and IRAK3. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 5, p. 2552–2552, 25 fev. 2022.

VALLE, C. A. R. DO et al. Influência da hipovitaminose D na ocorrência das fraturas. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 56, n. 06, p. 784–789, 11 nov. 2021.

VERSTAK, B. et al. The TLR signaling adaptor TRAM interacts with TRAF6 to mediate activation of the inflammatory response by TLR4. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 96, n. 3, p. 427–436, 8 maio 2014.

VIJAYAN, V. et al. Methionine down-regulates TLR4/MyD88/NF- κ B signalling in osteoclast precursors to reduce bone loss during osteoporosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 1, p. 107–121, 10 dez. 2013.

VILLAGÓMEZ VEGA, A. et al. Influence of the Osteogenomic Profile in Response to Alendronate Therapy in Postmenopausal Women with Osteoporosis: A Retrospective Cohort Study. **Genes**, v. 14, n. 2, p. 524, 1 fev. 2023.

VLASHI, R. et al. Wnt signaling: Essential roles in osteoblast differentiation, bone metabolism and therapeutic implications for bone and skeletal disorders. **Genes & Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1291–1317, ago. 2022.

ZHANG, C.; SONG, C. Combination Therapy of PTH and Antiresorptive Drugs on Osteoporosis: A Review of Treatment Alternatives. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 27 jan. 2021.

ZHANG, W. et al. Immunoporosis: Role of immune system in the pathophysiology of different types of osteoporosis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 13, 6 set. 2022.

ZHENG, L. et al. Metformin alleviates hyperglycemia-induced apoptosis and differentiation suppression in osteoblasts through inhibiting the TLR4 signaling pathway. **Life Sciences**, v. 216, p. 29–38, 1 jan. 2019.

ZHOU, H. et al. IRAK-M mediates Toll-like receptor/IL-1R-induced NF κ B activation and cytokine production. **The EMBO journal**, v. 32, n. 4, p. 583–596, 1 fev. 2013.

ZHOU, J. et al. Structural basis of the IL-1 receptor TIR domain-mediated IL-1 signaling. **iScience**, v. 25, n. 7, p. 104508, jul. 2022.

.

ANEXOS

ANEXO A: Cópia do comite de ética

