

**Universidade do Algarve**

**Caracterização da expressão do gene *ZFP36L1* associado a  
mecanismos de patogénese da osteoartrose e osteoporose**

**Mafalda Guela Lázaro**

**Dissertação para obtenção do grau de mestre**

Mestrado em Ciências Biomédicas – Mecanismos de doenças

Trabalho realizado sob a supervisão de:

Professor Doutor Márcio Simão



**FMCB – Faculdade de Medicina e Ciências Biomédicas**

**2023**



# **Caracterização da expressão do gene *ZFP36L1* associado a mecanismos de patogénese da osteoartrose e osteoporose**

## **Declaração de autoria de trabalho**

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright Mafalda Guela Lázaro

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## **Dedicatória e Agradecimentos**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador, o professor doutor Márcio Alexandre Filipe Simão que desde o início demonstrou uma grande boa vontade para me ajudar neste desafio, por esclarecer todas as minhas dúvidas e sem o qual nada poderia ter sido feito.

Agradeço a todos os docentes que passaram pelo meu percurso académico, em especial ao professor doutor José Bragança que me ajudou numa fase mais complicada do mestrado.

Agradeço aos meus colegas e amigos que fiz na Universidade do Algarve, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Por último, mas não menos importante, agradeço à minha família por acreditar sempre em mim, por todo o apoio e incentivo.

A todos o meu muito obrigada!

## RESUMO

**Resumo:** O organelo sem membrana, designado como grânulo TIS, é caracterizado pela interação da proteína ZFP36 ring finger protein like 1 (ZFP36L1), também conhecida como TIS11B, com mRNAs que codificam proteínas membranares. ZFP36L1 promove o enriquecimento ou exclusão de transcritos, dependendo do tamanho dos seus 3'UTR e número de elementos ricos em adeninas (A) e uracilos (U) (AREs). A associação de grânulos TIS à superfície do retículo endoplasmático cria um microambiente que favorece a tradução e localização de proteínas específicas na superfície da membrana das células. ZFP36L1 também é conhecido por regular a estabilidade e degradação de transcritos de vários genes alvo, como é o caso de vários intermediários inflamatórios, o que sugere um papel duplo para o ZFP36L1, favorecendo a transcrição de proteínas membranares e destabilizando outros alvos. Para além dos marcadores de inflamação, também regula os intermediários da via de sinalização das BMPs e está envolvido em mecanismos de senescência o impacto do ZFP36L1 nas células precursoras de osteoblastos e de condrócitos e na sua diferenciação terminal é praticamente desconhecido. Recentemente, o ZFP36L1 tem sido implicado na promoção da diferenciação de osteoblastos e a sua expressão foi identificada como sendo diminuída em ratinhos mais idosos, resultando numa diferenciação preferencial das células mesenquimais para a linhagem adipocitária. Também foi publicado que o aumento da expressão de ZFP36L1 está associado aos mecanismos de progressão da osteoartrose.

Este projeto tem como objetivo a identificação, compilação e discussão de estudos publicados que descrevem a expressão de ZFP36L1 em contextos patológicos associados ao desenvolvimento de osteoporose e osteoartrose, focando a discussão dos resultados obtidos no impacto que ZFP36L1 pode ter no metabolismo do osso e da cartilagem. Através da pesquisa da base de dados Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles>) e bibliografia associada vai-se procurar compilar e comparar dados relativos à expressão de ZFP36L1 em experiências usando tecidos de humano e de ratinho. Com base nesses resultados vai-se procurar contextualizar a expressão desta proteína nos mecanismos associados ao desenvolvimento de osteoartrose e osteoporose. Serão igualmente estudadas (i) as relações filogenéticas destes genes nas principais espécies utilizadas como modelos biológicos em ciências biomédicas, e (ii) a presença de polimorfismos no gene que

codifica para a ZFP36L1 e possam ser associados a patologias no sistema musculoesquelético e contextualizar os resultados relativamente às funções das proteínas codificadas.

**Palavras-chaves:** TIS, ZFP36L1, BMPs, gene.

## ABSTRACT

**Abstract:** The membrane-free organelle, called the TIS granule, is characterized by the interaction of the protein ZFP36 ring finger protein like 1 (ZFP36L1), also known as TIS11B, with mRNAs that encode membrane proteins. ZFP36L1 promotes enrichment or deletion of transcripts, depending on the size of its 3'UTR and number of adenine (A) and uracil (U) rich elements (AREs). The association of TIS granules to the surface of the endoplasmic reticulum creates a microenvironment that favors the translation and localization of specific proteins on the surface of the cell membrane. ZFP36L1 is also known to regulate the stability and degradation of transcripts of several target genes, as is the case of several inflammatory intermediates, which suggests a dual role for ZFP36L1, favoring the transcription of membrane proteins and destabilizing other targets. In addition to inflammation markers, it also regulates the intermediaries of the BMPs signaling pathway and is involved in senescence mechanisms. The impact of ZFP36L1 on precursor cells of osteoblasts and chondrocytes and on their terminal differentiation is practically unknown. Recently, ZFP36L1 has been implicated in promoting osteoblast differentiation and its expression has been identified to be decreased in older mice, resulting in preferential differentiation of mesenchymal cells towards the adipocyte lineage. It has also been published that increased expression of ZFP36L1 is associated with mechanisms of osteoarthritis progression.

This project aims to identify, compile and discuss published studies that describe the expression of ZFP36L1 in pathological contexts associated with the development of osteoporosis and osteoarthritis, focusing on the discussion of the results obtained in the impact that ZFP36L1 may have on bone and cartilage metabolism. Searching the Gene Expression Omnibus database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/profiles>) and associated bibliography will attempt to compile and compare data relating to ZFP36L1 expression in experiments using human and human tissues. mouse. Based on these results, we will try to contextualize the expression of this protein in the mechanisms associated with the development of osteoarthritis and osteoporosis. Will also be studied (i) the phylogenetic relationships of these genes in the main species used as biological models in biomedical sciences, and (ii) the presence of polymorphisms in the gene that codes for

ZFP36L1 and can be associated with pathologies in the musculoskeletal system and contextualize the results with respect to the functions of the encoded proteins.

**Keywords:** TIS, ZFP36L1, BMPs, gene.

# ÍNDICE GERAL

## Capítulo 1: osteoartrose e osteoporose

1. Introdução à osteoartrose e osteoporose, manifestações clínicas e tratamento.....	1
1.1. Estrutura e osso.....	1
1.2. Diferenciação de osteoblastos.....	2
1.3. Metabolismo do osso.....	5
1.5. Osteoporose.....	6
1.5.1. Epidemiologia da osteoporose.....	6
1.5.2. Patofisiologia da osteoporose .....	8
1.5.2.1. Manifestações clínicas da osteoporose.....	11
1.5.2.2. Fatores de risco da osteoporose.....	12
1.5.2.3. Diagnóstico da osteoporose.....	13
1.5.2.4. Terapia farmacológica da osteoporose.....	14
1.5.3. Osteoartrose.....	16
1.5.3.1. Articulação – definição.....	16
1.5.3.2. Articulações sinoviais – definição.....	16
1.5.3.3. Articulações sinoviais – fisiologia.....	17
1.5.3.4. Osteoartrose – epidemiologia.....	17
1.5.3.5. Osteoartrose – fatores de risco.....	18
1.5.3.6. Osteoartrose – patologia .....	18
1.5.3.7. Manifestações clínicas da osteoartrose.....	19
1.5.3.8. Diagnóstico de osteoartrose.....	20
1.5.3.9. Terapia farmacológica da osteoartrose .....	21
1.6. Estrutura do gene que codifica ZFP36L1.....	24
1.7. Estrutura e função da proteína ZFP36L1 – família das proteínas TIS.....	24
1.7.1. Regulação de decaimento de mRNAs pelas proteínas da família ZFP36.....	26
1.7.2. Regulação do ciclo celular.....	28
1.8. Formação de grânulos de TIS .....	30
1.9. Papel do ZFP36L1 no metabolismo do osso .....	31
1.10. Impacto do ZFP36L1 na cartilagem .....	32
1.11. Objetivos .....	34

## Capítulo 2: Métodos

2.1. Revisão bibliográfica .....	36
2.2. Árvore filogenética .....	37
2.3. Análise dos domínios presentes na ZFP36L1 .....	39
2.4. Análise da localização subcelular .....	39
2.5. Análise da Glicosilação .....	40
2.6. Previsão dos locais de fosforilação .....	40
2.7. Análise da expressão genética – <i>microarrays</i> e <i>next generation sequencing</i> .....	41
2.8. Acesso a dados experimentais e determinação da expressão relativa .....	43
2.9. Análise estatística .....	45

## Capítulo 3: Resultados

3.1. Análise bioinformática dos domínios.....	47
3.1.1. Domínios envolvidos.....	47
3.2. Valores de identidade.....	50
3.3. Árvore filogenética de <i>ZFP36L1</i> .....	52
3.4. Localização subcelular do ZFP36L1.....	54
3.5. Análise de domínio de localização nucleolar .....	55
3.6. Locais de previsão de fosforilação .....	56
3.7. Glicosilação .....	57
3.8. Relação entre doenças ósseas e <i>Zfp36l1</i> .....	60
3.9. Evidências .....	60
3.10. Resultados relativos à expressão de <i>Zfp36l1</i> .....	61
3.11. Introdução da análise da expressão de <i>ZFP36L1</i> através dos dados dos transcriptomas e <i>microarrays</i> .....	62
3.11.1. Expressão de <i>Zfp36l1</i> em contexto de perda e ganho de osso .....	62
3.11.2. Expressão de <i>Zfp36l1</i> durante a diferenciação de osteoblastos .....	62
3.11.3. Comparação da expressão de ZFP36L1 durante o processo de diferenciação de células mesenquimais em adipócitos e osteoblastos .....	64
3.11.4. Estudos <i>in vivo</i> para modelos de osteoporose .....	66
3.12. Expressão de <i>Zfp36l1</i> num contexto de excesso de osso .....	70
3.13. Diferenciação de osteoclastos (Reabsorção óssea) .....	71
3.14. Diferenciação dos condrócitos .....	74
3.15. Patogénese da osteoartrose .....	75

<b>Capítulo 4: Discussão</b> .....	81
<b>Capítulo 5: Conclusão</b> .....	94
5.2. Perspetivas futuras.....	96
<b>Referências</b> .....	97
<b>Anexos</b> .....	XV

## ÍNDICE DE FIGURAS E GRÁFICOS

FIGURA 1 - ESTRUTURA ÓSSEA. ....	1
FIGURA 2 - DIFERENCIAÇÃO DE OSTEOBLASTOS .....	3
FIGURA 3 - REGULAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO DE OSTEOBLASTOS.....	4
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO DO MAPA MUNDIAL DOS DALYS. ....	7
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DO NÚMERO DE MORTES.....	8
FIGURA 6 - INTERAÇÃO RANKL-RANK/OPG.....	10
FIGURA 7 - RADIOGRAFIAS. ....	12
FIGURA 8 - FATORES DE RISCO DA OSTEOPOROSE.....	13
FIGURA 9 - MECANISMO DE AÇÃO DO DENOSUMABE .....	15
FIGURA 10 - FATORES DE RISCO DA OSTEOARTROSE .....	18
FIGURA 11 - ANORMALIDADES ÓSSEAS PERIARTICULARES .....	20
FIGURA 12 - SETAS A: NÓDULOS DE HEBERDEN E B: NÓDULOS DE BOUCHARD .....	21
FIGURA 13 - ESTRUTURA DO GENE ZFP36L1 HUMANO.....	24
FIGURA 14 - MECANISMO DE ZFP36L1 .....	27
FIGURA 15 - REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR .....	29
FIGURA 16 - IMAGEM CONFOCAL .....	31
FIGURA 17 - DOMÍNIOS TANDEM ZINC FINGER (TZF).....	48
FIGURA 18- COMPARAÇÃO DOS DOMÍNIOS DE LIGAÇÃO A NOT1 .....	49
FIGURA 19- ÁRVORE FILOGENÉTICA ZFP36L1 (RESUMO) .....	53
FIGURA 20 - PREVISÃO DA LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE ZFP36L1 .....	54
FIGURA 21- SEQUÊNCIA DO DOMÍNIO RESPONSÁVEL PELA TRANSLOCAÇÃO .....	55
FIGURA 22 - GRÁFICO RELATIVO AO SCORE DA PREDIÇÃO DE NOLS .....	55
FIGURA 23- LOCAIS DE PREVISÃO DE FOSFORILAÇÃO.....	56
FIGURA 24 – LOCAIS DE N-GLICOSILAÇÃO.....	58
FIGURA 25 - IMPACTO DA INFLUÊNCIA DE FERRO NA FORMAÇÃO ÓSSEA. ....	62
FIGURA 26 -GSE54461 EXPRESSÃO GENÉTICA TEMPORAL ATRAVÉS DA OSTEOBLASTOGÊNESE.....	63
FIGURA 27 - A E B – GSE148203 – SEQUENCIAÇÃO DE PRÓXIMA GERAÇÃO FACILITA A ANÁLISE QUANTITATIVA DE TRANSCRIPTOMAS DE MINERALIZAÇÃO DE OSTEOBLASTOS .....	64
FIGURA 28 - GSE174794 IDENTIFICAÇÃO DE GENES CANDIDATOS COMPARTILHADOS SIMULTANEAMENTE PELA ADIPOGÊNESE E OSTEOBLASTOGÊNESE A PARTIR DE CÉLULAS ESTAMINAIS MESENQUIMAIS HUMANAS.....	65
FIGURA 29 – GSE214645 ALTERAÇÃO FUNCIONAL DE CÉLULAS ESTAMINAIS MESENQUIMAIS ESQUELÉTICAS DE RATINHOS CORRELACIONADA COM A PROGRESSÃO DA OSTEOPOROSE.....	67
FIGURA 30 - GSE30081 AS DIETAS DE MIRTILO APENAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO INICIAL SÃO SUFICIENTES PARA PREVENIR A SENESCÊNCIA DOS OSTEOBLASTOS E A PERDA ÓSSEA NA IDADE ADULTA .....	68
FIGURA 31 - GSE35959 IDENTIFICAÇÃO DE GENES CANDIDATOS COMPARTILHADOS SIMULTANEAMENTE PELA ADIPOGÊNESE E OSTEOBLASTOGÊNESE A PARTIR DE CÉLULAS ESTAMINAIS MESENQUIMAIS HUMANAS .....	69
FIGURA 32 – GSE194301 A SEQUENCIAÇÃO DE NOVA GERAÇÃO FACILITA A ANÁLISE QUANTITATIVA DOS TRANSCRIPTOMAS DE UM MODELO OSTEOPORÓTICO DE PEIXE- ZEBRA QUANDO SUJEITO A TRATAMENTO COM DEXAMETASONA .....	70
FIGURA 33–GSE154800 ANÁLISE TWO-WAY ANOVA DA EXPRESSÃO DE ZFP36L1 EM RATINHOS DTRADQ E CRE NEGATIVO COMPARADOS COM WILD TYPE .....	71
FIGURA 34 A - GDS5464 EFEITO DE DEFICIÊNCIA NFATc1 NA DIFERENCIAÇÃO DE OSTEOCLASTOS IN VITRO. ....	72

FIGURA 35 -GSE138324 MATRIZ DE EXPRESSÃO DE MACRÓFAGOS E OSTEOCLASTOS DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA DE RATINHOS.....	73
FIGURA 36 - GSE176265 PERFIL DE EXPRESSÃO GENÉTICA DURANTE A DIFERENCIAÇÃO DE OSTEOCLASTOS MEDIADA POR RANKL.....	73
FIGURA 37-GSE166559 SEQUENCIAÇÃO DE RNA DE PRÓXIMA GERAÇÃO DE AMOSTRAS KNOCKDOWN DE LSD1 NA DIFERENCIAÇÃO DE OSTEOCLASTOS HUMANOS .....	74
<i>FIGURA 38 - GSE54216 ZONAS ARTICULARES E DE CARTILAGEM DA PLACA DE CRESCIMENTO: TÍBIA PROXIMAL NORMAL COM 10 DIAS DE IDADE. ....</i>	<i>75</i>
<i>FIGURA 39-GSE176199 AS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS RESIDENTES EM TECIDO SENESCENTE SÃO UMA FONTE INTERNA DE INFLAMAÇÃO NA CARTILAGEM OSTEOARTRÍTICA HUMANA .....</i>	<i>76</i>
<i>FIGURA 40- GSE6119 GLUCOSAMINA EXÓGENA PROTEGE GLOBALMENTE OS CONDROCITOS DOS EFEITOS ARTRITOGÊNICOS DA IL-1BETA.....</i>	<i>77</i>
FIGURA 41 -GSE173637 A PERIOSTINA INDUZ A DEGENERAÇÃO PRECOCE DA CARTILAGEM ARTICULAR NA DISPLASIA DO DESENVOLVIMENTO DA ANCA.....	78
FIGURA 42 – GSE164835 ANÁLISE BASEADA EM RNA-SEQ DE CONDROBLASTOS SUBMETIDOS À INIBIÇÃO GERAL DA CASPASE REVELOU A MODULAÇÃO DE UM ESPECTRO DE GENES RELACIONADOS À OSTEOARTROSE.....	79
FIGURA A1 – ÁRVORE FILOGENÉTICA PELO MÉTODO BAYESIANO.....	XVI
FIGURA A2- ÁRVORE FILOGENÉTICA POR MLH REFERENTE AO GENE ZFP36L1.....	XVIII
FIGURA A3- ÁRVORE FILOGENÉTICA POR NEIGHBOR JOINING .....	XVIII

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – LISTA DE ESPÉCIES ESTUDADAS .....	37
<b>TABELA 2</b> – TABELA DE ESTUDOS ESCOLHIDOS .....	44
<b>TABELA 3</b> – TABELA DE IDENTIDADE ENTRE ESPÉCIES .....	51
<b>TABELA 4</b> – PREDIÇÃO DA PROBABILIDADE DE LOCALIZAÇÃO .....	54
<b>TABELA 5</b> – PREVISÃO DA N-GLICOSILAÇÃO DE ZFP36L1 .....	58
<b>TABELA 6</b> – PROBABILIDADE DE ZFP36L1 SER O-GLICOSILADA .....	59
<b>TABELA 7</b> - REGIÃO SIGNIFICANTE DO GENE ZFP36L1 ASSOCIADA COM AIJ (ARTRITE REUMATÓIDE SISTÊMICA JUVENIL).....	60
<b>TABELA 8</b> - SNP POTENCIAL CAUSAL DAS REGIÕES DE RISCO DE AIJ .....	60
<b>TABELA A1</b> - SEQUÊNCIAS TERMINAIS DAS ISOFORMAS DO RUNX2 .....	XIV
<b>TABELA A2</b> - DOMÍNIOS DE ZFP36L1 HUMANO .....	XIV
<b>TABELA A3</b> – TABELA COMPLETA DE LOCAIS DE PREVISÃO DE FOSFORILAÇÃO .....	XIV
<b>TABELA A4</b> – TABELA COMPLETA DOS SCORES DE PROBABILIDADE DE ZFP36L1 SER O-GLICOSILADA.....	XIX

## LISTA DE ABREVIATURAS

AD – adipogénese  
ADQ -Cre – adiponectina-Cre  
ARE – Elementos ricos em UA  
ATF4 – Activating Transcription Factor 4  
bmMSCs – Células estromais mesenquimais da medula óssea  
BMP – proteína morfogenética do osso  
BMP-2 – Proteína morfogenética óssea 2  
BRF1 – fator de transcrição IIIB  
BSP - sialoproteína óssea  
CCR4-NOT – Repressão de catabólitos de carbono - Negativo em TATA-less  
CD47 – Cluster of Differentiation 47  
CDK – Quinases dependentes das ciclinas  
Colla1 - Colagénio 1a1  
Dlx5 - Distal-Less Homeobox 5  
DMO - densidade mineral óssea  
DP – desvio padrão  
DT – toxina de difteria  
DTR – recetor da toxina da difteria  
DXA – dupla absorciometria de raios-X de energia  
EGF – Fator de crescimento epidermal  
EGR1 – Early growth response protein 1  
FACS – Facial Action Coding System  
FosB - proteína reguladora 3 de troca de FosB e G0 / G1  
Fra1 - Fos-related antigen 1  
GFP – Proteína verde fluorescente  
HB-EGF – epiderme de ligação à heparina  
HDI – inibidor de histona desacetilase  
Hfe – Human homeostatic iron regulator protein  
hMSC – células estaminais mesenquimais humanas  
hMSCs – células estaminais mesenquimais humanas  
HuR – Human antigen R  
IDZ – zona intermediária/profunda

IFG – fator de crescimento semelhante à insulina  
IL-1 – Interleucina 1  
IL7R - receptor da interleucina 7  
INSM1 – proteína 1 associada ao insulinoma  
IRF8 – interferon regulador do fator 8  
KLF2 - Krüppel-like Factor 2  
KO - knockout  
Krox20 - Early growth response protein 2  
LSM1-7 – Proteína Sm-Like 1-7  
MAPKAPK2 – proteína quinase 2 ativada por MAP cinase  
MARK3 – Quinase 3 reguladora de afinidade de MAP / microtúbulos  
MMP – matriz metaloproteinase  
MSCs – células estromais mesenquimais  
Msx2 – Msh homeobox 2  
NCSCs – células estromais de cartilagem normal  
Nfatc1 – Fator de transcrição das células T ativadas c1  
NGF – fator de crescimento neural  
NOT1 – Regulador negativo geral da subunidade de transcrição 1  
NOVA – Neuro-oncological ventral antigen  
OA – osteoartrose  
OACs – cartilagem humana que contém condrócitos  
OB – osteoblastogénese  
OC - osteocalcina  
OP - osteopontina  
OPG – osteoprotegerina  
Osterix – Sp7 transcription factor (SP7)  
PD-L1 – Ligante de morte 1 programado  
PI3K – fosfatidilinositol3-quinase  
PKB – Proteína quinase B  
SET – SET nuclear proto-oncogene  
TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa  
XRN1 - 5'-3' Exoribonuclease 1



**CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E REVISÃO DE  
LITERATURA  
OSTEOARTROSE E OSTEOPOROSE**

# 1. Introdução à osteoartrose e osteoporose, manifestações clínicas e tratamento

## 1.1. Estrutura e osso

O osso é uma estrutura mineralizada porosa composta por células, vasos, e cristais de cálcio, sendo um tecido conjuntivo calcificado [1]. Os ossos do esqueleto fornecem suporte estrutural para o resto do corpo, permitem movimento para os músculos, protegem órgãos e estruturas internas vitais, fornecem manutenção da homeostase mineral e equilíbrio ácido-base, servem como reservatório de crescimento, fatores e citocinas, e fornecem o ambiente para a hematopoiese dentro dos espaços medulares [1].

A camada externa do osso é chamada de osso cortical, enquanto as internas são chamadas de osso esponjoso, é também constituído por um canal medular que contém medula óssea vermelha ou amarela (2). O esqueleto humano adulto é geralmente composto por 80% de osso cortical e 20% de osso trabecular ou esponjoso [1].

O osso cortical é coberto exteriormente pelo perióstio e interiormente pelo endóstio, enquanto o osso trabecular é sempre circundado pelo osso cortical (Figura 1) [1]. O osso cortical é mais rígido e capaz de resistir a tensões mais altas que o trabecular [1]. O osso trabecular contribui para o suporte mecânico, particularmente em ossos como as vértebras, e fornece os suprimentos iniciais de minerais em estados de deficiência aguda [2].

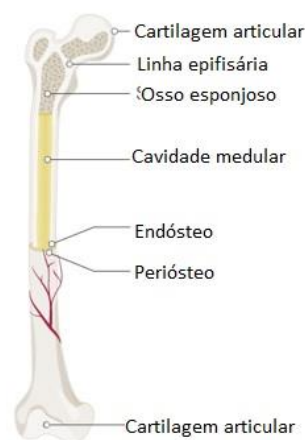


Figura 1 - Estrutura óssea, cartilagem articular, linha epifisária, osso esponjoso, cavidade medular, endóstio, perióstio. Imagem adaptada (3).

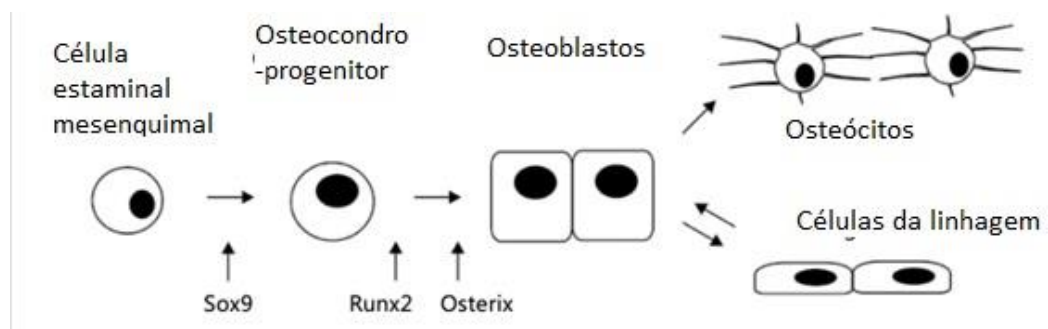
## 1.2. Diferenciação de osteoblastos

Os osteoblastos, células de revestimento ósseo e osteócitos surgem de células estaminais mesenquimais, que também dão origem a condrócitos, adipócitos, miócitos e fibroblastos (fig. 2). O processo de diferenciação precoce que leva à produção de células osteocondroprogenitoras envolve o SRY-Box Transcription Factor 9 (SOX9), o principal regulador transcricional da condrogênese. *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2) e *Sp7 transcription factor* (SP7) são os dois fatores críticos de transcrição que determinam a diferenciação da linhagem de osteoblastos. RUNX2, um membro da família de fatores de transcrição RUNX (Runt-related transcription factor), é caracterizado por um domínio de ligação ao DNA que é homólogo ao gene *runt* de *Drosophila* [3]. RUNX2 direciona células mesenquimais multipotentes para uma linhagem osteoblástica e impede-as de se diferenciar nas linhagens adipocíticas e condrocíticas. Depois de se diferenciar para pré-osteoblastos,  $\beta$ -catenina, SP7 e RUNX2 promovem o comprometimento para osteoblastos imaturos, que produzem proteínas da matriz óssea, bloqueando o seu potencial de se diferenciar na linhagem condrocítica. RUNX2 inibe a maturação dos osteoblastos e a transição para osteócitos, mantendo os osteoblastos num estágio imaturo (Figura 2) [4].

*Runx2* foi identificado como um gene causador da displasia cleidocraniana. Este gene é expresso em tecidos embrionários de ratinhos em células destinadas a se tornarem osteoblastos ou condrócitos no embrião em desenvolvimento e em todos os osteoblastos independentemente do seu estágio de diferenciação. Ratinhos *Runx2*<sup>-/-</sup> são incapazes de produzir osso endocondral ou intramembranoso, mas podem produzir adipócitos e condrócitos. [3].

A via de sinalização Wnt (Wingless/integrated) nos osteoblastos contém uma série de moléculas que são agora vistas como um dos mais importantes reguladores da formação óssea durante o crescimento e desenvolvimento devido à sua mediação de alguns dos diálogos regulatórios entre osteoblastos e osteoclastos. Wnts são glicoproteínas nos osteoblastos que atuam em recetores compostos por uma proteína Frizzled (semelhante ao recetor acoplado à proteína G) e uma de duas proteínas relacionadas ao recetor de lipoproteína de baixa densidade (LRPs): LRP5 ou LRP6. A ativação do recetor Wnt resulta na desfosforilação e acúmulo de  $\beta$ -catenina intracelular e sua translocação para o núcleo, onde interage com fatores de transcrição para controlar a expressão gênica dos osteoblastos. A família de proteínas Dickkopf atua como um

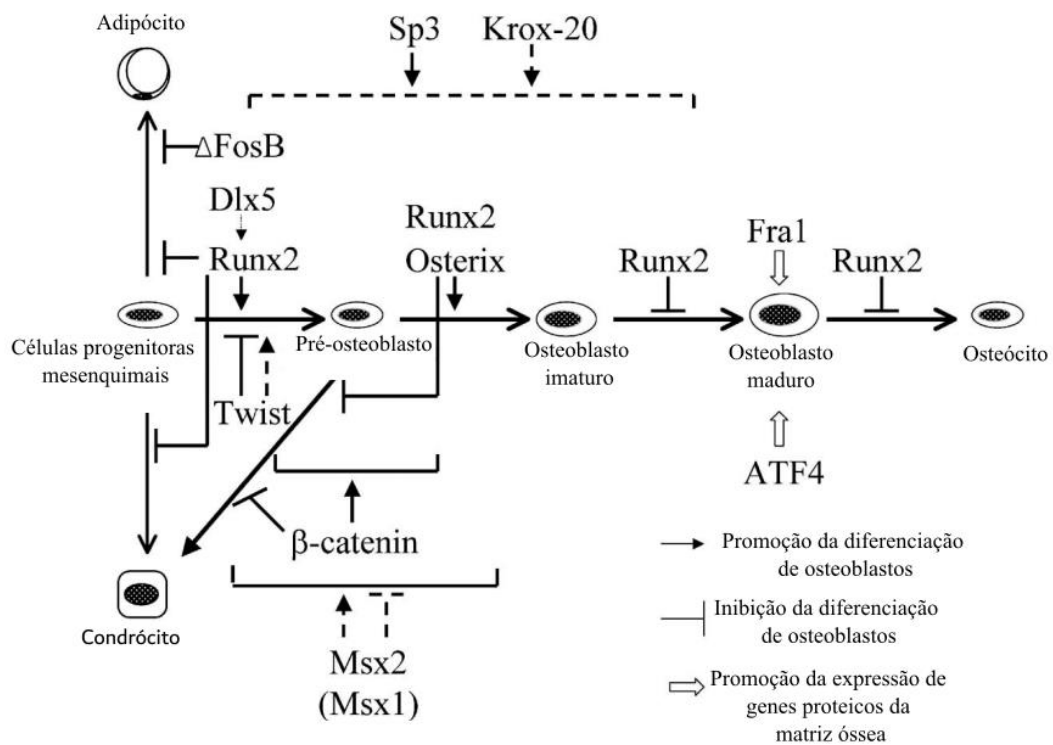
regulador negativo da sinalização Wnt, ligando-se ao LRP5/6 e outro coreceptor de superfície celular, Kremen, causando a internalização e destruição do complexo resultante e reduzindo a densidade de Wnt. Mutações em Wnt1 recentemente demonstraram causar osteogênese imperfeita (OI) tipo XV. Mutações de ganho de função em LRP5 resultam em distúrbios de alta massa óssea hiperostose e osteoesclerose endosteal, osteopetrose autossômica dominante tipo 1 e doença de van Buchem tipo 2, enquanto mutações de perda de função em LRP5 resultam na síndrome de osteoporose-pseudoglioma de baixa massa óssea e uma forma de osteoporose [3].



*Figura 2* - Diferenciação de osteoblastos. Os osteoblastos surgem de uma célula precursora multipotente de origem mesenquimal (célula estaminal mesenquimal). Uma célula osteocondrogenitora capaz de formar tanto condrócitos quanto osteoblastos surge sob o controle do fator de transcrição SOX9. RUNX2 é o regulador chave da diferenciação de osteoblastos e é constitutivamente expresso em osteoblastos em todos os estágios de diferenciação. Um segundo fator de transcrição, SP7, atua a jusante de RUNX2 na diferenciação de osteoblastos. Os osteoblastos podem ainda diferenciar-se em osteócitos que se alojam na matriz óssea ou em células de revestimento nas superfícies ósseas. Imagem adaptada de (4).

Como foi dito anteriormente, as células estaminais mesenquimais diferenciam-se em osteoblastos imaturos, que expressam genes de proteína da matriz óssea, através das ações de RUNX2, SP7 e  $\beta$ -catenina. Os osteoblastos imaturos, que expressam altos níveis de osteopontina, diferenciam-se em osteoblastos maduros, que expressam altos níveis de osteocalcina, e, finalmente, os osteoblastos maduros são incorporados na matriz óssea para se tornarem osteócitos. O RUNX2 é expresso em 2 isoformas diferentes dependendo da sua terminação amino diferente. Se a sequência amino terminal for MRIPV em vez de MASNSLFSAVTPCQSQSFFW, é tipo I em vez de tipo II (Tabela A1 dos anexos) [5]. A sobreexpressão do tipo II do RUNX2 causa osteopenia e a maturação dos osteoblastos e a transição dos osteoblastos para osteócitos são severamente inibidas. Os locais de ligação ao DNA do RUNX2 nos principais genes de proteína da matriz óssea, incluindo os genes colágeno 1a1 (*COL1A1*), osteopontina (*OP*), sialoproteína óssea (*BSP*) e osteocalcina (*OC*), foram identificados, e o RUNX2 induz a expressão desses genes ou ativa os seus

promotores *in vitro*. No entanto, a sobreexpressão do *RUNX2* em osteoblastos reduz severamente a expressão de osteocalcina, apesar do achado de que *RUNX2* induz fortemente a expressão de osteocalcina na linhagem celular de fibroblastos embrionários de ratinhos. Além disso, a sobreexpressão do tipo I *RUNX2* inibe a maturação dos osteoblastos e a transição para osteócitos. No entanto, o grau de inibição da maturação dos osteoblastos e a transição para osteócitos são muito mais suaves em ratinhos transgênicos *RUNX2* tipo I do que em ratinhos transgênicos *RUNX2* tipo II. Portanto, esses estudos indicam que o *RUNX2* desencadeia a expressão dos principais genes proteicos da matriz óssea num estágio inicial da diferenciação dos osteoblastos, levando as células a adquirirem um fenótipo osteoblástico, mas mantendo uma célula osteoblástica num estágio imaturo [4]. Portanto, o *RUNX2* desempenha um papel importante na manutenção de um suprimento de osteoblastos imaturos (figura 3) [4].



*Figura 3* - Regulação da diferenciação de osteoblastos por fatores de transcrição. Além de Runx2, Osterix e β-catenina, muitos fatores de transcrição estão envolvidos na diferenciação de osteoblastos. As proteínas de torção interagem com o Runx2 e inibem a função Runx2. No entanto, Twist e Msx2 promovem cooperativamente a diferenciação de osteoblastos. Alguns estudos relataram que o Msx2 aumenta a diferenciação de osteoblastos, enquanto outros estudos relataram que o Msx2 o inibe. Também foi relatado que o Msx2 promove a proliferação de osteoblastos. O envolvimento do Msx1 na diferenciação de osteoblastos é limitado em comparação com o Msx2. As linhas pontilhadas indicam que a função fisiológica ou o estágio em que o fator funciona principalmente ainda precisa ser provado. Imagem adaptada de [4]. Sp3 – Sp3 transcription factor (Sp3), Krox20 - Early growth response protein 2, FosB - proteína reguladora 3 de troca de FosB e G0 / G1, Dlx5 - Distal-Less Homeobox 5, Runx2 - RUNX Family Transcription Factor 2, Osterix – Sp7 transcription factor (SP7), Fra1 - Fos-related antigen 1, Msx2 – Melanocyte-stimulating hormone (Msh) homeobox 2, ATF4 – *Activating Transcription Factor 4*

### 1.3. Metabolismo do osso

Para entender a patofisiologia da osteoporose e osteoartrose, é necessário entender a fisiologia do osso [6]. Os componentes celulares que constituem o osso são: osteócitos, osteoclastos e osteoblastos [7]. Os osteócitos são células ósseas multifuncionais que são circundadas por matriz óssea mineralizada, são derivados de osteoblastos e constituem 90% a 95% das células do osso [8]. No final da formação do osso, os osteoblastos podem ficar embutidos no osso como osteócitos, podem tornar-se células do revestimento ósseo ou sofrer apoptose [8]. Os osteócitos secretam esclerostina (SOST, proteína que funciona como regulador negativo da massa óssea) [9]. Além disso, os osteócitos podem atuar como células mecanossensoriais, transformando a tensão mecânica em sinalização química para os osteoblastos e osteoclastos [9]. Portanto, o osteócito desempenha um papel importante na biologia óssea, especificamente no processo de remodelação, uma vez que regula tanto a atividade dos osteoblastos quanto dos osteoclastos [9]. Os osteoclastos são as células que degradam o osso para iniciar a remodelação óssea normal e mediar a perda óssea em condições patológicas [10]. São derivados de precursores na linhagem mieloide/monócitos que circulam no sangue após a sua formação na medula óssea, surgindo de granulócitos macrófagos [10]. Enquanto os osteoblastos promovem a integridade e a formação da estrutura óssea pela remoção da matriz antiga [11].

Mutações no gene *SOST* causam alta massa óssea em humanos e a deleção resulta em alta massa óssea em ratinhos [12].

Quando o osso é formado no feto, a maior parte do esqueleto é composta por cartilagem derivada da mesoderme embrionária que posteriormente é substituída por osso após o nascimento [12]. Ao longo da infância e adolescência, os ossos crescem até tornarem-se mais longos, mais densos e mais fortes [12]. Por norma, os ossos param de crescer aos 20 anos, e aos 30 atingiram a densidade óssea máxima [12]. Antes dos 30 anos, a atividade dos osteoblastos é maior do que a atividade dos osteoclastos, no entanto, após o final dos trinta anos, o oposto acontece uma vez que a formação óssea não acompanha mais a remoção óssea [12].

Após os 40 anos de idade, a reabsorção óssea excede a formação óssea, resultando em diminuição da densidade do osso [8]. Quando a reabsorção óssea excede a formação óssea ao ponto onde 25% da massa óssea é perdida em comparação com a massa óssea de uma pessoa de 30 anos, é chamado de osteoporose [8,13].

A biologia da recuperação de uma fratura óssea consiste no facto de esta ocorrer sem o desenvolvimento de uma cicatriz fibrosa. Para tal, a ação das metaloproteinases, o envolvimento de vários sistemas endócrinos que afetam a homeostase do fosfato e do cálcio e o sistema hematopoiético e sua regulação dos progenitores de células estaminais mesenquimais são essenciais [14]. Entre os vários mecanismos ocorre resposta inflamatória aguda, geração de um calo ósseo cartilaginoso e periosteal, revascularização e neoangiogénese do sítio da fratura, assim como mineralização e reabsorção do calo cartilaginoso [14].

## **1.4. Osteoporose**

### **1.4.1.1. Epidemiologia da osteoporose**

A osteoporose (OP) é um grande problema de saúde pública, com alto impacto económico nas sociedades desenvolvidas e emergentes [15]. Apesar de, devido ao desenvolvimento farmacológico nos últimos 50 anos, a OP já não ser considerada uma doença inevitável, esta não só é uma das principais causas de fraturas, mas também ocupa um lugar alto entre as doenças que causam incapacidade, dependência e acamamento [15,16]. Estas podem causar complicações com risco de vida em idosos. Embora a OP tenha sido um tema muito falado na última década na comunidade médica, o tratamento OP ainda é oferecido apenas a uma minoria dos pacientes. Mesmo na OP estabelecida, em Portugal, apenas 4,5% a 14,4% dos pacientes recebem medicação anti-OP. A prevalência de OP é de 11% em mulheres e 2% em homens. Em Portugal, estima-se um número de fraturas por fragilidade da anca em cerca de 9500 por ano. No ano seguinte à fratura, 10-20% destes doentes acabam por falecer e 50% perdem a sua capacidade funcional de base. Além disso, estima-se que o custo anual das fraturas por fragilidade na Europa tenha sido de 30 mil milhões de euros em 2013 [15].

Num estudo mais recente, em 2020, de acordo com um relatório do US Surgeon General, aproximadamente 10 milhões de americanos com mais de 50 anos têm osteoporose, com mais 34 milhões em risco de contrair a doença. As fraturas osteoporóticas nos EUA são extremamente comuns, com uma estimativa de 1,5 milhão sofrendo fraturas por fragilidade a cada ano. Uma carga similar foi observada no Reino Unido, com estudos epidemiológicos levantando a hipótese de que uma em cada duas mulheres e um em cada cinco homens com mais de 50 anos sofrerá uma fratura

osteoporótica durante a vida [16]. No mundo, 200 milhões de mulheres sofrem de OP (Figura 4) [17].

A

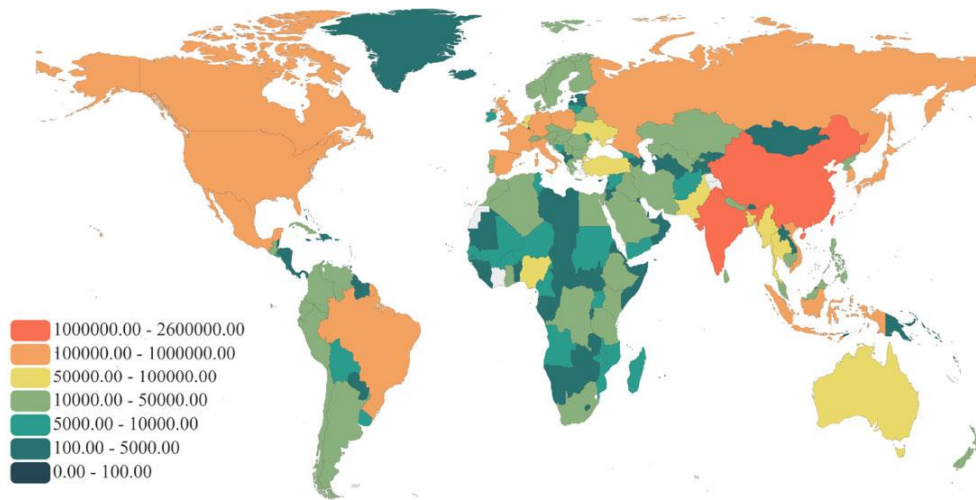
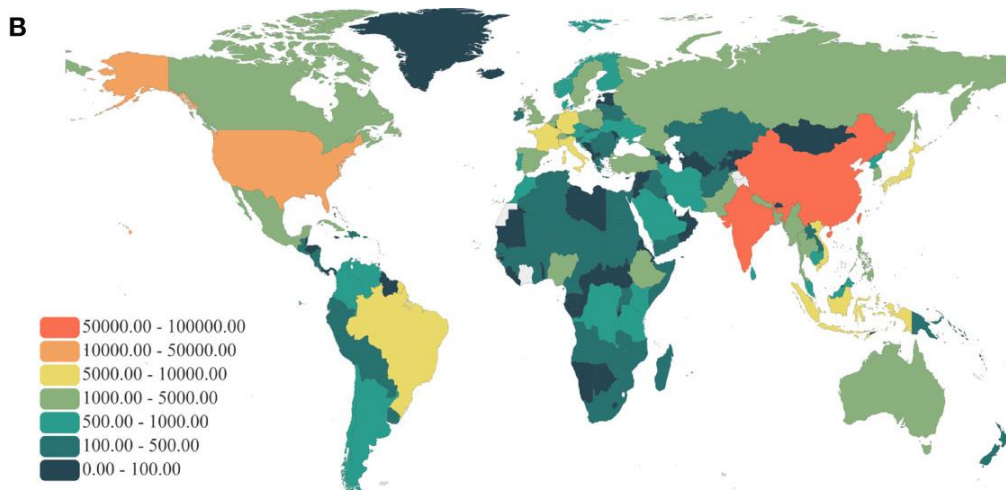


Figura 4 - Representação do mapa mundial representativo dos DALYs (Disability-adjusted life years, 1 DALY equivale a um ano de perda total da saúde) relacionados com fraturas associadas a baixa DMO (densidade mineral óssea) em 2019. Imagem adaptada de Yuyan Shen et al [17].

De todos os tipos de fratura, as fraturas de quadril são as que estão associadas aos níveis mais altos de morbidade. A taxa de mortalidade da fratura de quadril é significativa, com uma taxa de aproximadamente 8% em homens e 3% em mulheres acima de 50 anos hospitalizadas após fratura. Doenças coexistentes e mau estado funcional da pré-fratura são determinantes chave do risco de mortalidade pós-fratura, que é maior imediatamente após a fratura, diminuindo gradualmente ao longo do tempo. É de notar, no entanto, que um risco elevado de morte demonstrou persistir por até 10 anos após a fratura. A morte após fratura de quadril não é apenas atribuível à própria fratura; em vez disso, exacerbação prévia de outras comorbidades crônicas provavelmente contribuem para a redução da expectativa de vida e, de fato, para a ocorrência da fratura [16]. Cerca de 17 milhões de pessoas morreram devido a fratura por OP em 2019 (Figura 5) [17].



*Figura 5 - Representação do número de mortes causadas por fratura por baixa DMO num mapa mundial em 2019. Imagem de Yuyan Shen et al [17].*

#### **1.4.2. Patofisiologia da Osteoporose**

A osteoporose é uma condição esquelética caracterizada pela diminuição da densidade (massa/unidade de volume) de osso normalmente mineralizado [18]. A densidade reduzida prejudica a resistência mecânica do osso, tornando-o mais vulnerável à fratura [18]. A massa óssea pode ser medida através da densidade mineral óssea (DMO) [19]. A DMO é uma das componentes chaves para a força óssea [20]. No diagnóstico de osteoporose e na predição de fratura de risco é bem estabelecida [20]. A DMO fornece informações clínicas úteis sobre alterações de todo o esqueleto sob condições específicas [20]. A distribuição do conteúdo mineral ósseo segue uma distribuição gaussiana normal depois do pico mineral ósseo ser alcançado e, devido a esta distribuição normal, o osso tem valores de densidade que podem ser expressos em desvios padrão (DP) [19]. Um valor de DMO entre -2,5 e -1 DP, abaixo da média para adultos jovens é denominado como osteopenia, enquanto uma DMO abaixo de -2,5 DP é referido como osteoporose [21]. A patogénese da osteoporose envolve uma série de fatores, incluindo genética, hormonas sistémicas, fatores de crescimento, citocinas inflamatórias, o sistema imunológico, anormalidades do estrogénio, nutrição, exercícios, escolhas de estilo de vida e medicamentos [22].

A osteoporose foi classificada em duas categorias, primária e secundária. A osteoporose primária é dividida em três tipos:

- osteoporose pós-menopausa (tipo I),

- osteoporose relacionada com a idade (tipo II)
- osteoporose idiopática [18].

A osteoporose pós-menopausa (Tipo I) desenvolve-se em mulheres com deficiência de estrogénio, enquanto a osteoporose relacionada com a idade (Tipo II) ocorre em homens e mulheres à medida que a densidade óssea diminui com o envelhecimento [18].

Já a osteoporose secundária refere-se àqueles pacientes nos quais um fator causador ou processo de doença é identificável [18].

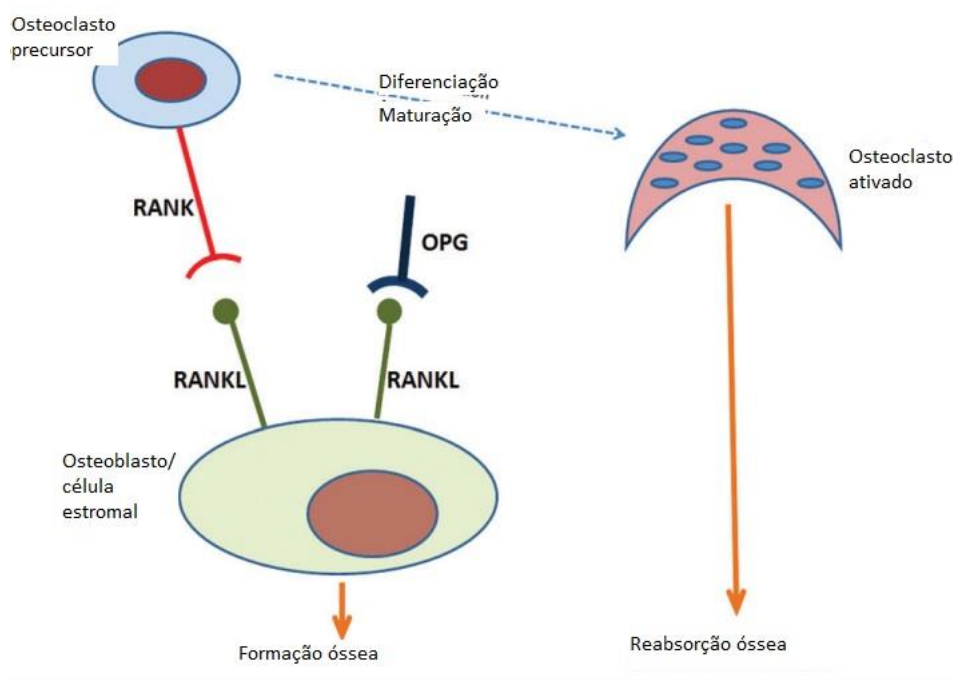
As hormonas sexuais são potentes moduladores da inflamação e renovação óssea [23]. Variações nos seus níveis sistémicos levam à desregulação dos processos biológicos [23].

A deficiência de estrogénio é um dos fatores mais estudados que levam ao desenvolvimento da osteoporose [22].

Osteoclastos e osteoblastos expressam recetores de estrogénio que se ligam ao estrogénio levando à regulação positiva de osteoprotegerina (OPG) e bloqueia a suprarregulação do fator nuclear do ativador do recetor-Ligante  $\kappa$ B (RANKL) [24]. OPG é um inibidor competitivo de RANKL e antagoniza as ações de RANKL [24].

OPG é uma proteína que diminui o processo de perda óssea e ajuda a manter o equilíbrio entre a reabsorção e formação dos ossos, enquanto RANKL é uma proteína que estimula a formação, função e sobrevivência de osteoclastos, e cada um desses efeitos é inibido pela OPG [25]. A OPG suprime a reabsorção óssea e aumenta a densidade, área e força do osso esponjoso e cortical (Figura 6) (14).

Em mulheres pós-menopáusicas a deficiência de estrogénio diminui diretamente a proteína OPG e indiretamente aumenta a proteína RANKL [25]. Posteriormente, isso leva a níveis mais elevados de formação de osteoclastos e, em última instância, perda óssea [26].



*Figura 6* - Interação do complexo biomolecular RANKL-RANK/OPG. RANK é encontrado no osteoclastos, produz OPG e protege o esqueleto da reabsorção óssea excessiva. Os osteoclastos expressam recetores de estrogénio que levam à regulação positiva da OPG e bloqueia a suprarregulação do RANKL, levando por última instância à formação óssea. Imagem adaptada [26].

O desenvolvimento da osteoporose da mesma forma nos homens ocorre devido ao declínio da testosterona como consequência da idade [25]. O declínio na testosterona é gradual, ao contrário do rápido declínio do estrogénio nas mulheres após a menopausa e é referido como “andropausa” ou “menopausa masculina” [25].

A testosterona é a principal hormona androgénica envolvida em uma variedade de atividades em humanos [23]. Esta afeta potencialmente o metabolismo ósseo através da inflamação. Os mecanismos propostos incluem regulação de citocinas e ações diretas sobre precursores de osteoblastos e osteoclastos [23]. Tanto a testosterona como o seu metabólito não aromatizável  $5\alpha$ -dihidrotestosterona demonstraram diminuir a diferenciação ou atividade dos osteoclastos [23]. Este impacto tem sido, em parte, ligado à regulação osteoblástica da osteoclastogénese, sugerindo que a renovação óssea e o acoplamento osteoblasto/osteoclasto são alvos das mudanças nos níveis de testosterona na circulação [23].

A testosterona representa um papel importante nos pré-osteoblastos, causando diretamente a diferenciação em osteoblastos maduros [23].

A testosterona também pode ser convertida em estrogénio através da enzima aromatase e, nos homens, segue o mesmo caminho que descrito acima [23]. Assim, a

principal causa da osteoporose em mulheres é a deficiência de estrogênio devido à menopausa, enquanto nos homens é a deficiência de testosterona, a qual está relacionada com a idade [23]. Outros fatores podem afetar a perda óssea: a diminuição da ingestão de cálcio (nutrição), pode diminuir a absorção intestinal de cálcio e, subsequentemente, aumentar a liberação da hormona da paratiróide e ativar RANKL [23]. Além disso, o envelhecimento também é um fator de risco para osteoporose, uma vez que o pico de massa óssea vai diminuindo naturalmente com a idade após os 30 anos [23].

#### **1.4.2.1. Manifestações clínicas da osteoporose**

A osteoporose é uma doença silenciosa comum em homens e mulheres e o diagnóstico ocorre durante uma avaliação com o médico especialmente quando ocorre fratura por fragilidade (Figura 7) [6,13]. Na osteoporose em norma há um longo período de latência antes do desenvolvimento de sintomas ou complicações clínicas (B). As fraturas por fragilidade ocorrem com mínimo trauma, sendo mais comum a queda de altura em pé, e pode resultar em dor crônica, morbidade e até mesmo mortalidade, sendo que as fraturas mais comuns incluem compressão dos corpos vertebrais e fraturas de costelas, fêmur, úmero e rádio (23, B). As causas das quedas costumam ser distúrbios neurológicos e musculoesqueléticos, distúrbios cardiovasculares e distúrbios visuais, todos comuns na população idosa (B). Outras causas extrínsecas são o uso excessivo de medicamentos, sedativos e pouca iluminação (B). A reduzida resistência ao trauma assim como a baixa massa óssea podem contribuir para a alta incidência de fratura (B). Portanto pessoas com maior massa corporal têm menor risco de fraturas (B).



*Figura 7 - Osso Osteoporótico. a–c | Radiografias mostram fraturas (setas) do fêmur proximal (a), rádio distal (b) e vértebra (c). d–g | Alta resolução. A TC quantitativa permite o estudo do trabecular (o compartimento interior esponjoso do osso) e corticais (a camada compacta e externa do osso) componentes do rádio (parte d e parte f) e a tíbia (parte e e parte g). Comparado com os controles (parte d e parte e), osteoporose (parte f e parte g) é caracterizada por afinamento do córtex e redução da massa óssea trabecular com perda de conectividade trabecular. Imagem adaptada de [28].*

#### 1.4.2.2. Fatores de risco da osteoporose

Os fatores de risco estabelecidos para osteoporose e fraturas associadas são idade avançada, sexo feminino, raça caucasiana, remoção dos ovários em idade precoce, imobilidade prolongada e uso prolongado de corticosteroides [29]. Estudos de pesquisa apontam para uma série de fatores de risco para osteoporose que são modificáveis, incluindo fatores de dieta e estilo de vida, enquanto alguns fatores não são modificáveis. Os fatores modificáveis incluem: perda de peso, sedentarismo, dieta inadequada, consumo de álcool, ingestão de tabaco e stress. Os fatores não modificáveis incluem: histórico de quedas e fraturas, idade avançada, sexo feminino, etnia caucasiana e histórico familiar de OP. Já as causas secundárias da OP incluem: condições crônicas prévias, deficiência de vitamina D e fatores hormonais (Figura 8) [30].

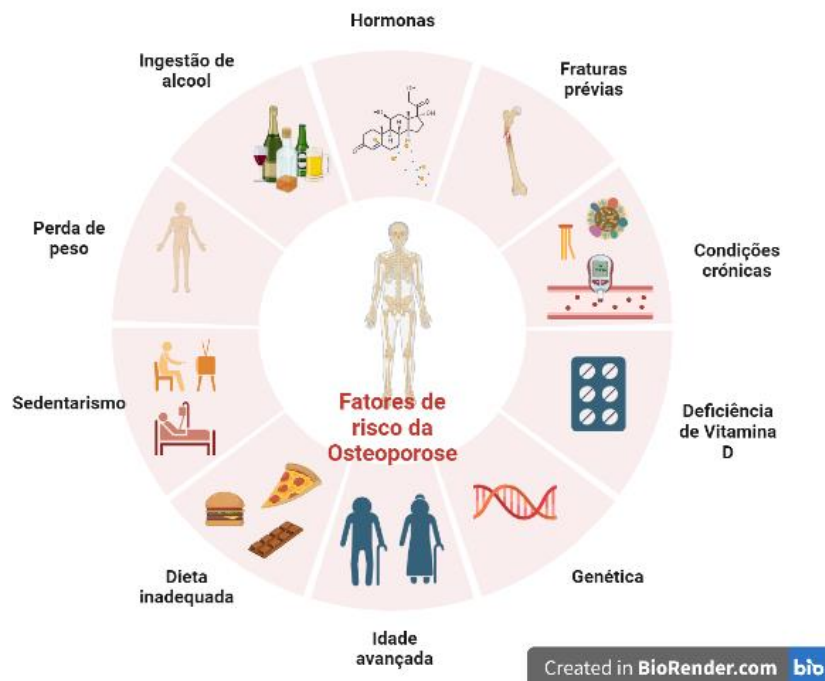


Figura 8 - Fatores de risco da Osteoporose. Imagem criada no *biorender.com*

### 1.4.2.3. Diagnóstico da osteoporose

É de notar que os genes devem ser considerados como biomarcadores eficazes de diagnóstico precoce, especialmente para indivíduos de famílias de alto risco [30].

No entanto, segundo as diretrizes atuais da prática clínica em relação ao diagnóstico e tratamento da osteoporose sugerem aos indivíduos, homens e mulheres, com idade superior a 50 anos sejam avaliados quanto aos fatores de risco associados a osteoporose e fatores associados a alto risco de fratura [27]. Para evitar fatores de risco deve-se medir a altura anualmente, avaliando a presença de fratura vertebral, o histórico de quedas no ano anterior e fazer um hemograma [27]. Mas a maneira mais precisa de diagnosticar a osteoporose é usar um instrumento para medir a densidade óssea [27].

Existem várias ferramentas para medir o conteúdo mineral ósseo e o risco de fratura, incluindo: radiografia, dupla absorciometria de raios-X de energia (DXA), ultrassom e tomografia computadorizada [27]. A radiografia funciona por emitir raios X que passam pelos ossos e detectar o que não é absorvido [27]. Quanto mais denso o osso, mais energia de raios-X é absorvida, enquanto áreas menos densas e mais porosas absorvem menos energia [27].

Para as mulheres, existem quatro categorias gerais de diagnóstico propostas pela OMS para as avaliações feitas com DXA:

1. Normal - T-score de DMO de quadril maior que 1 DP abaixo da média de referência do sexo feminino adulto jovem

(T-score  $\geq$  -1,00 DP);

2. Osteopenia - T-score de DMO de quadril menor que -1,00 DP abaixo da referência do sexo feminino adulto jovem

média, mas maior que -2,5 DP;

3. Osteoporose - T-score de DMO de quadril menor que -2,5 DP abaixo da referência do sexo feminino adulto jovem

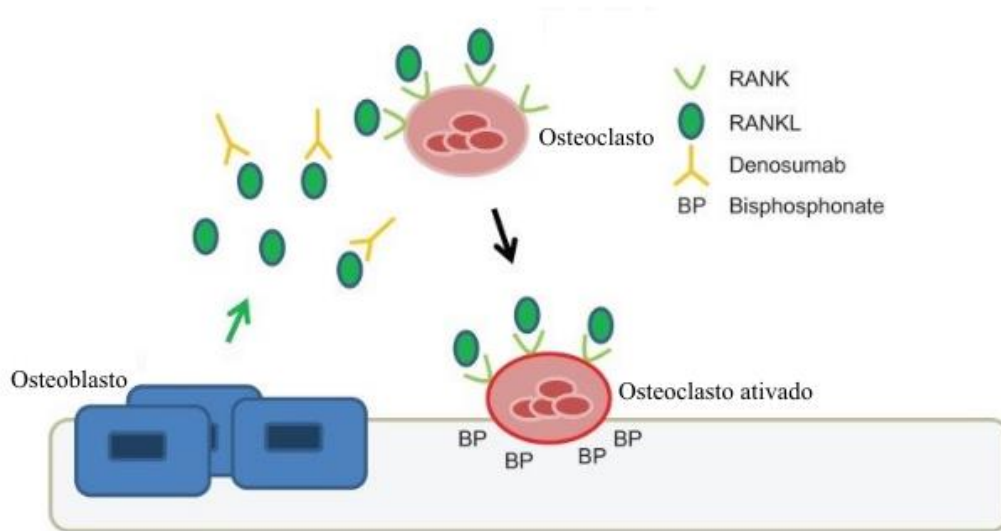
quer dizer;

4. Osteoporose grave - pontuação T de DMO de quadril inferior a -2,5 DP abaixo da mulher adulta jovem e a presença de uma ou mais fraturas por fragilidade. [27]

#### **1.4.2.4. Terapia farmacológica da osteoporose**

O objetivo da terapia farmacológica é reduzir o risco de fraturas [31]. Vários tratamentos eficazes com medicamentos para a osteoporose tornaram-se amplamente disponíveis na passada década e incluem agentes antirreabsortivos, como bisfosfonatos, denosumabe, calcitonina e raloxifeno, e agentes anabólicos (formadores de osso), como teriparatida [31,31]. Os bisfosfonatos são o padrão de medicamentos antirreabsortivos, eles inibem a reabsorção óssea através da indução da apoptose dos osteoclastos [32,33]. Tanto estes como o denosumabe aumentam a DMO e diminuem o risco de fraturas [34]. O denosumabe é um anticorpo monoclonal que se liga com alta afinidade e especificidade ao RANKL, impedindo-o de ligar-se a RANK e inibe a diferenciação de osteoclastos enquanto permite que OPG se ligue e ative células osteoblásticas (Figura 9) [33].

Além da prescrição de terapia farmacológica, as *guidelines* também recomendam suplementação de cálcio e de vitamina D [35].



*Figura 9* - Mecanismo de ação do denosumabe comparado ao ácido zoledrónico. RANKL é secretado por células estromais da medula óssea e osteoblastos. O RANKL liga-se ao receptor RANK nos osteoclastos e promove a diferenciação e a atividade dos osteoclastos. O denosumab é um anticorpo monoclonal totalmente humano que se liga ao RANKL e, assim, inibe a ativação de osteoclastos pelo RANKL. Bisfosfonatos (por exemplo, ácido zoledrónico) ligam-se ao osso, entram e inibem a reabsorção óssea pelos osteoclastos. Imagem adaptada de (32).

## **1.5. Osteoartrose**

### **1.5.1. Articulação - definição**

Uma articulação é um ponto onde dois ossos fazem contato. As articulações podem ser classificadas histologicamente no tipo dominante de tecido conjuntivo e funcionalmente com base na quantidade de movimento permitida. Sendo histologicamente [36]:

1. Fibrosas – ossos unidos por tecido conjuntivo fibroso
2. Cartilagíneas – ossos unidos por cartilagem
3. Sinoviais – ossos não estão diretamente unidos; a cápsula articular faz a ligação entre os ossos

E funcionalmente podem ser classificados como [36]:

1. Sinartrose – pouca ou nenhuma mobilidade
2. Anfiartrose – ligeiramente móvel
3. Diartrose – elevada mobilidade

A osteoartrose é uma patologia comum das articulações sinoviais [37].

### **1.5.2. Articulações sinoviais – definição**

As articulações sinoviais são compostas de cartilagem articular que cobre cada extremidade dos elementos esqueléticos opostos, com fluido sinovial que lubrifica e nutre os tecidos, ligamentos que mantêm os elementos esqueléticos sob controle, e uma cápsula fibrosa que isola as articulações dos tecidos circundantes. Embora poucos em número, os tecidos articulares são altamente especializados em estrutura e função. Isso é ilustrado pela cartilagem articular com sua matriz extracelular única, resiliência biomecânica única, sua natureza em grande parte avascular, e sua capacidade de persistir através da vida com o mínimo de rotatividade de suas células e componentes [38].

### **1.5.3. Articulações sinoviais – fisiologia**

As articulações sinoviais surgem através de dois processos principais. Em ossos longos, a diferenciação cartilaginosa ocorre em todos os locais das articulações prospectivas que, em seguida, segmentam em segundo lugar. Esse processo ocorre através do desenvolvimento de uma região não cartilaginosa conhecida como interzona ou zona intermédia (IZ). A interzona torna-se um importante centro de sinalização para os elementos opostos, que podem regular o crescimento através de fatores como o growth differentiation factor 5 (GDF-5) [39]. A IZ serve como uma zona progenitora para os condrócitos articulares [38]. A IZ também expressa proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e seus antagonistas, como a noggin. A sobreexpressão dos BMPs, ou a perda de noggin leva a fusões articulares. A interzona expressa o Wnt-14, que parece ser específico para esta região no sistema em desenvolvimento, e regula a sua natureza não condrogénica. Além disso, à medida que a interzona se dispersa durante o alargamento da cavidade, a cartilagem articular desenvolve-se a partir dessa população. Finalmente, o desenvolvimento da cartilagem articular progride através do crescimento aposicional impulsionado por uma subpopulação progenitora/célula estaminal que reside na superfície articular. Os elementos individuais do esqueleto estão conectados em regiões denominadas articulações [39].

### **1.5.4. Osteoartrose – Epidemiologia**

A osteoartrose (OA) é uma das formas mais comuns e incapacitantes de artrite em todo o mundo, sendo a dor nas articulações o principal sintoma [40]. A OA é uma das mais comuns condições crónicas de saúde, tendo impacto não apenas na dor e na saúde física, mas também em muitos outros resultados, incluindo saúde mental, sono, participação no trabalho, podendo levar até à mortalidade [41].

Em 2019, 528 milhões de pessoas no mundo tinham OA, um aumento de 113% comparado com 1990. 73% tinham mais de 50 anos e 60% eram mulheres. Com o envelhecimento da população, é expectável que a percentagem de pessoas com OA continue a aumentar ao longo dos anos [42].

Pessoas com OA correm maior risco de morte devido a doenças cardiovasculares. A relação com a mortalidade geral é menos clara, mas pode ser moderada pela presença de OA na mão [43].

### 1.5.5. Osteoartrose – Fatores de risco

A osteoartrose (OA) é uma doença crônico-degenerativa caracterizada pela perda de cartilagem. A sua prevalência é alta, sendo uma das principais causas de incapacidade. A causa da OA não é conhecida; no entanto, as evidências atuais indicam que é multifatorial. Os principais fatores de risco para a osteoartrose são idade, sexo feminino, obesidade, fatores geográficos, trabalho físico, fatores genéticos e raça, trauma articular, deficiência de vitamina D e condrocalcinose, uma desordem reumatológica com manifestações clínicas variadas devido à precipitação de cristais de pirofosfato de cálcio dihidratado nos tecidos conjuntivos (Figura 10) [44].



Figura 10 - Fatores de risco da Osteoartrose. Imagem criada com *biorender.com*

### 1.5.6. Osteoartrose – Patologia

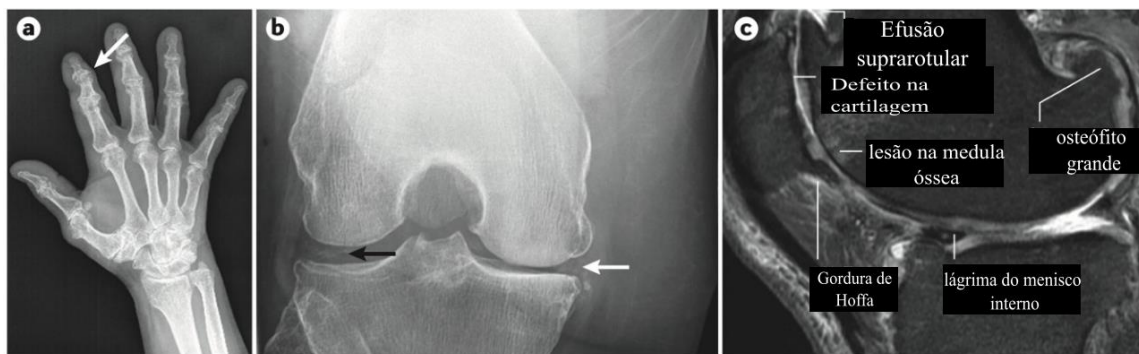
As articulações altamente móveis são as mais suscetíveis a lesões. A forma mais comum de patologia relacionada com articulações é a osteoartrose. É um distúrbio comum das articulações sinoviais, visto com mais frequência em pacientes mais velhos. As articulações mais comumente afetadas são joelho, quadril, mãos e a primeira articulação metatarsofalangeana [45]. O envolvimento de outras articulações, como tornozelo, punho e ombro, é incomum e sugere uma etiologia secundária. Embora a

osteoartrose possa estar presente em muitas articulações, os sintomas geralmente são evidentes em uma ou duas articulações, no máximo [45].

A osteoartrose ocorre quando há um desequilíbrio da homeostase entre a degradação e a reparação da cartilagem hialina devido ao aumento das citocinas inflamatórias do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 (IL-1), assim como liberação de metaloproteinases, enzimas que digerem a matriz extracelular [46]. As interações na matriz extracelular são mediadas pelas integrinas, as integrinas modulam a sinalização celular/matriz extracelular (MEC), essencial para regular o crescimento e a diferenciação e manter a homeostase da cartilagem [47]. Durante a OA, a expressão anormal da integrina altera a sinalização célula/MEC e modifica a síntese de condrócitos, com o desequilíbrio de citocinas destrutivas sobre fatores reguladores: IL-1 e TNF- $\alpha$  [47]. A atividade de MMP é parcialmente inibida pelos inibidores teciduais de MMPs (TIMPs), cuja síntese é baixa em comparação com a produção de MMP na cartilagem de pacientes com OA [47]. Já os fatores de crescimento TGF- $\beta$ , IGF, BMP, NGF reparam o dano tecidual induzido por fatores catabólicos [47].

#### **1.5.7. Manifestações clínicas da osteoartrose**

Em relação à osteoartrose (OA), sabe-se que a maioria da população acima de 50 anos é afetada por esta [48]. Os sintomas variam muito de pessoa para pessoa [49]. Os sintomas mais comuns são dores articulares, rigidez nas articulações e inchaço, mas a queixa principal dos pacientes é a dor [48,50]. A origem da dor na OA ainda não é totalmente compreendida. Também é comum restrição locomotora [48]. A OA normalmente envolve as articulações da mão (as articulações interfalângicas distais, articulações interfalângicas proximais e articulações basais do polegar), bem como as articulações da coluna cervical e lombar, quadril e joelho (Figura 11) [44].



*Figura 11* - Anormalidades ósseas periarticulares características na OA. a | Radiografia da mão mostrando Revisões da Natureza características | Iniciadores de Doenças estreitamento do espaço articular (seta). b | Radiografia do joelho mostrando estreitamento do espaço articular (seta branca) e condrocalcinose (seta preta), que é uma doença reumática associada ao acúmulo de cristais de pirofosfato de cálcio desidratado nos tecidos moles, frequentemente associada à osteoartrose (OA). c | RM do joelho mostrando todas as características da OA, incluindo derrame da bolsa suprapatelar e inflamação da almofada de gordura infrapatelar (a almofada de Hoffa). As lesões da medula óssea são regiões de maior intensidade de sinal no osso subcondral. Imagem adaptada de (43).

### 1.5.8. Diagnóstico da osteoartrose:

O diagnóstico de osteoartrose deve ser baseado na distribuição articular, nos achados clínicos, na análise do fluido articular e nas alterações radiográficas [51].

Depende do exame clínico, radiografias planas e do diagnóstico laboratorial, este último para descartar outros tipos de artrite [51].

Algumas características clínicas da osteoartrose são o facto de apesar desta doença poder atingir todas as articulações, as manifestações mais comuns são na articulação do joelho e da anca [51]. Os 3 principais sintomas são dor, rigidez e imobilidade da articulação [51].

O sintoma mais comum da osteoartrose é a dor nas articulações. A dor tende a piorar com a atividade, principalmente após um período de repouso, é o chamado fenómeno de gelificação [52]. A dor pode ser devida à pressão venosa no osso subcondral, microfraturas trabeculares, elevação do perióstio por osteófitos, distensão da cápsula da articulação e sinovite [51].

A osteoartrose pode causar rigidez matinal, mas geralmente dura menos de 30 minutos, ao contrário da artrite reumatoide, que causa rigidez por 45 minutos ou mais. As articulações mais comumente afetadas são as mãos, joelhos, quadris e coluna, mas quase qualquer articulação pode estar envolvida. A osteoartrose é frequentemente assimétrica. Um paciente pode ter osteoartrose grave e debilitante de um joelho com função quase normal da perna oposta. O exame físico é importante para o diagnóstico. Dor na amplitude de movimento e limitação da amplitude de movimento são comuns a todas as formas de

osteoartrose, mas cada articulação tem achados únicos no exame físico. A figura 12 mostra as mudanças típicas na mão de um paciente com osteoartrose (Figura 12) [52].

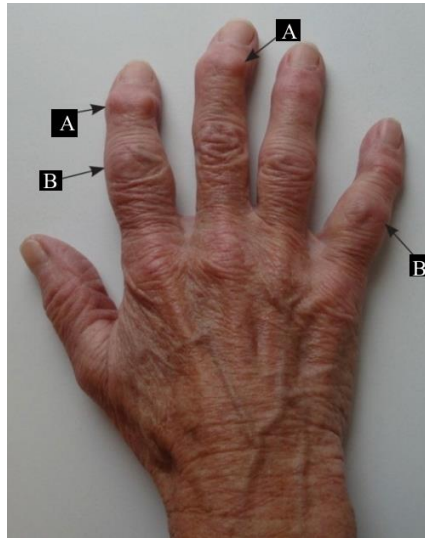


Figura 12 - setas A representam os nódulos de Heberden e setas B representam nódulos de Bouchard. Imagem adaptada de (51).

### 1.5.9. Terapia farmacológica da osteoartrose

As terapias podem ser consideradas como “medicamentos que modificam os sintomas da OA” (SMOADs) ou como “medicamentos que modificam a própria doença da OA” (DMOADs). Os agentes atualmente disponíveis se enquadram na categoria de SMOADs [53]. Os medicamentos tradicionais podem ser categorizados em paracetamol, anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), analgésicos opióides, inibidores da recaptação de serotonina-noradrenalina (ISRSNs), injeções intra-articulares (IA) de corticosteróides e suplementos dietéticos. Esses medicamentos estão bem documentados na literatura e são comumente usados no manejo clínico atual da OA. Embora existam diretrizes geralmente aceites para esses medicamentos tradicionais, eles precisam ser usados com cautela devido às crescentes preocupações com os efeitos adversos [54]. Os medicamentos analgésicos, particularmente paracetamol e capsaicina, têm eficácia comprovada na OA e são terapias de primeira linha recomendadas. Os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) parecem fornecer benefício sintomático extra para alguns pacientes, mas têm maior toxicidade. Os AINEs de nova geração podem ter vantagens de segurança que ainda não foram confirmadas na prática [53].

Devido à limitação dos medicamentos tradicionais para tratar a OA, a busca contínua por medicamentos mais eficazes com efeitos de tratamento satisfatórios, que aliviam a dor, os sintomas e restauram a estrutura normal das articulações, e efeitos colaterais mínimos ainda é necessária. Alguns medicamentos emergentes que modificam doenças mostraram promessas na modificação da progressão da OA, regulando o anabolismo/catabolismo da cartilagem, a remodelação óssea subcondral ou a inflamação sinovial. Estes incluem fatores de crescimento, citocinas, anticorpos monoclonais e inibidores, que ajudam a reduzir a inflamação, promovem a condrogênese e inibem a osteogênese e a degradação da matriz [54]. Entre os quais incluem:

- Proteína morfogenética óssea 7 (BMP-7)
- Fator de crescimento de fibroblastos 18 (FGF-18)
- Albumina sérica humana (HSA)
- Anticorpo do fator de crescimento  *$\beta$ -nerve* ( $\beta$ -NGF)
- Inibidor da interleucina-1 (IL-1)
- Fosfoglicoproteína da matriz extracelular
- Hormona da paratiróide (PTH)
- Inibidor TGF- $\beta$
- Agonista inverso do recetor órfão relacionado ao ácido retinoico  $\alpha$  (ROR  $\alpha$ )

O mecanismo de ação dos medicamentos tradicionais é o seguinte:

- Paracetamol – atua por meio da inibição da síntese de prostaglandinas (PG) ou por um metabolito ativo influenciando os recetores canabinóides [55]. O paracetamol diferencia-se dos AINEs por não apresentar efeitos anti-inflamatórios nem anticoagulantes [56].
- AINES – Os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) são os inibidores competitivos da cicloxigenase (COX), a enzima que medeia a bioconversão do ácido araquidónico em prostaglandinas inflamatórias (PGs) [57]. A COX1 é constitutiva, isto é, está sempre presente no corpo, enquanto a COX 2 é induzida na resposta inflamatória [58]. Os AINEs atuam por inibição da cicloxigenase 2 (COX-2), tromboxanos, prostaglandinas e prostaciclina. A COX-1 é o principal

mediador para garantir a integridade da mucosa gástrica e a COX-2 está envolvida principalmente na inflamação, os AINEs seletivos da COX-2 devem proporcionar alívio anti-inflamatório sem comprometer a mucosa gástrica [59].

- Analgésicos opióides – envolve a interação de 3 classes de recetores (um, kappa e delta) a nível do SNC de modo a provocar alívio de dores moderadas intensas. A morfina é o fármaco protótipo deste grupo (96).
- ISRSN – usados em conjunto com outros medicamentos para reduzir a dor. Por exemplo, o tramadol como agonista opióide misto com mecanismo de ação SNRI combinado tem uma variedade de aplicações no espaço perioperatório, intraoperatório e pós-operatório [60].
- Corticoesteróides – têm ação anti-inflamatória, inibindo a produção de células B e T [61].

## 1.6. Estrutura do gene que codifica ZFP36L1

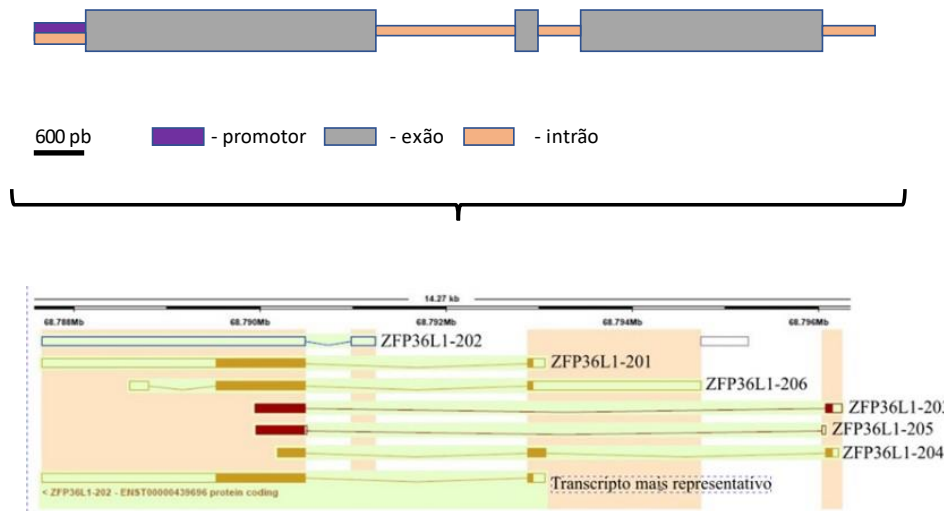


Figura 13 - Estrutura do gene ZFP36L1 humano. Diagrama dos transcritos de ZFP36L1. Imagem adaptada a partir de diagrama gerado pelo Ensembl [62].

O gene *ZFP36L1* tem 3 exões e 4 intrões. Este gene é um membro da família ZFP36 de genes de resposta inicial (Figura 13). Os membros da família são induzidos por vários agonistas, tais como o éster de forbol TPA e o polipeptídeo mitógeno EGF. O gene é bem conservado em todas as espécies e tem um promotor que contém motivos vistos em outros genes de resposta inicial. A proteína codificada contém um domínio de dedo de zinco putativo distinto com um motivo cys-his de repetição [63].

## 1.7. Estrutura e função da proteína ZFP36L1 – família das proteínas TIS

As proteínas dedo de zinco (ZFPs) são as proteínas mais abundantes em genes eucarióticos e o maior fator de transcrição família no genoma humano [64]. De acordo com sua estrutura e função, as proteínas dos dedos de zinco podem atualmente ser divididas em 14 famílias [64]. A proteína dedo de zinco do tipo CCCH é um membro de uma destas famílias, que contém três resíduos de cisteína e um de histidina [64].

As proteínas de dedo de zinco do tipo CCCH são identificadas como proteínas de ligação de RNA, ao contrário de outras famílias de ZFPs que são definidas como proteínas de ligação de DNA ou proteínas [64]. Membros da família tristetraprolina (TTP/TIS11)

são importantes proteínas de ligação ao RNA caracterizadas inicialmente como mediadoras da degradação do mRNA [65]. Elas agem por meio de sua interação com elementos ricos em AU presentes na região 3'UTR de transcritos regulados. ZFP36 coordena e regula as etapas de processamento e destino do mRNA (que inclui transcrição, *splicing*, poliadenilação, tradução e degradação) [65].

A família de proteínas ZFP36 pertence às proteínas dedo de zinco do tipo CCCH e tem quatro membros (30):

- ZFP36 (também chamada de tristetraprolina, TIS11, TTP, NUP475 ou GOS24),
- ZFP36L1 (também chamada de TIS11b, Berg36, ERF1 ou BRF1)
- ZFP36L2 (também chamado TIS11d, ERF2 ou BRF2)
- ZFP36L3

ZFP36L3 não está presente em humanos [64]. Todas as três proteínas humanas (ZFP36, ZFP36L1 e ZFP36L2) possuem dois domínios TZF altamente conservados:

Esses dois domínios incluem:

- o domínio CCCH TZF, que é necessário para a ligação de alta afinidade a elementos ricos em AU no mRNA;
- e um domínio C-terminal extremo que, no caso das proteínas da família ZFP36, interagem com NOT1, um parceiro de um grande complexo multiproteico que contém dedenilases [66].

A ZFP36L1 é uma proteína de ligação ARE que promove a decadência rápida do mRNA através de mecanismos ainda não totalmente compreendidos [67]. Elementos ricos em UA (AREs) na região não traduzida (UTR) de numerosas transcrições de mamíferos funcionam como elementos de instabilidade que promovem a rápida degradação do mRNA [67], recrutando dedenilases para o mRNA alvo, onde podem remover os resíduos de adenosina da cauda poli(A) [68].

A característica definidora da família de proteínas ZFP36 é o domínio tandem dedo de zinco (TZF), a região de 64 aminoácidos das proteínas que medeia a ligação direta ao mRNA [69]. Este domínio contém dois dedos de zinco semelhantes da classe CCCH, com um espaçamento interno dentro de cada dedo de C-x8-C-x5-C-x3-H, onde x representa vários aminoácidos [69]. O espaçamento intra e entre dedos é limitado nesta definição. Levando em cada dedo está uma sequência altamente conservada com a sequência geral RYTKEL ou uma variante [69]. Um domínio TZF intacto é suficiente e necessário para a ligação de alta afinidade ao RNA de cadeia simples; notavelmente, a

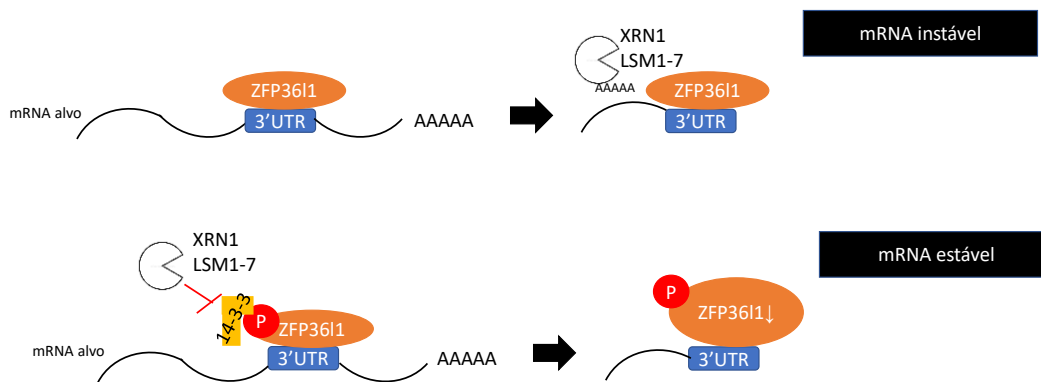
mutação de uma única cisteína ou histidina em qualquer um dos dedos é suficiente para prevenir completamente a ligação do mRNA [70]. Uma estrutura de RMN do domínio TZF do membro da família ZFP36 humano, TIS11D (ZFP36L2), ligado à sua sequência alvo de mRNA preferida, UUAUUUAUU, mostrou que o RNA não estava estruturado no complexo e a associação entre a proteína e o RNA era em grande parte devido a uma combinação de interações de empilhamento entre alguns dos aminoácidos hidrofóbicos e as bases de RNA, bem como interações de ligação de hidrogênio [70].

A lista de proteínas de ligação ao RNA com múltiplas funções continua a aumentar e o recente sequenciamento de alto rendimento dos sítios de ligação para essas proteínas permitiu identificar e caracterizar novas funções. Por exemplo Human antigen R (HuR), que anteriormente era conhecido como um fator estabilizador de mRNA, foi relatado para modular o mRNA [65]. Da mesma forma uma neuron-specific RNA binding protein alvo de anticorpos em doenças manifestadas por inibição motora: o neuro-oncological ventral antigen (NOVA), anteriormente descrito como fator de splicing, pode modular a seleção do local poli(A) e poliadenilação alternativa [65]. À luz dessas observações recentes, pode-se prever que análises posteriores definirão uma gama mais ampla de funções regulatórias para as proteínas ZFP36 na vida de um mRNA do que originalmente previsto [65].

### **1.7.1. Regulação de decaimento de mRNAs pelas proteínas da família ZFP36**

Embora os membros da família ZFP36 sejam estruturalmente semelhantes, eles desempenham papéis diferentes e regulam diferentes mRNAs-alvo, provavelmente devido aos seus padrões de expressão específicos do tipo celular [71]. Por exemplo, o ZFP36 desempenha um papel significativo na regulação de respostas imunológicas e doenças inflamatórias, através da inibição da produção de várias citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$  em macrófagos [71].

Sabe-se que o ZFP36L1 é necessário para a manutenção do compartimento de células da zona marginal B, limitando a expressão dos fatores de transcrição, como o fator 2 (KLF2) e o fator regulatório de interferão 8 (IRF8) [71].



**Figura 14** - Mecanismo de ZFP36L1 em condição normal (mRNA instável) e em condição de osteoporose (mRNA estável). Em condições normais, a expressão do gene da proteína ZFP36L1 está presente em células ósseas, como os osteoblastos, que são responsáveis pela formação óssea. A proteína ZFP36L1 liga-se ao mRNA alvo, reconhecendo uma sequência específica na sua região não traduzida (UTR) (68), a ZFP36L1 recruta proteínas que participam no complexo de degradação do mRNA, incluindo as exonucleases XRN1 (5'-3' Exoribonuclease 1) e LSM1-7 (Sm-Like 1-7). Este complexo de degradação do mRNA remove a cauda poli-A do mRNA, desestabilizando-o e levando à sua degradação (69).

Em condições de doença, a regulação deste complexo (XRN1 e LSM1-7) está alterada, ZFP36L1 não consegue ligar-se a este complexo, ocorre fosforilação e o mRNA está mais estável. (70,71).

ZFP36L1 liga-se aos AREs no 3'UTR, ocorre fosforilação do ZFP36L1 e por fim perde a capacidade de degradar o mRNA. Esquema desenvolvido para este trabalho. Figura adaptada de Wang et al (71).

O mecanismo de ação de ZFP36L1 é um processo com várias etapas envolvendo o seguinte (Figura 14):

- A Família ZFP36 liga-se aos AREs no 3'UTR do seu mRNA alvo através da região conservada do CCH do dedo de zinco e recrutam deadenilases e enzimas para destabilizar os alvos (Figura 14) [72].
- A fosforilação de ZFP36, ZFP36L1 e ZFP36L2 pode modular o nível basal do mRNA de *Mkp-1* para controlar a atividade de p38 MAPK durante a estimulação de lipopolissacarídeos, o que afeta a produção de mediadores inflamatórios [73].

A fosforilação está envolvida na estabilização e inativação de ZFP36L1. ZFP36L1 é fosforilada por múltiplas quinases como ERK, p38 MAPK, JNK e AKT [71]. A MK2 é ativada por p38 MAPK e ZFP36L1 é fosforilada em dois resíduos de serina [71]. A ZFP36L1 fosforilada fica mais estável do que a não fosforilada e ganha afinidade para se ligar com a proteína 14-3-3 (*tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase*

*activation protein theta*), acumulando-se até que a atividade p38 MAPK seja reduzida [71], inibindo a atividade de degradação dos mRNAs pela ZFP36L1.

ZFP36L1 também apresenta mecanismos nucleares [74]. Um estudo demonstrou que ZFP36L1 reprime a tradução diretamente e sugere que faz através de um novo mecanismo distinto de outros reguladores translacionais que interagem com o complexo de deadenilase CCR4-NOT (Repressão de catabólitos de carbono - Negativo em TATA-less) levando à instabilidade do mRNA o que mostra que ZFP36L1 tem funções regulatórias importantes [75].

### **1.7.2. ZFP36 na regulação do ciclo celular**

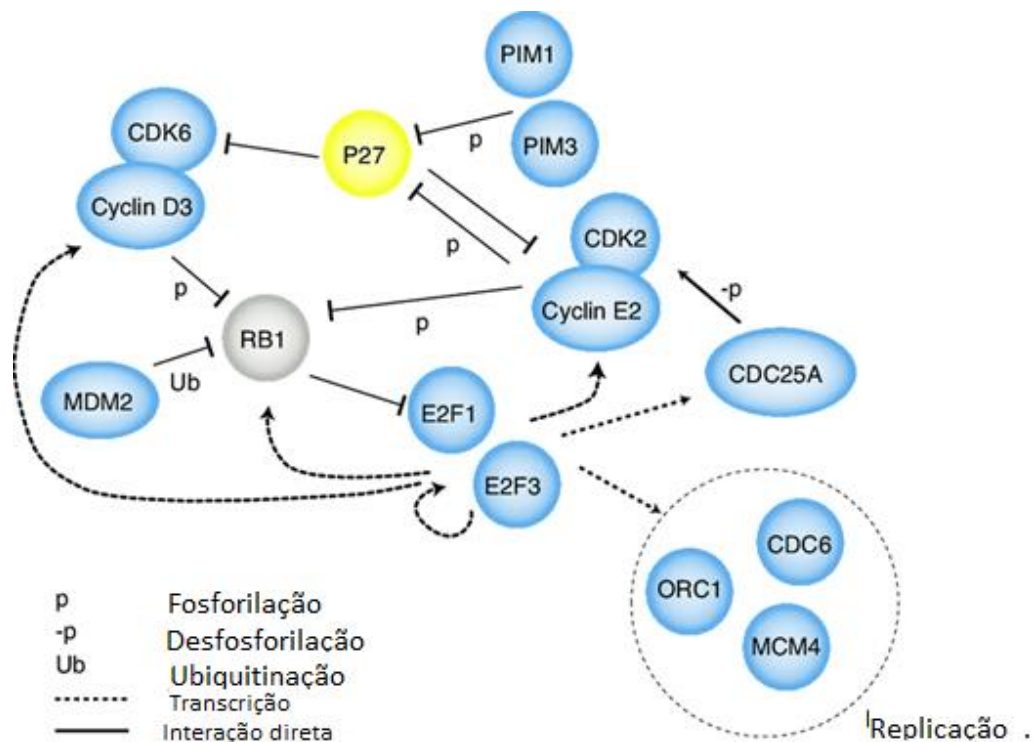
Evidências recentes sugerem que a transcrição e sinalização de vias que regulam processos que coordenam a proliferação dinâmica do desenvolvimento das células B e T são integradas com mecanismos de pós-transcrição mediados por *RNA binding proteins* (RBPs) da família de ZFP36. Dentro desta família de proteínas, a ZFP36L1 liga-se a grupos de mRNAs que codificam proteínas envolvidas na fase de transição G1-S. Estas proteínas ativam a via E2F que leva à progressão do ciclo celular e são reguladas pelo mecanismo de pós transcrição do mRNA como se pode verificar na figura 15 [72].

Os E2F's são reprimidos pelo retinoblastoma (Rb) e esta inibição é alterada quando o Rb é fosforilado pelos CDKs. Uma vez ativados, os E2Fs clássicos conduzem a transcrição da Ciclina E e da fosfatase CDC25A que ativa CDK2, aumentando ainda mais a fosforilação de Rb [72]. A sobreexpressão do regulador de RNA reprimido por ZFP36L1 e ZFP36L2 amplifica a sensibilidade da via E2F, inclinando assim o equilíbrio para a entrada na fase S [72].

ZFP36 e ZFP36L1 são transcricionalmente reprimidos por MYC, que é transcrito após sinalização de IL7R, fornecendo um mecanismo adicional para regulação dessas RBPs durante o desenvolvimento inicial de células [72], levando a sugerir que ZFP36L1 deverá ser regulado de uma maneira dependente do ciclo celular [64].

ZFP36L1 e ZFP36L2 são descritas como mediadoras da quiescência e desempenham um papel fundamental nas malignidades hematopoiéticas [76]. Ambos os genes são classificados principalmente como genes supressores de tumores, pois estes baixam a expressão de oncogenes e contribuem para a quiescência celular [76]. Numa análise mais aprofundada descobriu-se que quando ZFP36L1 ou ZFP36L2 são superexpressos em células T-REx-293, a proliferação celular é drasticamente inibida e o

ciclo celular é preso na fase G1 [64]. Os níveis de proteínas relacionadas ao ciclo celular, incluindo ciclina B, ciclina D, ciclina A, e p21, aparecem diminuída; no entanto, p53 aumentou em células T-REx-293 que superexpressam ZFP36L1 ou ZFP36L2 [64]. Além disso, a mutação dos domínios TZF de ZFP36L1 ou ZFP36L2 parece abolir as suas habilidades inibitórias na proliferação celular e expressão de ciclina D [64].



*Figura 15* - Regulação do ciclo celular por múltiplos alvos de ZFP36L1/L2. Os alvos ZFP36L1/L2 [deduzidos por sequências de elementos ricos em AU (ARE) na 3'UTR ou pela aparência em ZFP36L1 iCLIP] são mostrados. Proteínas em azul tiveram expressão aumentada em linfócitos Zfp36l1 Zfp36l2KO (tanto RNA quanto proteína). P27 em amarelo apresentou diminuição da proteína nos linfócitos Zfp36l1 Zfp36l2KO. RB1 em cinza permaneceu inalterado. As interações entre os alvos ZFP36L1/L2 permitem que eles cooperem para conduzir a progressão para a fase S do ciclo celular. Imagem adaptada de (72).

## 1.8. Formação de grânulos de TIS

O organelo sem membrana composto por grânulos de TIS é caracterizado pela interação de ZFP36L1 (também conhecido como TIS11B) com mRNAs que codificam proteínas membranares [77]. A proteína de ligação ao RNA amplamente expressa ZFP36L1 forma um organelo sem membrana, chamado grânulo TIS, que enriquece mRNAs codificadores de proteínas de membrana com vários elementos ricos em AU [77]. Os grânulos de TIS formam uma malha reticular entrelaçada com o retículo endoplasmático (RE) (Figura 16) [77].

Quando um mRNA possui um 3'UTR mais longo, ele pode ter mais sítios de ligação para proteínas regulatórias e microRNAs, o que pode tornar a sua regulação mais complexa. É importante notar que 3'UTRs mais longos podem conter mais regiões ricas em AU para proteínas regulatórias, incluindo a ZFP36L1. Assim, um 3'UTR mais longo permite ZFP36L1 ser translocado para a superfície do RE para formar mais grânulos de TIS e ZFP36L1 fica também mais estável [77].

A associação entre os grânulos de TIS e o RE cria um compartimento subcelular – o domínio TIGER, um pequeno organelo sem membrana no qual o RNA mensageiro (mRNA) codifica certos tipos de proteínas para encontrar o ambiente apropriado para o crescimento (as letras TIG representam o TIS e ER representam o retículo endoplasmático) – com um ambiente biofísico e bioquimicamente distinto do citoplasma [77]. Este compartimento promove a interação mediada por 3'UTR de SET nuclear proto-oncogene (SET) (responsável por direcionar a proteína CD47 nascente cognata para a membrana plasmática) com proteínas de membrana, permitindo assim o aumento da expressão de superfície e diversidade funcional de proteínas, incluindo *Cluster of Differentiation 47* (CD47) e o ligante de morte 1 programado (PD-L1) [77,78]. Este domínio é um compartimento subcelular que permite a formação de interações proteína-proteína específicas e funcionalmente relevantes que não podem ser estabelecidas fora [77].

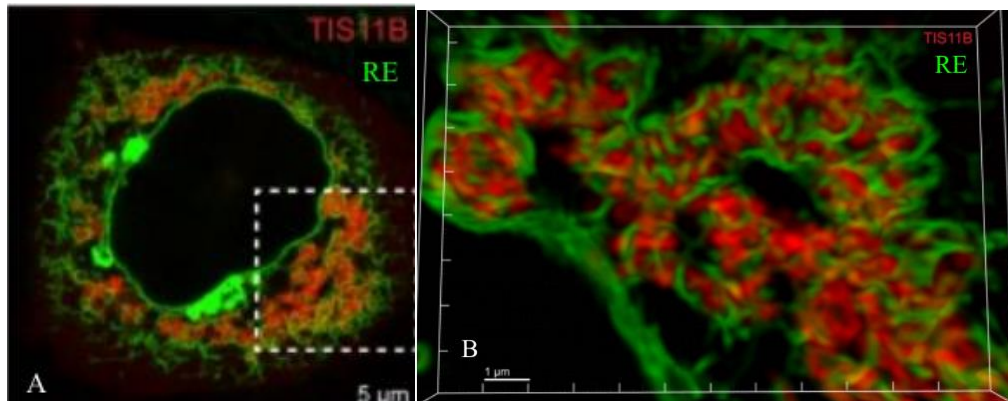


Figura 16 - Imagem confocal de células vivas (Airyscan) de células HeLa após a transfecção de mCherry (mC)-TIS11B e de GFP-SEC61B para visualizar o retículo endoplasmático (RE). Figura B é ampliação da figura A. Zfp361l (TIS11B) representado a vermelho e retículo endoplasmático (RE) representado a verde. Imagens adaptadas de Tseng *et al* (76).

### 1.9. Papel do ZFP36L1 no metabolismo do osso

O papel do *ZFP36L1* na perda de massa óssea poderá estar relacionada com envelhecimento, mas é atualmente essencialmente desconhecido [79]. Foram apresentadas evidências que a expressão de *Zfp361l* em fêmures e ossos de ratos nas células estaminais da medula (bmMSCs) são reguladas negativamente com o envelhecimento [79]. O knockdown de *ZFP36L1* diminui a diferenciação osteoblástica das células MC3T3-E1 e C3H10T1 / 2 e aumenta a diferenciação adipogénica das células 3T3-L1 e C3H10T1 / 2, enquanto a sobreexpressão de *ZFP36L1* fez o oposto [79]. A descoberta de que a sobreexpressão de *ZFP36L1* aumentava a diferenciação osteoblástica e reprimia a adipogénica também foi corroborada por experiências *ex vivo* [79]. A troglitazona evita que *ZFP36L1* iniba a diferenciação adipogénica, sugerindo a importância da repressão PPAR $\gamma$ 2 no efeito inibitório de *ZFP36L1* na diferenciação adipogénica [79].

O pulldown de biotina e os ensaios de mudança de mobilidade eletroforética sugeriram que *ZFP36L1* pode interagir com o mRNA Ppar $\gamma$ 2 endógeno ligando-se ao seu 3'UTR [80]. Os complexos de ribonucleoproteína contendo *ZFP36L1* de células superexpressando *ZFP36L1* continham menos mRNA de Ppar $\gamma$ 2 do que aqueles de células de controle [80]. Através do gene repórter da luciferase, a substituição do fragmento SV40 poly (A) pelo 3'UTR de Ppar $\gamma$ 2 mRNA reduziu a expressão de transcritos de luciferase em células com sobreexpressão de *ZFP36L1* [80]. O exame da

expressão cinética do mRNA de Ppar $\gamma$ 2 após o bloqueio da transcrição mostrou que *ZFP36L1* pode aumentar a degradação dos transcritos. Juntos, esses dados implicam que a sobreexpressão de *ZFP36L1* pode reprimir a adipogênese, pelo menos, regulando para baixo a expressão do PPAR $\gamma$ 2 através de mecanismos pós-transcricionais [80]. Assim, os resultados obtidos apoiam a noção de que a diminuição da expressão de *ZFP36L1* em bmMSCs com o envelhecimento pode contribuir para a perda óssea relacionada ao envelhecimento [80].

*ZFP36L1* pode degradar transcritos de numerosos componentes de fatores de fenótipo secretor associado à senescência (SASP) [81,82].

Segundo um artigo mais recente, focado no papel de *ZFP36L1* na perda óssea relacionada com a idade, descobriu-se que *ZFP36L1* consegue regular a adipogênese, levantando a questão se esta molécula pode também ter um papel importante na obesidade [80]. Eles sobreexpressaram *ZFP36L1* nos bmMSCs derivados de ratos mais velhos e marcaram as células para senescência associada a  $\beta$ -galactosidase. Os resultados demonstraram que a sobreexpressão de *ZFP36L1* diminuiu o número de células marcadas [80]. Adicionalmente em osteoblastos da calvaria de ratinhos, os níveis de mRNA de *ZFP36L1* são regulados positivamente pela PTH e reduzidos em resposta à proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2), ou seja *ZFP36L1* é expresso em células osteoblásticas e regulado por PTH e BMP-2, o que sugere um papel importante para *ZFP36L1* em osteoblastos dentro da rede molecular de remodelação óssea dependente de PTH [83].

### **1.10. Impacto do *ZFP36L1* na cartilagem**

Não existem muitos estudos que descrevam o impacto de *ZFP36L1* no desenvolvimento da osteoartrose, no entanto recentemente foi publicado um estudo em que mostrou que *ZFP36L1*, é especificamente regulado positivamente em condrócitos num contexto de osteoartrose (OA) em humanos e ratinhos [84]. A sobreexpressão mediada por adenovírus de *ZFP36L1* sozinho no tecido da articulação do joelho de ratinho não modula a patogénese da OA. No entanto, a ablação genética ou silenciamento de *Zfp36l1* anula significativamente a OA experimental em ratinhos [84]. O knockdown de *Zfp36l1* aumenta a expressão de mRNA de dois membros da família da proteína de choque térmico 70 (HSP70), que atuam como seus alvos diretos. Além disso, a sobreexpressão de HSPA1A em tecidos articulares protege ratinhos contra a OA

experimental por inibir a apoptose de condrócitos [84]. A proteína de ligação ao RNA, ZFP36L1, regula os membros da família HSP70 que parecem proteger contra a patogénese da OA inibindo a apoptose dos condrócitos [84].

## 1.11.Objetivos

Este projeto tem como objetivo a identificação, compilação e discussão de estudos publicados que descrevem a expressão de *ZFP36L1* em contextos patológicos associados ao desenvolvimento de osteoporose e osteoartrose, focando a discussão dos resultados obtidos no impacto que *ZFP36L1* pode ter no metabolismo do osso e da cartilagem.

Através da pesquisa da base de dados Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/profiles>) e bibliografia associada procura-se compilar e comparar dados relativos à expressão de *ZFP36L1* em experiências usando tecidos de humano, ratinho, ratazana e peixe-zebra. Com base nesses resultados procura-se contextualizar a expressão desta proteína nos mecanismos associados ao desenvolvimento de osteoartrose e osteoporose. Serão igualmente estudadas (i) as relações filogenéticas destes genes nas principais espécies utilizadas como modelos biológicos em ciências biomédicas, e (ii) Análise bioinformática dos domínios conservados e locais de fosforilação, glicosilação e previsão da localização intracelular e (iii) a presença de polimorfismos no gene que codifica para a *ZFP36L1* e possam ser associados a patologias no sistema musculoesquelético e contextualizar os resultados relativamente às funções das proteínas codificadas.

## **CAPÍTULO 2: MÉTODOS**

## CAPÍTULO 2: MÉTODOS

### 2.1. Revisão bibliográfica

A revisão bibliográfica foi obtida através da consulta do site PubMed [85] com a disponibilidade do texto *Full text*, onde foram usadas palavras-chave, tais como, “Osteoporosis” que gerou 8,054 resultados, “osteoarthritis” que gerou 88,764 resultados, “ZFP36L1” que gerou 137 resultados, “bone loss” que gerou 135,760 resultados, “TIS11B” que gerou 38 resultados, “BRF1” que gerou 255 resultados, “Osteoporosis Zfp36l1” que gerou 1 resultado e “Osteoarthritis Zfp36l1” que gerou 3 resultados. No fim foram escolhidos um total de 172 artigos.

A exclusão dos restantes artigos foi feita através da leitura das palavras-chaves de interesse, leitura do *abstract* e escolha final consoante o tema de interesse, ou seja, se o contexto patogénico era osteoporose, osteoartrose e se o tema era diferenciação das células associadas ao osso ou cartilagem.

## 2.2. Árvore filogenética

Para estudar as relações filogenéticas entre as espécies começou-se por coletar sequências de inúmeras espécies:

**Tabela 1** – Lista de espécies estudadas com o seu respetivo código e fonte de onde foi retirado

<i>Homo sapiens</i>	NM_001244698.2	NCBI
<i>Mus musculus</i>	NM_007564.5	NCBI
<i>Ratus norvegicus</i>	NM_017172.2	NCBI
<i>Canis lupus familiaris</i>	XM_038673970.1	NCBI
<i>Felis catus</i>	XM_006932939.5	NCBI
<i>Bois taurus</i>	NM_001101234.1	NCBI
<i>Balaenoptera musculus</i>	XM_036842208.1	NCBI
<i>Danio rerio type-like 1a</i>	NM_001077153.2	NCBI
<i>Delphinapterus leucas</i>	XM_022570285.2	NCBI
<i>Amblyraja radiata</i>	XM_033026656.1	NCBI
<i>Xenopus tropicalis</i>	NM_001079290.1	NCBI
<i>Microcaecilia unicolor</i>	XM_030214165.1	NCBI
<i>Crocodylus porosus</i>	XM_019551793.1	NCBI
<i>Protopterus annectens</i>	XM_044074110.1	NCBI
<i>Anarrhichthys ocellatus</i>	XM_031847590.1	NCBI
<i>Salarias fasciatus</i>	XM_030116720.1	NCBI
<i>Parambassis ranga</i>	XM_028395574.1	NCBI
<i>Macaca fascicularis</i>	XM_045396606.1	NCBI
<i>Xenopus laevis</i>	XM_018231273.2	NCBI
<i>Gracilinanus agilis</i>	XM_044664816.1	NCBI
<i>Dromiciops gliroides</i>	XM_043986181.1	NCBI
<i>Danio rerio type-like 1b</i>	NM_199649.2	NCBI
<i>Phascolarctus cinereus</i>	ENSPCIT00000058329.1	Ensembl
<i>Sarcophilus harrisii</i>	ENSSHAT00000024500.1	Ensembl
<i>Latimeria chalumnae</i>	ENSLACT00000018255.1	Ensembl
<i>Callorhynchus milii</i>	XM_042337882.1	NCBI
<i>Oryzias sinensis</i>	ENSOSIT00000021791.1	Ensembl
<i>Podarcis muralis</i>	ENSPMRT00000005658.1	Ensembl
<i>Anas platyrhynchos</i>	ENSAPLT00000044059.1	Ensembl
<i>Vulpes vulpes</i>	ENSVVUT00000006143.1	Ensembl
<i>Panthera leo</i>	ENSPL0T00000022787.1	Ensembl
<i>Ovis aries rambouillet</i>	ENSOART00020005513.1	Ensembl
<i>Cervus canadensis</i>	XM_043472369.1	NCBI
<i>Tursiops truncatus</i>	_ENSTTRT00000003474.1	Ensembl
<i>Gallus Gallus</i>	NM_001319031.2	NCBI
<i>Phascolarctos cinereus</i>	XM_021004693.1	NCBI
<i>Nothoprocta perdicaria</i>	XM_026038210.1	NCBI
<i>Rhinatrema bivittatum</i>	XM_029598839.1	NCBI

e preparou-se um alinhamento múltiplo de sequências de transcritos de *Zfp361l*, na região traduzida dos transcritos (Open Reading Frame-ORF), reconhecidos por serem as principais isoformas expressas utilizando o software MAFFT (v.7.490) [86] com o algoritmo de alinhamento L-INS-i. O alinhamento foi então submetido ao software jmodeltest2.1.10 [87] para determinar o melhor modelo de nucleótido de substituição para

o alinhamento obtido considerando duas abordagens estatísticas diferentes para a obtenção das árvores filogenéticas, nomeadamente a Inferência Bayesiana (BI) [88] e Maximum likelihood (ML) [89]. Foi possível determinar que o método de substituição de nucleótidos que melhor representa as sequências para aplicação de BI é o modelo de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), aplicando uma distribuição gama e tendo em conta a proporção de invariabilidade dos nucleótidos conservados (I-Proportion of invariable sites). Para o caso da ML, o software jmodeltest2.1.10 previu que a melhor abordagem seria a aplicação do modelo de substituição *Generalized Time Model* (GTR), também aplicando uma distribuição gama e proporção de invariabilidade dos nucleótidos conservados. Para a construção das árvores filogenéticas através de duas abordagens estatísticas independentes. Usou-se o software MrBayes (v. 3.2.7) [90] para obter a melhor árvore filogenética por inferência Bayesiana, tendo a probabilidade posterior de cada ramificação sido obtida após 100.000 gerações. Uma árvore filogenética coincidente foi obtida com método de ML, (Verifica este número 128) com software raxmlGUI 2.0.10 [91] e níveis de confiança de ramificação foi obtido através de 500 repetições aplicando o método bootstrap [92]. Adicionalmente construiu-se uma árvore filogenética através do método neighbor joining method (NJ) [93] usando o software MEGA 11 (version 11.0.13) [94], aplicando também o método bootstrap [92] com o objetivo de clarificar uma incongruência entre os métodos BI e ML numa das ramificações dos mamíferos.

### **2.3. Análise dos domínios presentes na ZFP36L1**

A análise da arquitetura e variação do domínio de proteínas através de diferentes genomas fornecem resultados sobre a evolução da função proteica [95]. O conhecimento dos domínios proteicos é fundamental para a classificação de proteínas, entender as suas funções biológicas, anotar os seus mecanismos evolutivos e design de proteínas [96].

A classificação de proteínas em famílias e domínios é fornecida através de ferramentas e bancos de dados disponíveis publicamente que usam domínios de proteínas conhecidos para prever outros membros em novas sequências de proteínas, os quais incluem NCBI conserved domain database (CDD) [97,98], Interpro [99,100] e EVEREST [101,102].

O alinhamento dos aminoácidos foi feito com base nas espécies usadas para a filogenia através do software MAFFT (v.7.490) [86]. As sequências de proteínas foram obtidas nas bases de dados de sequências do NCBI [103] e Ensembl [62]. Posteriormente o alinhamento múltiplo foi analisado no Bioedit [104], e gerou-se uma tabela de identidade entre as sequências utilizadas para o alinhamento múltiplo.

### **2.4. Análise da localização subcelular**

Inicialmente previu-se a localização subcelular de ZFP36L1 através dos algoritmos Phobius [137] e *Deeploc 2.0* [105,138]. Como resultados foi possível determinar:

- As localizações previstas e os sinais previstos exibem as localizações subcelulares e os sinais de classificação previstos para a proteína de consulta, respectivamente.
- Uma tabela de probabilidade que exhibe a probabilidade atribuída pelo modelo a cada uma das localizações subcelulares.
- Um gráfico semelhante a um logotipo das posições na proteína de consulta com maior importância para a previsão e altamente associada aos sinais de classificação.

Atendendo aos resultados obtidos procurou-se verificar se existia na sequência de aminoácidos evidências de localização no nucléolo através da sua submissão no *site* Nucleolar localization sequence detector (NOD) [105,106]. Como resultados foi gerado um gráfico da pontuação baseada na identificação de domínios na sequência de aminoácidos carregados positivamente e que servem de assinatura para se localizarem no nucléolo. A pontuação mostrada no gráfico NoLS por resíduo representa a pontuação

média de um segmento de 20 resíduos. São considerados domínios significativos apenas quando o valor é superior a 0.8.

## **2.5. Análise da Glicosilação**

Para verificar a N-glicosilação da proteína ZFP36L1 humana utilizou-se o servidor “*NetNGlyc - 1.0 N-linked glycosylation sites in human proteins*” [107,108], tendo-se obtido um gráfico que ilustra os sítios previstos da N-glicosilação em toda a cadeia proteica. Este servidor também permitiu obter os domínios Asn-Xaa-Ser/Thr (incluindo Asn-Pro-Ser/Thr) alvo para a N-glicosilação representados a azul (sendo Xaa qualquer aminoácido) e as asparaginas previstas para serem N-glicosiladas foram mostradas a vermelho. O 'N' representa um local de N-glicosilação previsto. Para além disso é nos dada a probabilidade de N-glicosilação com os símbolos “+” ou “-“, quantos mais símbolos “+”, maior a probabilidade de ser glicosilado [108].

Para avaliar a O-glicosilação utilizou-se o servidor “*NetOGly 3.1 -- O-glycosylation sites prediction tool*” [110,111], através do qual se obteve uma tabela com a probabilidade da proteína ser O-glicosilada com um score de 0 a 1 [111].

## **2.6. Previsão dos locais de fosforilação**

Os locais de previsão de fosforilação podem ser identificados por meio de análises computacionais ou experimentais, como a identificação de motivos de consenso ou a análise da estrutura eletrostática das proteínas. Existem várias bases de dados e ferramentas disponíveis que auxiliam na previsão de sítios de fosforilação, como o NetPhos [112,113] e o PhosphoSitePlus. Neste caso foi utilizado o servidor online NetPhos [112].

## 2.7. Análise de expressão genética – microarrays e *next generation sequencing*

O microarray ou “perfil de expressão global” não só analisa ordens de magnitude de mais genes do que era possível anteriormente, como também tem a vantagem de que os genes examinados não são influenciados pela pré-seleção de genes [114].

A técnica de microarray constitui 5 passos: a colheita da amostra, isolamento de mRNA, preparação de cDNA, hibridização e análise. O cDNA de células da condição controle são tipicamente marcados com fluorescência **verde**, enquanto cDNA de células **da condição alvo** são marcados com **vermelho**. Permitindo assim a identificação de genes presentes apenas em células do controle (verde), células da condição alvo (vermelhas), ambas (amarelas) ou nenhuma (nenhuma). Ao longo de todo o microarray, as taxas de sinal em cada recurso seguem uma distribuição gaussiana e as variações do número de cópias candidatas são identificadas com base no desvio de uma taxa de sonda específica, usando cortes estatísticos [115].

O *Next Generation Sequencing* (NGS) é uma nova tecnologia usada para sequenciamento de DNA e RNA e detecção de variantes/mutações. NGS pode sequenciar centenas e milhares de genes ou genomas inteiros num curto período de tempo. As variantes/mutações de sequência detetadas por NGS têm sido amplamente utilizadas para o diagnóstico de doenças, prognósticos, decisões terapêuticas e acompanhamento dos pacientes. A capacidade de seu sequenciamento paralelo maciço oferece novas oportunidades para a medicina de precisão personalizada [116].

O NGS, em vez de usar hibridização molecular para "capturar" moléculas transcritas de interesse, usa amostras de RNA-Seq transcritas presentes no material de partida por sequenciamento direto. [117].

A principal diferença entre análise de transcriptoma por sequenciamento profundo e análise de microarrays é que a primeira permite analisar a sequência de mRNAs para além da análise da expressão destes mesmos mRNAs. A maior vantagem atual dos microarrays é o seu custo relativamente baixo em comparação com o sequenciamento, outra vantagem é o conhecimento de vieses em dados de matriz e estratégias de análise maduras e desenhos experimentais para lidar com eles. Uma das preocupações mais importantes sobre o sequenciamento de RNA é a profundidade de sequenciamento necessária para efetivamente amostrar o transcriptoma, o que significa que é necessário várias leituras no NGS [117]. No entanto, é de notar que o NGS permite verificar expressões diferenciais

num espectro mais abrangente, examinar variações no DNA (SNPs, inserções, deleções) e até descobrir novos genes ou variações de *splice* alternativo usando apenas um único dataset, quando comparado com a técnica de análise de *microarrays*.

## **2.8. Acesso a dados experimentais e determinação da expressão relativa**

Para identificar como varia a expressão do *ZFP36L1* foi consultado o site do NCBI [103] na base de dados “Gene Expression Omnibus” (GEO) [118], que é um site que apresenta diversos estudos sobre vários temas onde foram encontrados vários estudos e calculada a expressão relativa entre os grupos de cada experiência. As palavras-chaves utilizadas para a pesquisa foram Osteoporosis que gerou 347 estudos, Osteoarthritis que gerou 1825 e chondrocyte differentiation que gerou 737 estudos “osteoclasts”. Deste site foram escolhidos e analisados em detalhe 18 estudos. O critério de inclusão foi o número de contagem de transcritos normalizados e/ou a disponibilidade de analisar a informação através da ferramenta disponível no NCBI GEO2R [119].

Depois de escolher os estudos, foi determinada a expressão relativa de *ZFP36L1* em estudos de osteoporose e osteoartrose e diferenciação celular- De forma a tentar perceber se existia correlação entre a expressão de *ZFP36L1* e transcritos alvo, o *TNF  $\alpha$*  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ) ou *HIF1 $\alpha$*  (*hypoxia inducible factor 1 subunit alfa*) são exemplos disso. Adicionalmente, como *RUNX2* é marcador de comprometimento para a linha osteoblástica, analisou-se a expressão deste fator de transcrição nos estudos de análise da diferenciação dos osteoblastos e *ACP5* (*Acid Phosphatase 5, Tartrate Resistant*) para marcar o nível de diferenciação dos osteoclastos. Como base para a determinação da expressão foram usadas as contagens normalizadas dos transcritos identificados nos estudos. Quando os estudos de interesse não apresentavam o número de transcritos por condição normalizado, foram recolhidos os números de transcritos detetados e utilizando o algoritmo DESeq2 [120]. A normalização foi feita através a utilização do coeficiente de variação, coeficiente Intra classe de correlação e análise cluster. Utilizou-se também o RStudio 4.3.1. [121].

Quando se realizou a análise de estudos com *microarrays*, utilizou-se para normalizar os valores de expressão, o método de RMA (Robust Multi-array Average)

[122]. De acordo com o autor Irizarry et al, para prevenir outliers, utilizou-se um procedimento robusto como a média polaca [123] para estimar os parâmetros dos modelos e utilizou-se também a escala logarítmica da expressão que é definida como Robust Multi-array Average (RMA) [122]. Foi feito através do algoritmo Affy [124] no RStudio versão 4.3.1. [121] que permitiu normalizar os transcritos detetados.

De forma a comparar os níveis de expressão entre os grupos controlo e os grupos modelo para osteoporose ou grupos de pacientes calculou-se o  $\log_2FC$  das contagens normalizadas, ou seja, a expressão relativa transformada com a função logarítmica de base 2.

$$\log_2 FC = \log_2 \frac{\text{Contagens normalizadas dos transcritos de interesse}}{\text{Média das contagens normalizadas dos transcritos de interesse do grupo controlo}}$$

De forma a avaliar a variação do grupo controlo, determinou-se o  $\text{Log}_2FC$  para cada amostra do grupo controlo relativamente à sua média. Os resultados obtidos foram depois utilizados para construção dos gráficos e análise estatística. Para estudos que não tinham disponibilizados o número de contagens normalizadas, mas eram suportados pela ferramenta GEO2R foi extraído dos dados gerados pela ferramenta os valores de  $\text{Log}_2FC$  entre cada dois grupos e respetivo *p value* ajustado.

Outro critério foi também que fosse um estudo onde fosse comparado um grupo controlo com um modelo para a osteoporose ou osteoartrose ou ainda em contextos de diferenciação de osteoblastos ou condrócitos (*in vitro* e *in vivo*, Tabela 2). Critérios de exclusão quando os critérios de inclusão verificados foram o design experimental não ser adequado ou inexistência dos genes alvos definidos no estudo.

Consultou-se 1 estudo relacionado com a avaliação da expressão de *Zfp3611* no contexto de perda e ganha de osso (como estudo introdutório), 2 relacionados com a diferenciação de osteoblastos, 1 de diferenciação de osteoblastos e adipócitos, 4 *in vivo* para a OP, 1 relacionado com diferenciação dos condrócitos e 4 com a patogénese da osteoartrose.

**Tabela 2** - Tabela de estudos escolhidos para análise detalhada

Geo ref- referência do GEO; B.ref.- referência bibliográfica; M/D – M: microarray e N: NGS

<b>Geo ref</b>	<b>Artigo</b>	<b>B. ref.</b>	<b>Ano</b>	<b>M/N</b>
<b>GSE54461</b>	Expressão gênica temporal através da osteoblastogênese. (N=3)	[125]	2014	N
<b>GSE148203</b>	Sequenciamento de próxima geração facilita a análise quantitativa de transcriptomas de mineralização de osteoblastos	--	2020	N
<b>GSE174794</b>	Identificação de genes candidatos compartilhados simultaneamente pela adipogênese e osteoblastogênese a partir de células estaminais mesenquimais humanas (N=1)	[126]	2022	N
<b>GSE214645</b>	Alteração funcional de células estaminais mesenquimais esqueléticas de ratinhos correlacionada com a progressão da osteoporose (N=2)	[127]	2023	N
<b>GSE30081</b>	As dietas de mirtilo apenas durante o desenvolvimento inicial são suficientes para prevenir a senescência dos osteoblastos e a perda óssea na idade adulta (N=3)	[128]	2012	M
<b>GSE35959</b>	Identificação de genes candidatos compartilhados simultaneamente pela adipogênese e osteoblastogênese a partir de células estaminais mesenquimais humanas(N=5; N=5; N=4; N=5)	[129]	2012	M
<b>GSE194301</b>	A Sequenciação de nova geração facilita a análise quantitativa dos transcriptomas de um modelo osteoporótico de peixe-zebra quando sujeito a tratamento com dexametasona (N=3)	[130]	2022	N
<b>GSE154800</b>	Ligação de heparina epidérmica como a ablação de adipócitos da medula mediada por fator de crescimento induz formação óssea profunda (N=4)	--	2020	N
<b>GDS5464</b>	Efeito de deficiência NFATc1 na diferenciação de osteoclastos in vitro (N=2)	[131]	2012	M
<b>GSE138324</b>	Matriz de expressão de macrófagos e osteoclastos derivados da medula óssea de ratinhos (N=1)	[132]	2019	M
<b>GSE176265</b>	Perfil de expressão genética durante a diferenciação de osteoclastos mediada por RANKL(N=3)	--	2021	M
<b>GSE166559</b>	Sequenciamento de RNA de próxima geração de amostras knockdown de LSD1 na diferenciação de osteoclastos humanos (N=2)	[133]	2022	N
<b>GSE54216</b>	Dados de expressão das zonas de cartilagem articular e da placa de crescimento na epífise tibial proximal de ratos com 10 dias de idade (N=4)	[134]	2014	M
<b>GSE176199</b>	As células estromais mesenquimais residentes em tecido senescente são uma fonte interna de inflamação na cartilagem osteoartrítica humana (N=3)	[135]	2021	N
<b>GSE6119</b>	Glucosamina exógena protege globalmente os condrócitos dos efeitos artríticos da IL-1beta (N=4)	[136]	2006	M
<b>GSE173637</b>	A periostina induz a degeneração precoce da cartilagem articular na displasia do desenvolvimento da anca (N=1)	[137]	2022	N
<b>GSE164835</b>	Análise baseada em RNA-Seq de condroblastos submetidos à inibição geral da caspase revelou a modulação de um espectro de genes relacionados à osteoartrose (N=3)	--	2021	N

## **2.9. Análise estatística**

Foi inferida uma análise estatística na ferramenta GraphPad Prism versão 9.4.0. Primeiramente, foi feito para avaliar se os grupos analisados tinham uma distribuição normal. A normalidade foi obtida através dos testes Kolmogorov-Smirnov, Anderson-Darling, D'Agostino-Pearson e Shapiro-Wilk. Para comparação entre grupos foram feitos testes paramétricos (T-test, One-way ANOVA e Two-way ANOVA). Caso a distribuição não seja normal, foram feitos os testes não paramétricos (Mann-Whitney e Kruskal-Wallis). Por último, foram feitos gráficos descrevendo a expressão relativa para os estudos analisados.

No estudo GSE154800 realizou-se um two-way ANOVA test no qual se verificou que não existe efeito sinérgico entre o tempo e os diferentes grupos (ratinhos injetados com DTR e wild type), ou seja, não interferem um no outro. Através do Tukey test observou-se alterações no tempo.

## **CAPÍTULO 3: RESULTADOS**

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

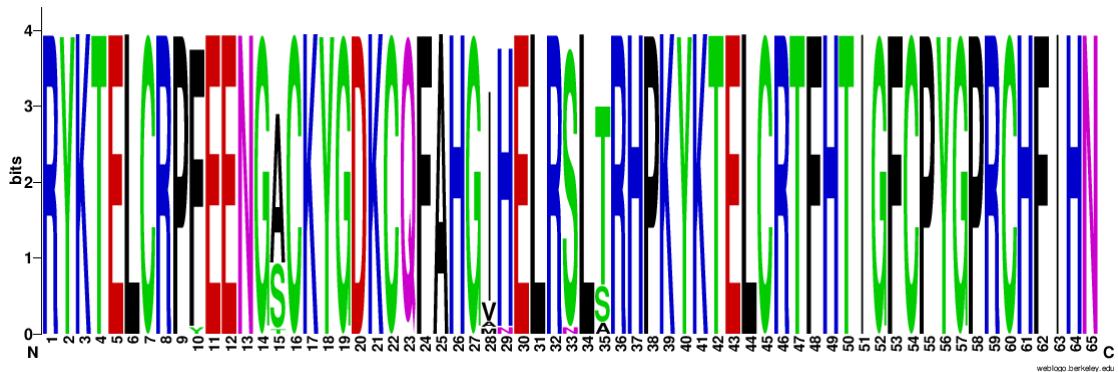
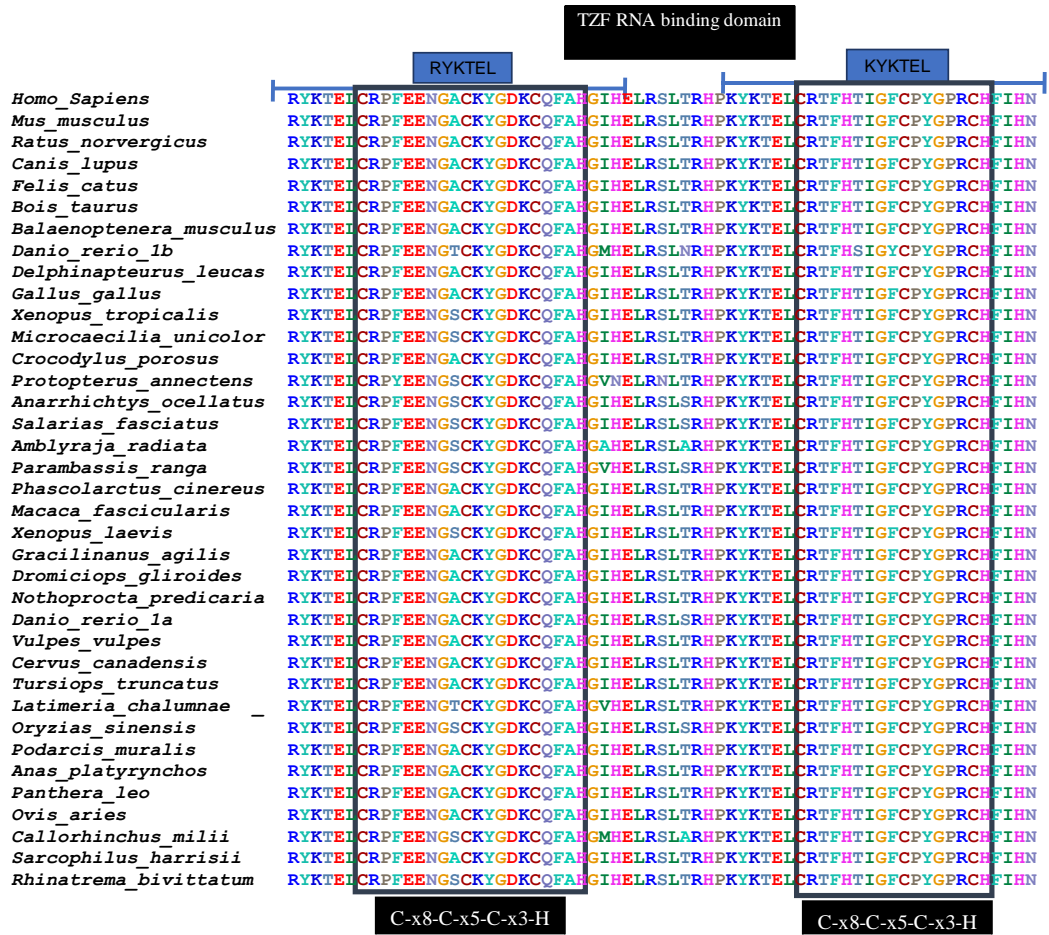
A partir das sequências de nucleótidos dos mRNAs e de aminoácidos de ZFP36L1 de humano fez-se uma série de análises entre as quais, a análise bioinformática dos domínios funcionais de ZFP36L1 conservados através da evolução, a comparação dos valores de identidade das sequências de ZFP36L1 estudadas, identificação da localização subcelular do ZFP36L1, identificação de resíduos com probabilidade para serem glicosilados, análise filogenética, estudo da relação entre doenças ósseas e *ZFP36L1* e análise da expressão de *ZFP36L1* em múltiplos contextos.

### 3.1. Análise bioinformática dos domínios funcionais de ZFP36L1 conservados através da evolução

#### 3.1.1. Domínios envolvidos na afinidade com os mRNAs

Em geral, as proteínas codificadas contêm 2 domínios críticos de interação macromolecular com as regiões 3'-UTR dos mRNAs alvo altamente conservados relativamente à composição dos aminoácidos. Este domínio CCCH TZF é necessário para a ligação de alta afinidade a elementos ricos em AU no mRNA (Figura 13) [138].

O domínio tandem de zinco (TZF) (Figura 17) é uma região com 64 aminoácidos com dois dedos de zinco semelhantes da classe CCCH, com um espaçamento interno dentro de cada dedo de C-x8-C-x5-C-x3-H, onde x representa vários aminoácidos. O espaçamento intra e entre dedos é limitado nesta definição. Levando em cada dedo está uma sequência altamente conservada com a sequência geral RYTKEL ou uma variante KYKTEL. A posição do 10º aminoácido da sequência deste domínio apresenta uma homologia de 97,29%, o 15º aminoácido apresenta uma homologia de 64,86%, o 28º tem uma homologia de 83,78%, o 29º e 33º aminoácidos apresentam uma homologia de 97,29% e o 35º aminoácido apresenta uma homologia de 83,78% (Figura 17). As cisteínas e histidinas no domínio TZF são as que estabelecem a ligação de Zn e na presença de Zn a estrutura apresenta-se dobrada. Quando qualquer uma das cisteínas ou histidinas é mutada, as proteínas perdem completamente a ligação ao RNA (figura 17).



Posição 10: 97,29%  
 Posição 15: 64,86%  
 Posição 28: 83,78%  
 Posição 29: 97,29%  
 Posição 33: 97,29%  
 Posição 35: 83,78%

Figura 17 - Domínios tandem zinc finger (TZF) das sequências de proteínas ZFP36L1 em várias espécies. O domínio TZF é uma sequência de 64 aminoácidos com muitos resíduos conservados que é responsável pela ligação direta do RNA.

Adicionalmente o domínio na extremidade C-terminal é alvo de afinidade com NOT1, sendo que esta proteína faz parte da plataforma de um grande complexo multiproteico que contém dedenilases onde podem remover os resíduos de adenosina da

cauda poli(A) [139]. ZFP36L1 também se observou elevado grau de conservação dos aminoácidos em todas as espécies (Figura 18), com uma homologia de 97,29% nas posições 6, 7 e 9 e 91,99% na posição 11 dos aminoácidos das sequências deste domínio.

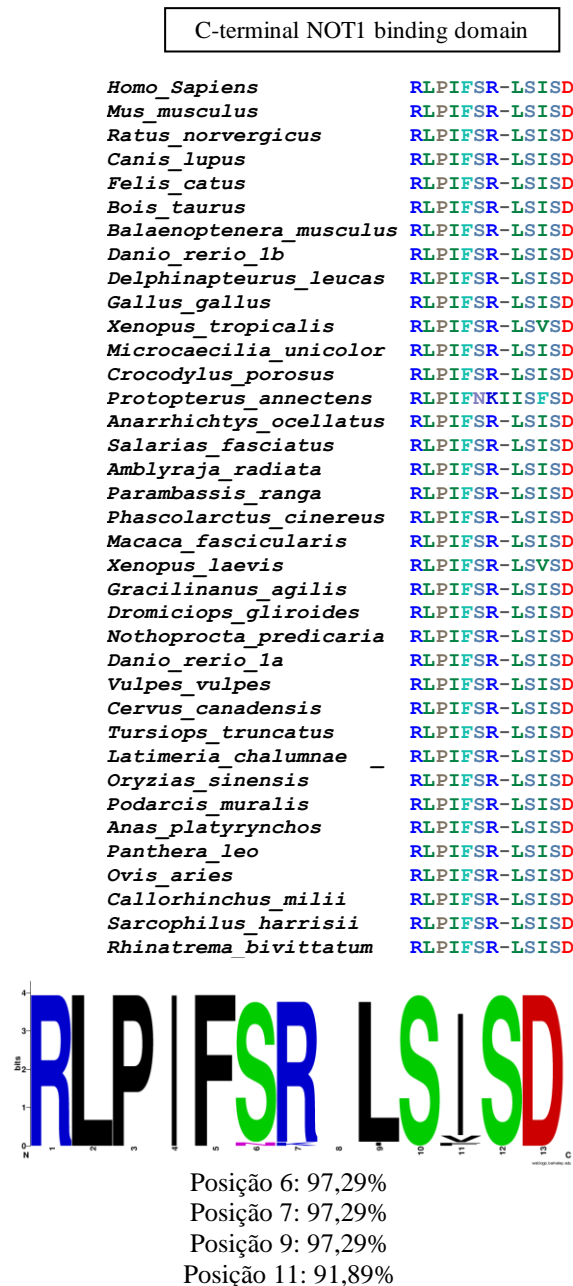


Figura 18- Comparação dos domínios de ligação a NOT1 das proteínas ZFP36L1 de várias espécies. O domínio NOT1 consiste em uma série de estruturas helicoidais que servem como locais de ancoragem para outros complexos como o CCR4-NOT

### 3.2. Comparação dos valores de identidade das sequências de aminoácidos de ZFP36L1

Os resultados obtidos descritos na tabela de identidade para as sequências completas alinhadas revelaram que apresentam maior grau de identidade para as espécies dentro da mesma classe (mamíferos, répteis, etc) (Tabela 3). Através da análise da tabela de identidades observou-se que para a *Homo sapiens* a identidade máxima foi de 99,4% com a *Balaenoptera* (um mamífero marinho). A classe com a qual apresenta uma maior afinidade logo a seguir a esta, são as espécies *Felis catus* (99,1%) e *Ovis aries* (99,1%), seguindo-se os marsupiais como o *Gracilinaus agilis* (94,6%) e o *Dromiciops Gliroides* (94,6%), os répteis como o *Crocodylus porosus* (86,2%) e as aves como a *Nothoprocta\_pedicaria* (86,2%) (Tabela 3). *Homo sapiens* apresenta menor grau de identidade com os anfíbios como os *Xenopus* (73,2% e 72,8%), os invertebrados como a *Microcaecilia unicolor* (73,3%) e os peixes, nomeadamente o peixe ósseo *Oryzias Sinensis* (55,2%), o peixe pulmonado africano *Protopterus annectens* (51,8%) e o *Danio rerio 1a* e *Danio rerio 1b* têm uma identidade de 64,8% (Tabela 3).



### 3.3. Análise filogenética

Relativamente à árvore filogenética, o *outgroup* utilizado foi o grupo dos animais invertebrados. A escala usada foi de 0,2. As unidades de comprimento do ramo representam a percentagem de alterações por cada 100 nucleótidos (quando não tem percentagem, são as substituições de nucleotídeos por local – ou seja, o número de alterações ou 'substituições' divididas pelo comprimento da sequência) e os círculos representam os nós ancestrais putativos, ou seja, cada nó representa um ancestral comum (Figura 19). O outgroup foi definido por ser filogeneticamente o grupo de espécies mais distante das sequências recolhidas (*Microcaecilia unicolor* e *Rhinatrema bivittatum*) (Figura 19).

As sequências analisadas agruparam-se de acordo com relações filogenéticas mais próximas, sendo possível observar que a sequência do *Homo sapiens* agrupa-se no grupo dos símios e dentro de uma ramificação bem maior que inclui *ZFP36L1* de mamíferos os mamíferos, tendo este grupo uma semelhança de 100% pelos dois métodos estudados de *neighborjoining* e *Maximum Likelihood* e probabilidade 1 para a inferência bayesiana. A árvore foi dividida em diferentes grupos: vertebrados terrestres, vertebrados marinhos e invertebrados. Os vertebrados marinhos foram divididos em três grandes grupos: celacantos, peixes ósseos e peixes cartilagíneos. É de notar que os anfíbios, assim como o peixe pulmonado não agrupam com os vertebrados terrestres. *ZFP36L1* dos mamíferos divergiu mais próximo dos peixes do que dos anfíbios. Houve também uma divisão entre mamíferos placentários e não placentários. Dentro do danio rerio, o 1a é ortólogo, ou seja, está mais próximo de outros grupos e o 1b é parólogo (divergiu dos outros grupos). Esta árvore respeita as relações filogenéticas evolutivas entre grupos.

Árvore filogenética do cDNA dos  
vertebrados de  
Zfp3611

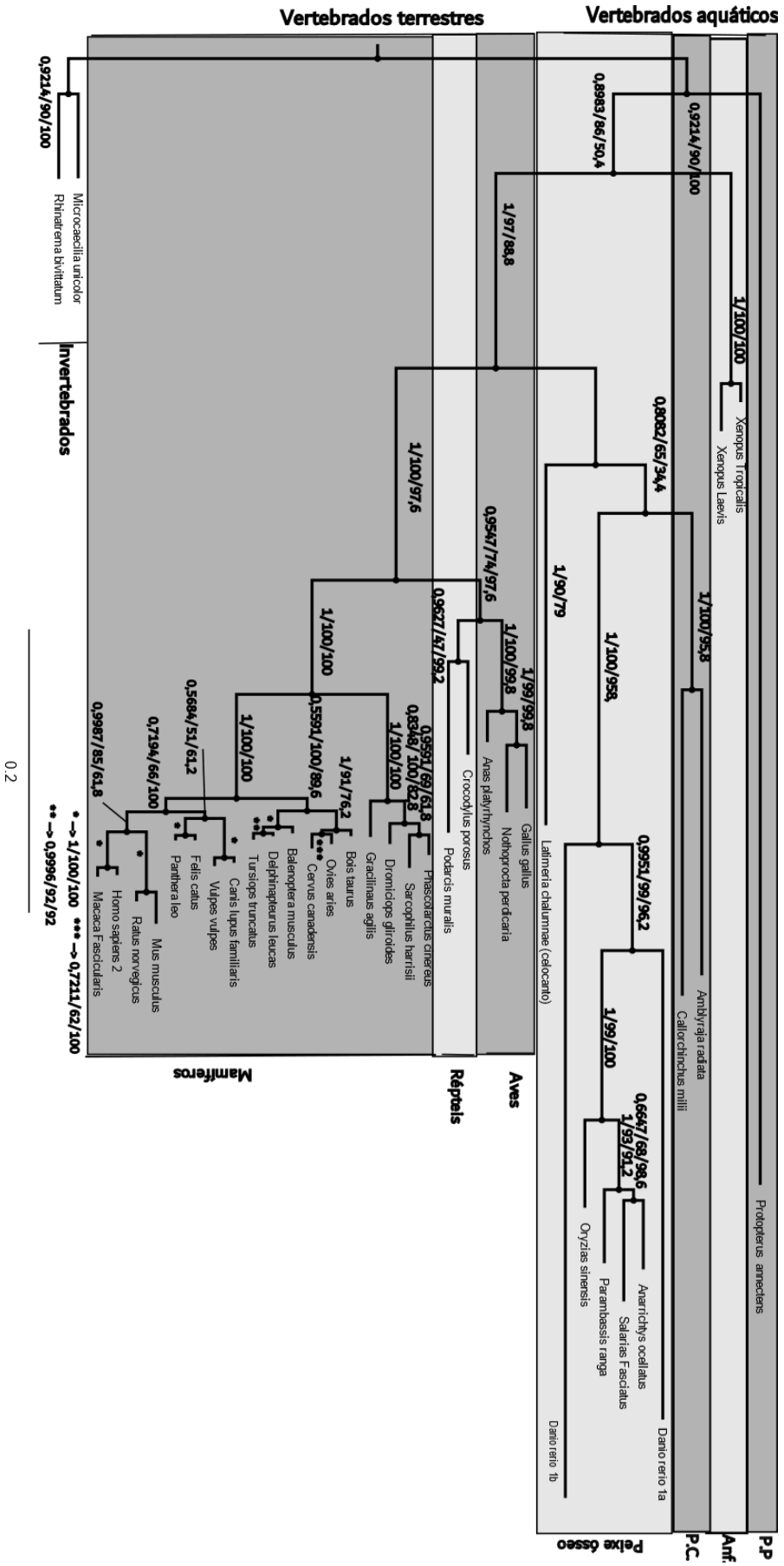


Figura 19 – Árvore filogenética relativa ao gene ZFP36L1. PP - Peixes pulmonares; Anf - anfíbios; P.C. - Peixes cartilagíneos. O primeiro valor foi obtido pelo método de inferência bayesiana, o segundo valor por neighbor joining e o terceiro valor por maximum likelihood

### 3.4. Localização subcelular do ZFP36L1

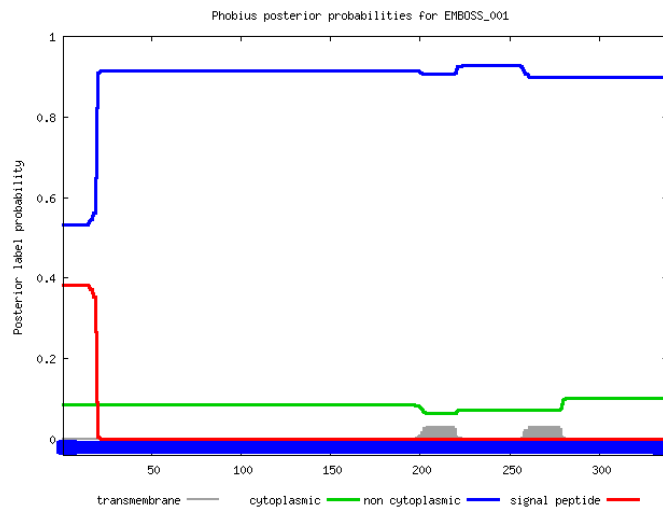


Figura 20 - Previsão da localização subcelular e presença de péptidos sinal na sequência de aminoácidos de ZFP36L1 de homo sapiens através do *Phobius* [140]

O algoritmo *Phobius* indicou que não existe uma sequência de aminoácidos com probabilidade para ser péptido sinal para o retículo endoplasmático (Figura 20)

Depois, através do servidor *Deeploc 2.0* [141,142], previu-se que a localização subcelular da proteína ZFP36L1 humana deverá ser no núcleo e citoplasma, não apresentando domínios transmembranares de acordo com os scores de probabilidade gerados pelo algoritmo (tabela 4).

**Tabela 4** – Predição da probabilidade de localização da proteína ZFP36L1 através do algoritmo *Deeploc 2.0* [141,142]

Localization	Cytoplasm	Nucleus	Extracellular	Cell membrane	Mitochondrion	Plastid	Endoplasmic reticulum	Lysosome/Vacuole	Golgi apparatus	Peroxisome
Probability	0.6560	0.6533	0.0291	0.2206	0.1527	0.0022	0.0974	0.1189	0.0670	0.0279

Os resultados gerados por *Deeploc 2.0* [141,142] identificaram o domínio responsável pela translocação para o núcleo, “LDNSRRLPIFFSRLSISDD”, estando localizado entre os resíduos 320° e 338° (Figura 17).

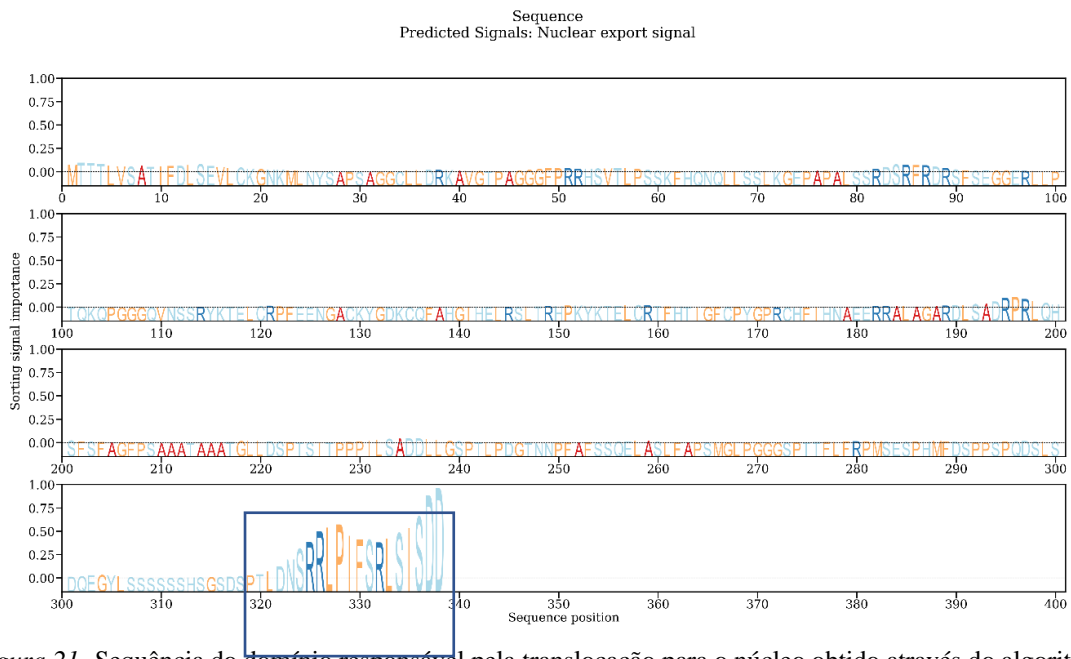


Figura 21- Sequência do domínio responsável pela translocação para o núcleo obtido através do algoritmo Deeploc 2.0 [105,137]

O domínio de translocação nuclear “LDNSRRLPIFFSRLSISDD” (Figura 21) coincide com o domínio de afinidade para NOT (Figura 17).

### 3.5. Análise de domínio de localização nucleolar

Através do *Nucleolar localization sequence detector* (NOD) foi possível verificar que ZFP36L1 não deverá localizar-se na região do nucléolo segundo o algoritmo (Figura 18).

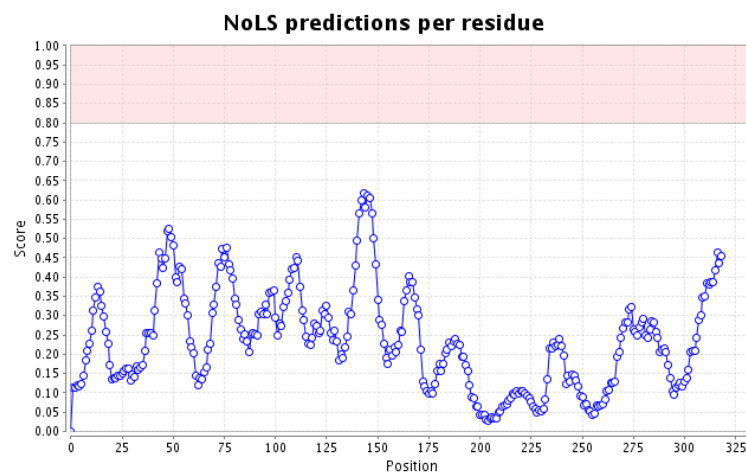


Figura 22 - Gráfico relativo ao score da predição de NoLS por resíduo em cada posição diferente da sequência de ZFP36L1. Este gráfico permite prever se a proteína está presente no nucléolo e em caso afirmativo, seria quando os pontos azuis passam a região a rosa (0,80). Obtido através do algoritmo NOD (R, 108).

### 3.6. Locais de previsão de fosforilação

Em relação às previsões dos locais de fosforilação, a fosforilação é uma modificação pós-traducional importante que ocorre em proteínas, e as previsões dos locais de fosforilação são realizadas para identificar os resíduos de aminoácidos que são suscetíveis de serem fosforilados por cinases [113].

Quanto à relação entre treonina, tirosina e serina nos locais de previsão de fosforilação, esses três aminoácidos são frequentemente alvos de fosforilação devido às suas propriedades bioquímicas. A serina, treonina e tirosina possuem grupos hidroxilo nas suas cadeias laterais, o que permite a ligação do grupo fosfato.

#### ZFP36L1 humana:

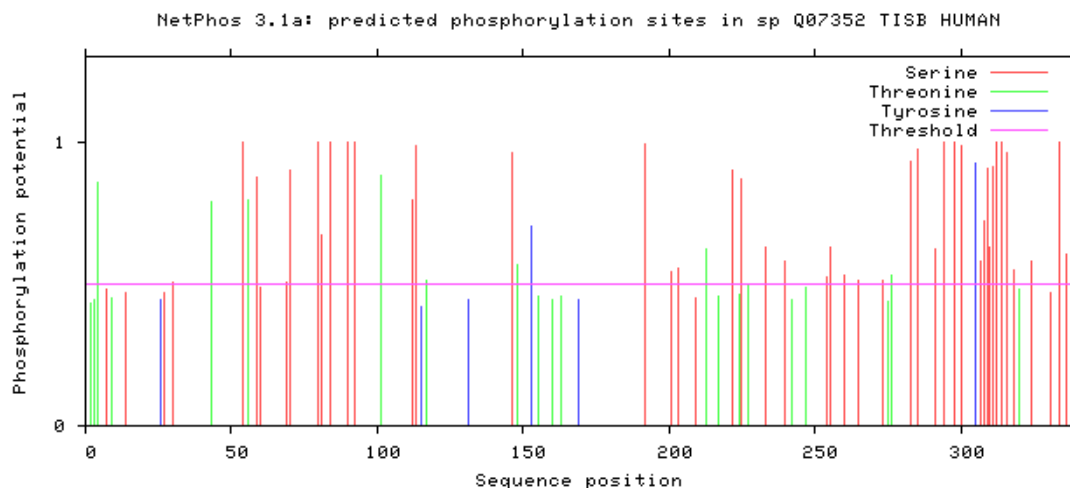


Figura 23- Gráfico com locais de previsão de fosforilação da proteína ZFP36L1 humana.

A análise à sequência de aminoácidos para a proteína ZFP36L1 humana revelou 97 locais de fosforilação putativos, sendo 70 destes locais com um score maior que 0,5 e 27 com um score maior que 0,8 (quanto mais próximo o score for de 1, maior a probabilidade de ser fosforilado) (Figura 23). É de notar que a Serina 318 está presente nesta tabela, assim como a serina 334, já descritos como locais de fosforilação *in vitro* da ZFP36L1 (Figura 20 e Tabela 1 dos Anexos), A partir da região 300 há 13 locais de fosforilação significativos. A região 324S tem grande probabilidade de ser fosforilada, com o contexto TLDNSRRLP, na qual a cinase Cdc2 se liga a esta (Tabela 3 dos Anexos)

### **3.7. Identificação de resíduos com probabilidade para serem**

#### **Glicolisados**

##### **Introdução sobre relevância da glicosilação**

A N-glicosilação funciona através da adição de hidratos de carbono ao nitrogénio das cadeias laterais de asparagina e/ou arginina. A N-glicosilação é importante na resposta imune celular em relação à interação entre células apresentadoras de antígenos e os linfócitos T. Além disso afeta uma variedade das suas atividades biológicas, incluindo uma contribuição decisiva para a manutenção de estruturas secundárias e terciárias das proteínas, tráfego para a superfície celular, orientação da membrana, estabilidade proteica (por exemplo, resistência à protease e semi-vida), ligação do ligante e transporte de moléculas MHC I [108,143].

Já a O-glicosilação funciona através da adição de hidratos de carbono ao radical hidroxila das cadeias laterais de serina, treonina, tirosina, hidroxilisina ou hidroxiprolina. Esta tem impacto no transporte direcionado de glicoproteínas, conformação proteica, resistência à proteólise, na comunicação celular, estando deste modo também envolvida na imunidade inata e por isso apresenta papéis cruciais na infeção humana por patógenos virais ou bacterianos, e na progressão do cancro [144,145]

##### **N-glicosilação**

Para verificar se existiam resíduos com probabilidade para serem N-glicolisados utilizou-se o servidor “*NetNGlyc - 1.0 N-linked glycosylation sites in human proteins*” (U, 109) tendo-se obtido um gráfico que ilustra os sítios previstos da N-glicosilação em toda a cadeia proteica (o eixo x representa o comprimento da proteína de N- para C-terminal). As linhas verticais que cruzam o limiar horizontal em 0,5 são previstas glicosiladas (Figura 24)

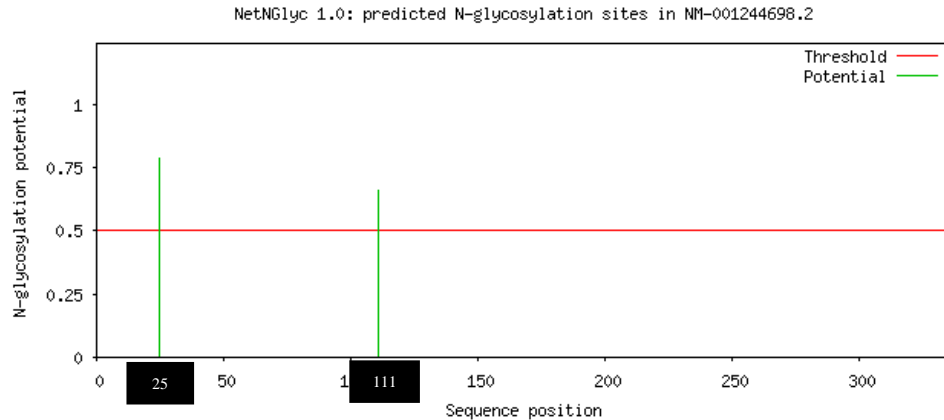


Figura 24 - Gráfico que prevê os locais onde ocorrem a N-glicosilação da proteína ZFP36L1. As linhas verticais que cruzam o limiar horizontal em 0,5 são previstas glicosiladas. Gráfico obtido pelo algoritmo NetNGlyc (U, 109).

Os resíduos de glicosilação identificados para a proteína ZFP36L1 humana são nas posições 25<sup>a</sup> e 111<sup>a</sup> da sequência de aminoácidos, (tabela 5). Na posição 25 no “NYS” o N representa a asparagina prevista para ser N-glicosilada; enquanto o YS representa a sequência Asn-Xaa-Ser/Thr, sendo este um local de N-glicosilação previsto. Na posição 111 no “NSS” o N representa a asparagina prevista para ser N-glicosilada; enquanto o SS representa a sequência Asn-Xaa-Ser/Thr, sendo este um local de N-glicosilação previsto (Tabela 5).

Tabela 5 – Tabela ilustrativa das posições e significância da previsão da N-glicosilação de ZFP36L1 (Threshold=0.5)

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
NM_001244698.2	25	NYSA 0.7836	(9/9)	+++
NM_001244698.2	111	NSSR 0.6592	(9/9)	++

## O-Glicosilação

Para avaliar se existem resíduos com probabilidade serem O-glicosilados utilizou-se o servidor “NetOGly 3.1 -- O-glycosylation sites prediction tool” (U, 109), através do qual se obteve uma tabela com a probabilidade para cada resíduo com um score entre 0 a 1, estando representado a vermelho todos os que têm probabilidade superior a 80% e a amarelo os que têm probabilidade entre 50% e 80%. Este servidor permite encontrar e prever a presença de sítios de glicosilação de O-GalNAc (do tipo mucina) em proteínas

de mamíferos (Tabela 4 dos Anexos). Foram identificados 18 sítios de glicosilação com score maior que 0,8 e 29 sítios glicosilados com score entre 0,5 e 0,8 (Tabela 6).

**Tabela 6-** Tabela dos scores de probabilidade da proteína ZFP36L1 ser O-glicosilada. Foi considerado significativo scores acima de 0,8.

#seqna	source	feature	start	end	score	strand	frame	comme
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			4	4	0.519202	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			43	43	0.568377	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			54	54	0.768839	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			56	56	0.912508	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			59	59	0.828011	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			60	60	0.704993	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			70	70	0.800614	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			80	80	0.907508	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			81	81	0.81492	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			84	84	0.785642	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			90	90	0.816849	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			92	92	0.920524	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			101	101	0.922637	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			112	112	0.799966	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			113	113	0.871316	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			146	146	0.80927	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			148	148	0.850623	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			155	155	0.700808	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			160	160	0.5	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			163	163	0.529026	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			192	192	0.84527	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			201	201	0.763167	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			203	203	0.723201	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			209	209	0.800721	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			213	213	0.809211	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			217	217	0.63809	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			222	222	0.567921	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			224	224	0.736178	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			225	225	0.856661	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			227	227	0.701649	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			242	242	0.522534	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			247	247	0.592166	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			265	265	0.5764	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			275	275	0.621088	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			283	283	0.898303	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			285	285	0.572157	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			291	291	0.621593	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			294	294	0.521331	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			308	308	0.593649	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			309	309	0.594433	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			310	310	0.705501	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			311	311	0.665216	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			312	312	0.754411	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			314	314	0.697449	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			316	316	0.899667	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			320	320	0.614628	.	.	#POSITIVE
SEQUENCfnetOGlyc-CARBOHYI			324	324	0.643781	.	.	#POSITIVE

### 3.8. Relação entre doenças ósseas e Zfp361l

Foram acedidos vários estudos de modo a verificar que SNP's (Polimorfismos de Nucleotídeo Único) do gene *ZFP36L1* estão relacionados com doenças ósseas e cartilagíneas.

Tendo-se descoberto que neste gene há 2 SNP que podem contribuir para a Artrite reumatóide sistémica juvenil (AIJ): o SNP rs12434551 e o rs3825568 que estão localizados na posição 69253364 e 69260588 do cromossoma 14 respetivamente. O primeiro está numa posição intergénica e o segundo no 5'UTR (Tabela 7). Posteriormente verificou-se que o SNP potencial causal das regiões de risco desta doença é o rs12434551 que está associado a rs3825568 na posição 69260588 do cromossoma 14 localizado no 5'UTR do gene *ZFP36L1* (Tabela 8). O SNP do *ZFP36L1* na artrite reumatoide juvenil, artrite crónica juvenil sistémica, artrite crónica juvenil paliarticular, artrite idiopática juvenil poliarticular e oligoarticular é o rs3825568 que está localizado na posição 68793871 do 5'UTR de *ZFP36L1*, estando este localizado no cromossoma 14. (Tabela 8).

### 3.9. Evidências de mutações no gene *ZFP36L1* que podem contribuir para a Artrite reumatóide sistémica juvenil

Tabela 7 – Região significativa do gene *ZFP36L1* associada com AIJ

Gene	Chrm	Posição	SNP	Alelo menor	Posição do SNP
<i>ZFP36L1</i>	14	69253364	rs12434551	A	Intergénico
		69260588	rs3825568	T	5'UTR

Na tabela 8 verificou-se que os 2 SNP's estão correlacionados um com o outro.

Tabela 8 – SNP potencial causal das regiões de risco de AIJ

SNP principal	SNP associado	Cromossoma	Posição	Localização
rs12434551	rs3825568	14	69260588	5' UTR de <i>ZFP36L1</i>

*ZFP36L1* está associado a 43 doenças. Neste estudo focou-se nas doenças ósseas e da cartilagem.

### 3.10. Resultados relativos à expressão de *Zfp3611*

Neste estudo tínhamos como objetivo estudar a expressão de *Zfp3611* em contextos patológicos que fossem modelos para osteoporose e osteoartrose. Através de um trabalho que foi feito anteriormente no nosso grupo [146] de investigação que mostra que o metabolismo do osso foi afetado por suplementação dietética de ferro de maneiras diferentes consoante o genótipo, nomeadamente ratinhos com background genético C57BL/6 (*Wt*) e knockout para o gene *Hfe* (*Hfe-KO*). Os ratinhos *Hfe-KO* produzem naturalmente um excesso de ferro sistémico. Foi possível observar que nas condições experimentais de uma dieta enriquecida com ferro por 3 meses os resultados no metabolismo do osso foram opostos, no ratinho *Wt* levou a uma depressão do metabolismo do osso e favorecimento de formação de osso durante o período da dieta (Figura 25) e nos ratinhos *Hfe-KO* o fenótipo foi de perda de massa óssea e aumento dos níveis de reabsorção óssea (Figura 25). Atendendo ao contexto do fenótipo do osso destes grupos de ratinhos e respetivos controlos da dieta procurou-se analisar a expressão de *Zfp3611*. Foi possível observar que a expressão de *Zfp3611* está correlacionada com os níveis metabólicos do osso, ocorrendo uma diminuição da expressão num contexto de mais osso e menor reabsorção óssea e aumentando a expressão num contexto de menos osso e maior reabsorção óssea (Figura 25). Neste trabalho em particular foram utilizadas as amostras deste estudo para analisar a expressão de *Zfp3611*.

### 3.11. Introdução da análise da expressão de *ZFP36L1* através da avaliação dos dados dos transcriptomas e *microarrays*

#### 3.11.1. Expressão de *Zfp36l1* em contexto de perda e ganho de osso

Objetivo: Mostrar como o metabolismo do osso influencia o *Zfp36l1*

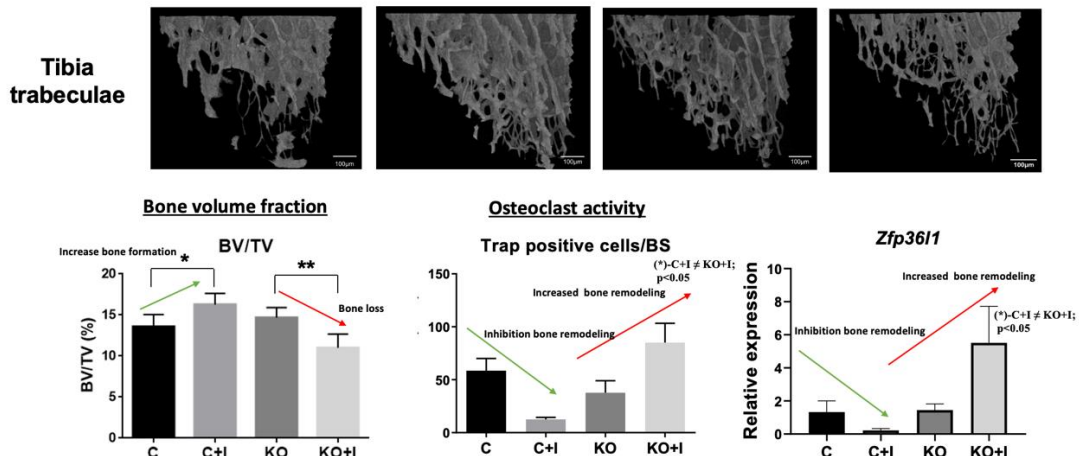


Figura 25 - Gráficos relativos ao impacto da influência de ferro na formação óssea. Variáveis testadas: C= ratinhos wild type com dieta normal; C+I= ratinhos wild type com dieta rica em ferro; KO= ratinhos com knockout de Hfe com dieta normal; KO+I= ratinhos knockout de Hfe com dieta rica em ferro. Todos os ratinhos tinham 6 meses de idade. Dados obtidos por orientador da tese. **Simão et al 2018** (134) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207441>

#### 3.11.2. Expressão de *Zfp36l1* durante a diferenciação de osteoblastos

A experiência GSE54461 intitulada “Expressão genética temporal através da osteoblastogênese” foi realizada em osteoblastos de calvaria de ratinhos em 9 pontos de tempo diferentes após a diferenciação (2d; 4d; 6d; 8d; 10d; 12d; 14d; 16; 18d), tendo sido analisada a expressão genética destes com o objetivo de caracterizar as alterações temporais no transcriptoma ao longo da maturação osteoblástica, desde o comprometimento das células estaminais mesenquimais/estágio inicial pré-osteoblastos até os osteoblastos maduros capazes de mineralização da matriz [125].

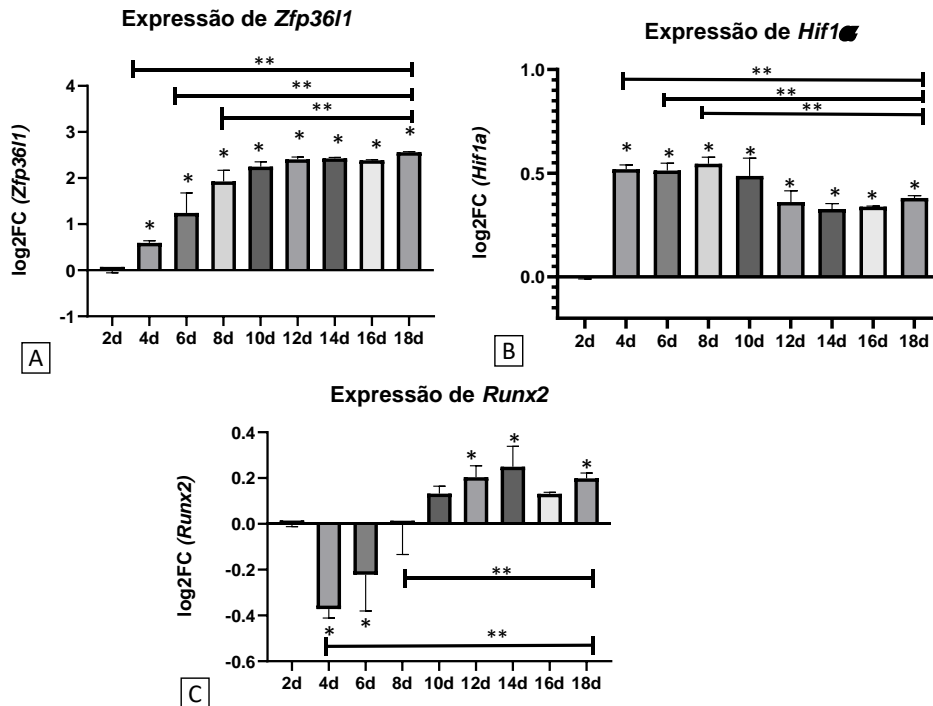


Figura 26 – Expressão relativa com log2FC de *Zfp3611* (A), *Hif1* alfa (B) e *Runx2* (C) ao longo do tempo. GSE54461- Expressão genética temporal através da osteoblastogênese. Análise estatística com normality test com one way ANOVA no qual se verificou que o estudo é estatisticamente significativo. Comparação estatística com teste post-hoc para comparações múltiplas através do Two-stage linear setup procedure of Benjamini, Krieger and Yekutieli (\* p-value  $\leq 0,05$ , N=3). Nota: o grupo controlo utilizado foi os 2d

A, B, C – GSE54461 Expressão genética temporal através da osteoblastogênese

Depois de determinar-se a expressão relativa de *Zfp3611* como descrito anteriormente foi possível comparar os valores de Log2FC entre os vários grupos e utilizou-se o grupo controlo aos 2 dias como referência para o Log2FC (Figura 26). O teste para avaliar a normalidade verificou que o grupo de amostras aos 16 dias não apresentava uma distribuição normal, por isso foi excluído da análise com o teste paramétrico. A comparação múltipla entre os grupos, excluindo o dos 16 dias, revelou que a expressão de *Zfp3611* aumentou até ao 10º dia e manteve-se constante entre o 12º e 18º dias (figura 26 A).

Por outro lado, analisou-se um alvo de *Zfp3611*, o *Hif1a* e observou-se um aumento do 2º para o 4º dia que se manteve constante até ao 10º dia e diminuiu de maneira estatisticamente significativa no 12º dia comparando com o 10º dia, tendo-se mantido

constante até ao 18º dia, sugerindo que a expressão possa estar a ser inibida por *Zfp3611* (Figura 26 B).

Para validação da diferenciação das células no sentido de osteoblastos maduros observou-se um aumento estatisticamente significativo para *Runx2* a partir do dia 8º para os dias 12º-18º. A comparação entre a referência (2º dia) e o 4º revelou uma diminuição estatisticamente significativa de *Runx2* (Figura 26 C).

Para confirmar os resultados observados para o estudo descrito anteriormente procurou-se outros estudos para avaliação da expressão de *ZFP36L1* em experiências onde promoveram a diferenciação de osteoblastos. O primeiro estudo, com referência GSE148203, com título “Sequenciamento de Próxima Geração Facilita a Análise Quantitativa do Transcriptoma num contexto de Mineralização de Osteoblastos” no qual os autores promoveram a diferenciação de osteoblastos da linha células hFOB 1.19 e recolheram amostras para a sequenciação do transcriptoma aos 0, 3, 6 e 9 dias. Verificou-se um aumento de *ZFP36L1* e *RUNX2*, confirmando os resultados anteriores, o aumento exponencial de *RUNX2* sugere comprometimento das células no caminho dos osteoblastos (Figura 27 A e 27 B).

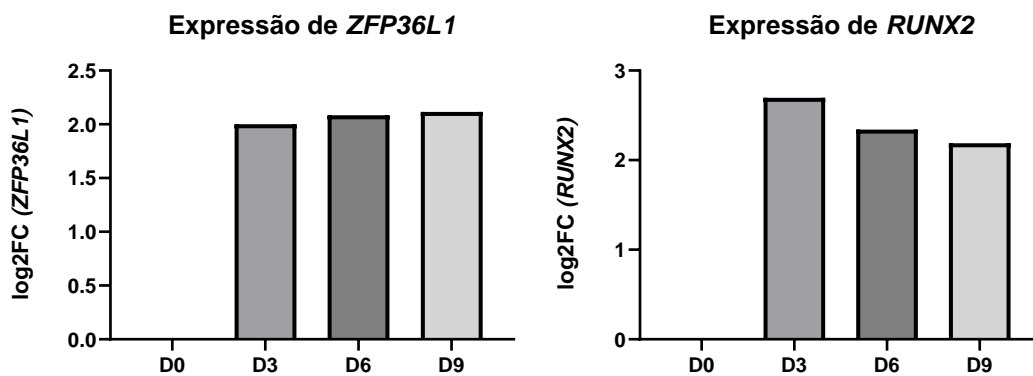


Figura 27 – A e B – GSE148203 – Sequenciação de Próxima Geração Facilita a Análise Quantitativa de Transcriptomas de Mineralização de Osteoblastos

### 3.11.3. Comparação da expressão *ZFP36L1* durante o processo de diferenciação de células mesenquimais em adipócitos e osteoblastos

A experiência GSE174794 intitulada “Identificação de genes candidatos compartilhados simultaneamente pela adipogénese e osteoblastogénese a partir de células estaminais mesenquimais humanas” foi realizada em células estaminais humanas (hMSCs) aos 3, 5

e 7 dias através do uso de screening de genes candidatos de adipocito/osteoblastogénese com o objetivo de fornecer os potenciais interruptores moleculares para o estudo do equilíbrio da adipo-osteoblastogénese e terapia da osteoporose [126].

Neste estudo onde só há um replicado biológico por condição quando se comparou 0d (controlo) verificou-se uma diminuição de *ZFP36L1* entre os 3 e 7 dias (Figura 28 A), acompanhados pela diminuição da expressão de *RUNX2* (Figura 28 B) para comprometimento da direção de diferenciação para adipócitos sugerindo um efeito menos importante de *ZFP36L1* no comprometimento para os adipócitos.

Dentro da osteoblastogénese, *Zfp361l* é primeiro detetado em pré-osteoblastos, depois é sobreexpresso em osteoblastos imaturos e subexpresso em osteoblastos maduros (Figura 27 B) [147].

Com o aumento de *ZFP36L1* aos 7 dias, ocorre diminuição de *HIF1a*, o que pode sugerir inibição parcial de *HIF1a*. (Figura 28 C)

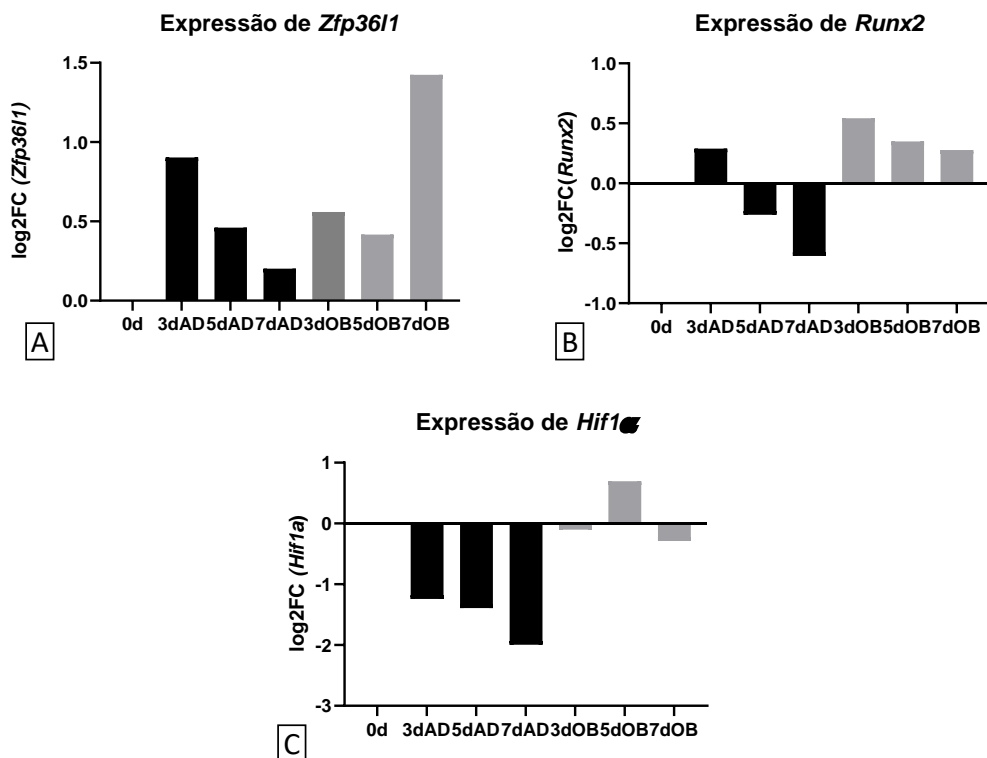


Figura 28 - GSE174794 – “Identificação de genes candidatos compartilhados simultaneamente pela adipogénese e osteoblastogénese a partir de células estamianais mesenquimais humanas”. Comparação estatística one-way ANOVA com post hoc (p-value  $\leq 0,05$ ).

### 3.11.4. Estudos *in vivo* para modelos de osteoporose

Para analisar a relação da expressão do gene *ZFP36L1* em células estaminais mesenquimais humanas (hMSC) diagnosticados com osteoporose primária, analisou-se o estudo GSE214645 intitulado como “Alteração funcional de células estaminais mesenquimais esqueléticas de ratinhos correlacionada com a progressão da osteoporose”, para investigar o papel da osteoporose em células estaminais mesenquimais esqueléticas (mSSC), classificou-se a mSSC a partir da metáfise de ratinhos 8w-sham (ratinhos operados simulados às 8 semanas) e 8w-ovx (ratinhos ovariectomizados às 8 semanas), em seguida, realizou-se análise de perfil de expressão genética utilizando dados obtidos por RNA-seq de mSSC. Os ratinhos (8 semanas) foram operados simulados (sham) ou ovariectomizados (OVX) e, em seguida, sacrificados às 8 semanas [127].

Neste estudo verificou-se um aumento da expressão de *Zfp36l1* e *Acp5*, e uma diminuição de *Tnfrsf11* (também conhecido por *Rankl*) e *Tnfrsf11b* (também conhecido por *Opg*). Posteriormente procedeu-se à razão *Opg:Rankl*, de modo a perceber se há uma promoção da reabsorção óssea ou não, tendo-se observado uma razão inferior a 1 (Figura 29).

Quando a razão *Opg:Rankl* é inferior a 1, significa que há maior atividade por parte do *Rankl* do que do *Opg*, havendo promoção da diferenciação e atividade dos osteoclastos, permitindo mais reabsorção óssea, o que sugere osteoclastogénese.

Já quando a razão *Opg:Rankl* é superior a 1, a atividade do *Opg* é superior à do *Rankl*. O OPG liga-se ao RANKL impedindo que o RANKL se ligue ao seu recetor RANK nos osteoclastos, o que provoca bloqueio da ativação dos osteoclastos e inibe a reabsorção óssea.

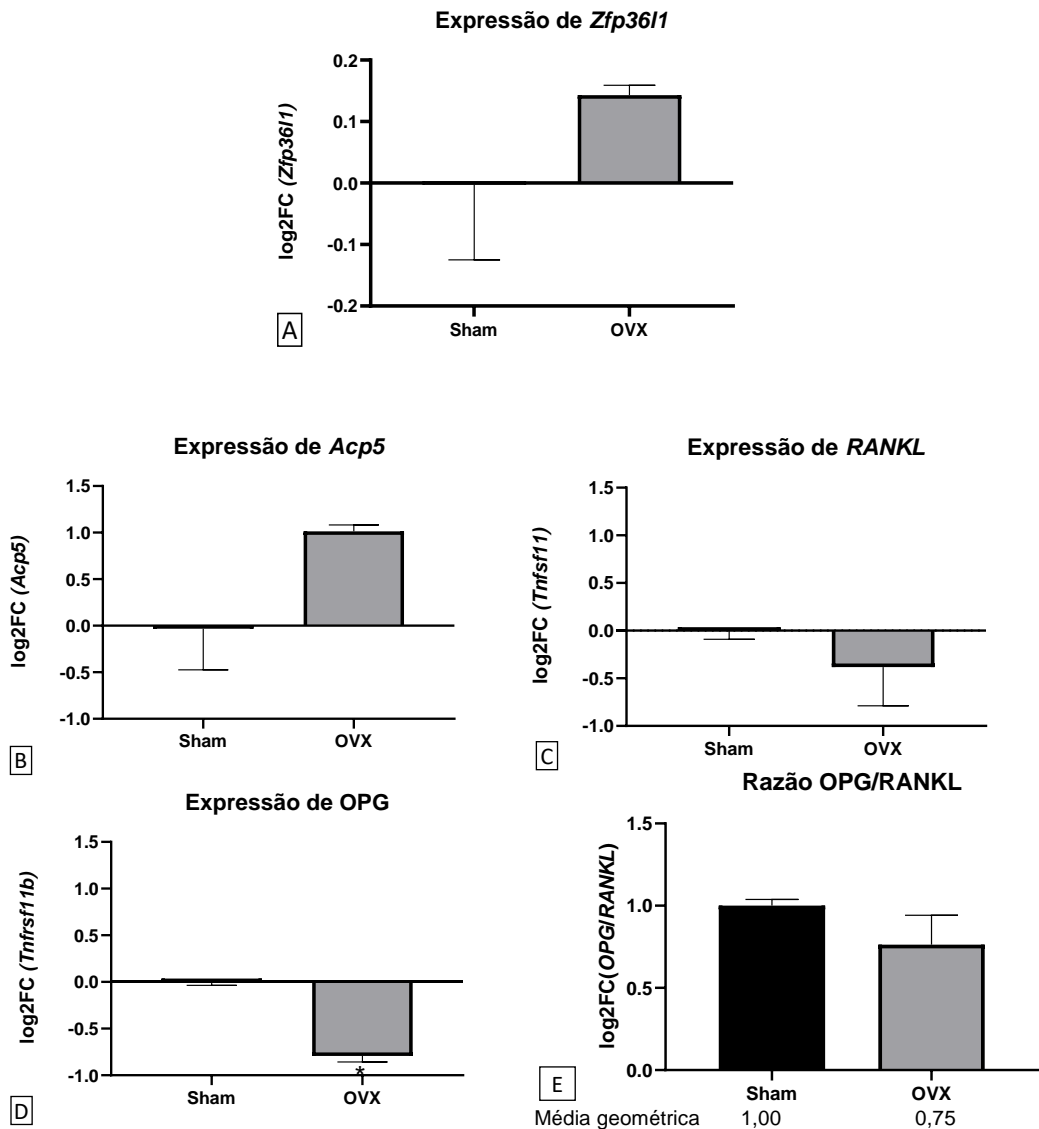


Figura 29 - Análise da expressão de Zfp3611 (A), Acp5 (B), Tnfsf11 (C), Tnfsf11b (D) e razão Opg:Rankl (E) em células estaminais mesenquimais de modo a estudar os efeitos da osteoporose primária. Normalidade por Shapiro-Wilk demonstrou que todos têm distribuição normal, t-test com Krustal-Wallis (\* p-value < 0,05; N=2)

GSE214645 – Alteração funcional de células estaminais mesenquimais esqueléticas de ratinhos correlacionada com a progressão da osteoporose (N=2)

No estudo GSE30081 intitulado “As dietas de mirtilo apenas durante o desenvolvimento inicial são suficientes para prevenir a senescência dos osteoblastos e a perda óssea na idade adulta” a qualidade óssea foi comparada entre a dieta controle de caseína em ratas operadas com simulação (Sham) e dieta de caseína em ratas ovariectomizada (OVXc). Neste estudo também foram comparadas a dieta de mirtilos de longa duração ovariectomizada (LT) e ratas ovariectomizadas com dieta a curto

prazo de mirtilos (ST), mas estas duas condições não serão avaliadas neste contexto porque não revelaram impacto na expressão de *Zfp3611* [128].

Observou-se então um aumento de *Zfp3611*, *Acp5*, *Rankl* e *Opg*. A razão de *Opg:Rankl* é inferior a 1 (Figura 30).

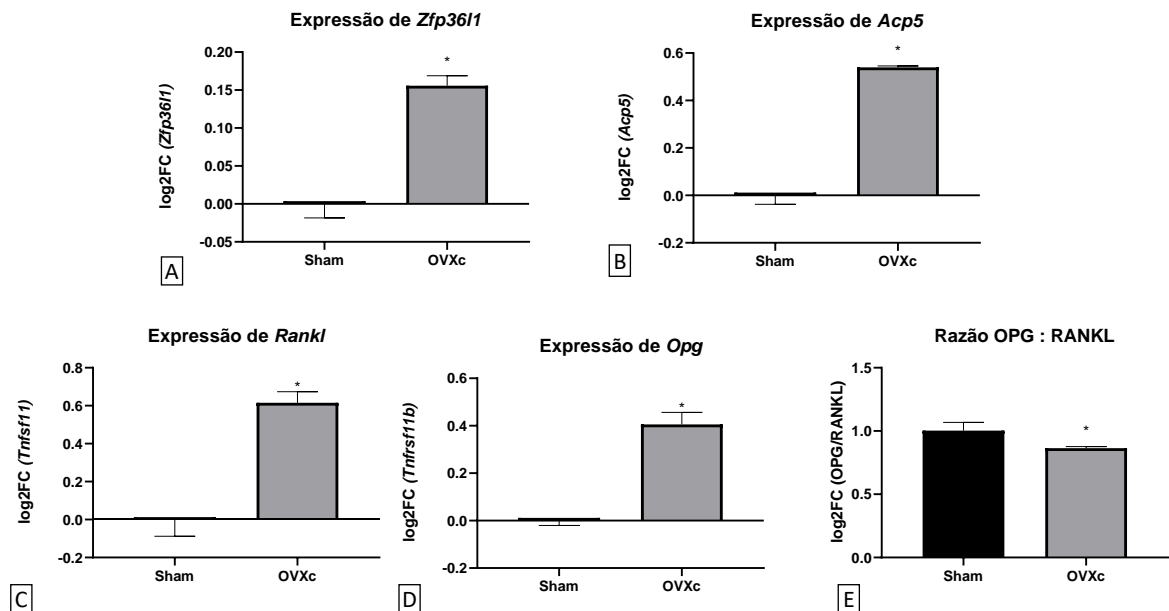


Figura 30 - Análise da expressão de *Zfp3611* (A), *Acp5* (B), *Tnfsf11* (C), *Tnfsf11b* (D) e razão *Opg:Rankl* (E) em células estaminais mesenquimais de modo a estudar os efeitos da osteoporose primária. Normalidade por Shapiro-Wilk demonstrou que todos têm distribuição normal, t-test com Krustal-Wallis (\* p-value < 0,05; N=3)

GSE30081 - As dietas de mirtilo apenas durante o desenvolvimento inicial são suficientes para prevenir a senescência dos osteoblastos e a perda óssea na idade adulta (N=3)

Por fim analisou-se o estudo GSE35958 intitulado como “Efeitos da osteoporose primária em células estaminais mesenquimais humanas” (Figura 31). Neste estudo as células hMSCs foram isoladas de cabeças femorais de pacientes idosos com osteoporose após fratura de baixa energia do colo do fémur. A medula óssea de doadores não osteoporóticos da mesma idade foi obtida de cabeças femorais após artroplastia total de quadril. Também foram analisadas células senescentes de dadores com meia-idade. O objetivo foi desvendar o papel de *ZFP36LI* na biologia das células estaminais mesenquimais humanas (hMSC) e na fisiopatologia da osteoporose, em hMSC de pacientes idosos com esta doença (comparados com o grupo controlo). O grupo controlo e o grupo de pacientes com osteoporose tinha uma média de idades semelhante (79 a 94 anos).

Ao analisar-se a expressão relativa dos genes foi possível verificar um aumento de *ZFP36L1* e *RANKL* apenas na condição de idosos com osteoporose (“old OP”), verificou-se um aumento nesta condição e também na condição de dadores sem osteoporose (“old”) no gene *ACP5*, e um aumento de *OPG* em todas as condições. A razão *OPG:RANKL* é inferior a 1 comparado com o controlo, sugerindo osteoclastogénese (Figura 31). O gene *ACP5* (também conhecido como gene *TRAP* ou gene *tartrate-resistant acid phosphatase 5*) codifica a enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP). Esta enzima é expressa por osteoclastos e tem um papel crítico em muitos processos biológicos, incluindo desenvolvimento esquelético, síntese e degradação de colagénio e mineralização óssea

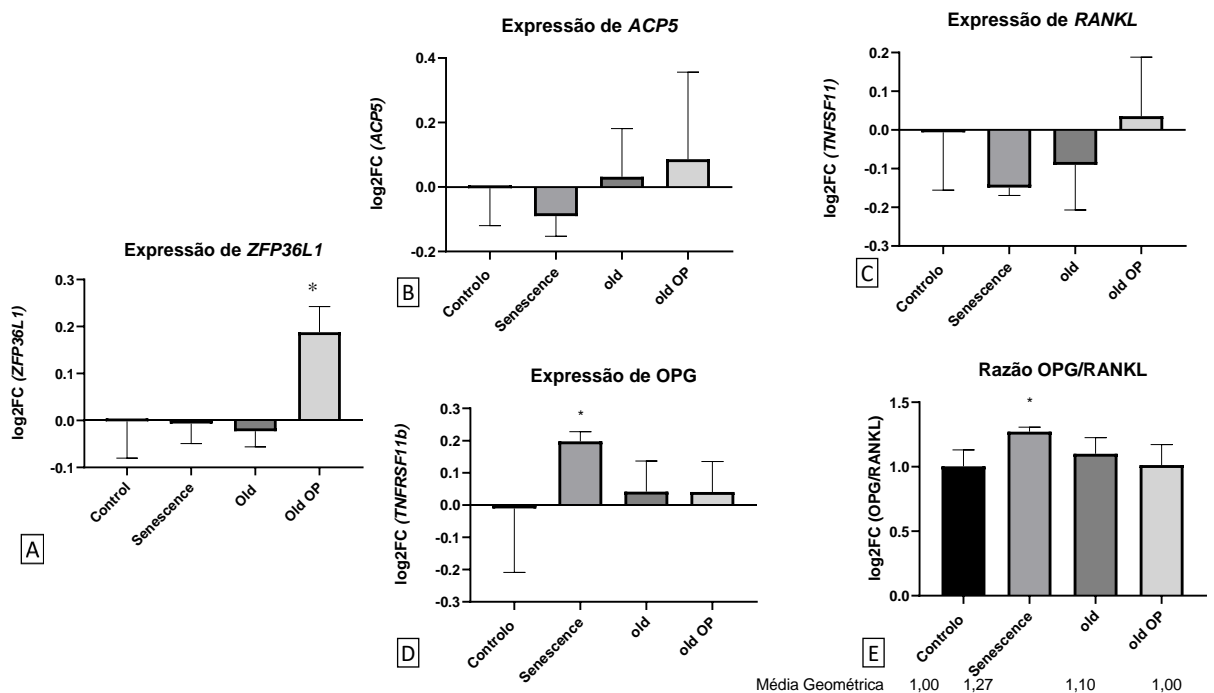


Figura 31 - Análise da expressão de *Zfp36l1* (A), *Acp5* (B), *Tnfsf11* (C), *Tnfsf11b* (D) e razão *Opg:Rankl* (E) em células estaminais mesenquimais humanas de modo a estudar os efeitos da osteoporose primária. Normalidade por Shapiro-Wilk demonstrou que todos têm distribuição normal, teste Krustal-Wallis (\* p-value < 0,05; N=5; N=5; N=4; N=5)

GSE35959 - Identificação de genes candidatos compartilhados simultaneamente pela adipogénese e osteoblastogénese a partir de células estaminais mesenquimais humanas(N=5; N=5; N=4; N=5)

Senescence – dadores de meia-idade com células senscentes

Old – dadores idosos sem osteoporose

Old OP – dadores idosos com osteoporose

No estudo GSE194301 intitulado “A sequenciação de nova geração facilita a análise quantitativa de transcriptomas para um modelo osteoporótico de peixe-zebra quando sujeito a tratamento com dexametasona”, amostras de *zebrafish* tratadas com DEX (dexametasona) para 3, 4, 5, 6 e 7 dpf (N=3), foram coletadas para realização de RNA-seq. A fim de determinar os sinais de alerta precoce antes da osteoporose, usou-se a abordagem de biomarcador de rede dinâmica (DNB) para analisar os dados de expressão genética de séries temporais no modelo de osteoporose de peixe-zebra. Como no genoma do Peixe-Zebra é possível encontrar 2 genes ortólogos (*Zfp3611a* e *Zfp3611b*), fez-se a análise de cada um deles. A partir destes dados analisou-se a expressão relativa de *Zfp3611a* e *Zfp3611b* neste estudo. Tendo-se verificado um aumento tanto de *Zfp3611a* como *Zfp3611b* embora sem significado estatístico (Figura 32A e B respectivamente)

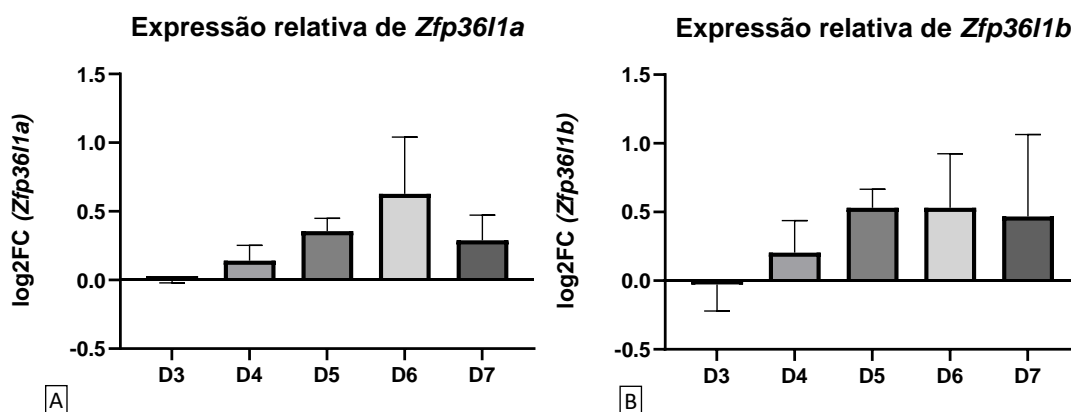


Figura 32 – Análise da expressão relativa de *Zfp3611a* (A) e *Zfp3611b* (B) (\* p-value < 0,05; N=3)

GSE194301 – A sequenciação de nova geração facilita a análise quantitativa dos transcriptomas de um modelo osteoporótico de peixe-zebra quando sujeito a tratamento com dexametasona (N=3)

### 3.12. Expressão *Zfp3611* num contexto de excesso de osso

Examinou-se perfis de medula óssea de ratinhos DTRADQ e controlo Cre negativos, antes e depois da injeção de DT (toxina difteria). Os ratinhos DTRADQ resultam do cruzamento ratinhos que expressam o recetor da toxina da difteria de primata (DTR), que é equivalente ao fator de crescimento semelhante à epiderme de ligação à heparina (HB-EGF), sob o controle de um *Stop-flox cassette*, com aqueles que expressam adiponectina-Cre (ADQ -Cre), com o objetivo de descobrir novas terapias para combater

a osteoporose, tendo em conta que os produtos dos adipócitos controlam as células ósseas e podem, portanto, levar a essas novas terapias. A toxina da difteria injetada (DT) elimina completamente o tecido adiposo branco e castanho. A ablação de adipócitos da medula promove a formação de osso pois a expressão da adiponectina é marcadamente reduzida, enquanto a expressão dos genes *Colla1* e *Colla2* está aumentada. Analisou-se a transcrição relativa de *Zfp361l* e verificou-se uma diminuição da expressão de *Zfp361l* nos ratinhos DTRADQ quando comparados com os do tipo selvagem (*wild type*), sendo às 48h e 72h estatisticamente significativo (Figura 33).

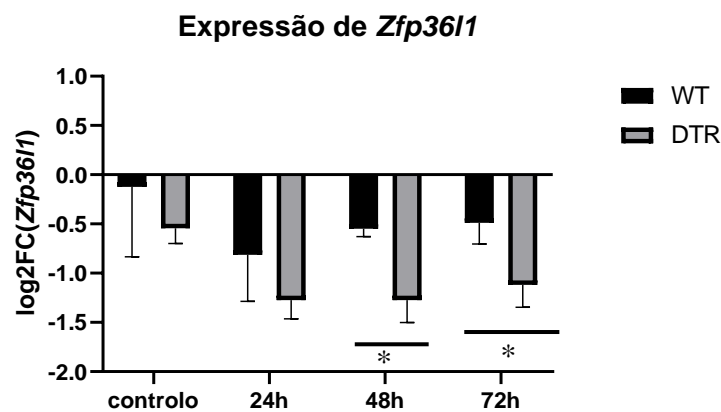


Figura 33– Análise two-way ANOVA da expressão de *Zfp361l* em ratinhos DTRADQ e Cre negativo ( ninhada resultante de ratinhos que expressam o recetor da toxina da difteria de primata (DTR) com aqueles que expressam adiponectina-Cre (ADQ-Cre)) comparados com *wild type* (WT) - GSE154800. Teste estatístico com *Two-way ANOVA test* com teste *post hoc* para comparação entre grupos ao longo do tempo (WT e DTR) no qual se verificou que o estudo é estatisticamente significativo. Comparação estatística com t test múltiplo ao longo do tempo (\* p-value  $\leq 0,05$ , N=4)

Há formação de novo osso nos grupos DTR e começa a estabelecer-se uma diferença significativa. Através da análise two-way ANOVA do gene *Zfp361l*, verificou-se que não existe efeito sinérgico entre o tempo e os diferentes grupos de ratinhos, ou seja, não interferem um no outro.

### 3.13. Diferenciação de osteoclastos (Reabsorção óssea)

Para estudar a relação entre a expressão de *Zfp361l* e a reabsorção óssea analisou-se quatro estudos.

No estudo GDS5464 intitulado “Efeito de deficiência NFATc1 na diferenciação de osteoclastos in vitro” comparou-se macrófagos da medula óssea de ratinhos *wild-type*

e de ratinhos induzidos à deficiência de NFATc1. Usou-se a expressão genética do perfil de *microarrays* em osteoclastos deficientes de NFATc1 e *wild type* gerados in vitro para identificar transcrições dependentes de NFATc1 em osteoclastos. Para obter informações sobre a regulação transcricional da reabsorção óssea durante o crescimento e a doença, gerou-se um *knockout* de *Nfatc1* (fator de transcrição das células T ativadas c1) e comparou-se a transcrição relativa de *Zfp3611* de dois grupos: osteoclastos wild type de ratinhos e osteoclastos sem o fator de transcrição NFATc1 também de ratinhos, verificando-se que a expressão de *Zfp3611* está diminuída em osteoclastos sem o fator de transcrição NFATc1 (Figura 33 A).

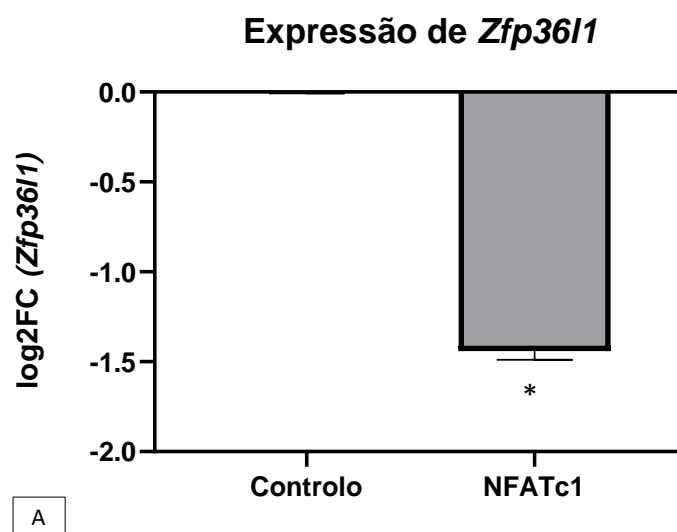


Figura 34 A - Análise da expressão relativa de *Zfp3611* em osteoclastos sem o fator de transcrição NFATc1 in vitro e osteoclastos wild type. Realizou-se um t test e um Mann-Whitney test nos quais se verificou que o estudo é estatisticamente significativo (\* p-value ≤0,05; n=2).

GDS5464 - Efeito de deficiência NFATc1 na diferenciação de osteoclastos in vitro (N=2)

No GSE138324 intitulado “Matriz de expressão de macrófagos e osteoclastos derivados da medula óssea de ratinhos”, em que macrófagos e osteoclastos derivados da medula óssea foram lisados em estágios específicos de diferenciação para extração de RNA e hibridização em *microarrays* Affymetrix para um perfil tempo-dependente da transição BMDM-osteoclastos. Foram selecionados os osteoclastos com BMDM (*bone marrow-derived macrophages*) em cinco momentos: antes da diferenciação, ou seja, os BMDMs (dia 0), durante a diferenciação (dia 1, 2 e 3) e os osteoclastos maduros (dia 5). Através deste estudo analisou-se o Log<sub>2</sub>FC de *Zfp3611* de modo a estudar a expressão deste gene durante as diferentes fases de osteoclastos. Tendo-se verificado uma diminuição no 1º dia de diferenciação e tendo

continuado a ser reprimido até ao 5<sup>o</sup> dia de diferenciação, mas não na mesma magnitude que foi no primeiro dia (Figura 35 A). Posteriormente analisou-se a expressão de *Acp5* neste estudos como validação da diferenciação destas células em osteoclastos e verificou-se um aumento gradual deste gene (Figura 35 B)

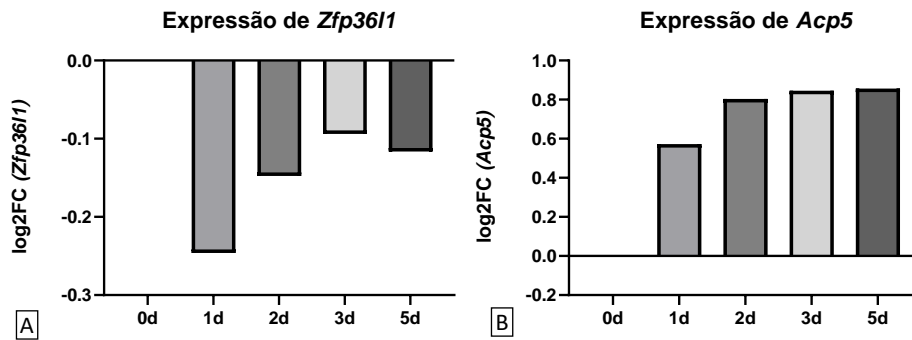


Figura 35 - Análise da expressão relativa de *Zfp3611* (A) e *Acp5* (B) em macrófagos e osteoclastos derivados de medula óssea de ratinhos.

GSE138324 - Matriz de expressão de macrófagos e osteoclastos derivados da medula óssea de ratinhos (N=1)

No GSE176265 cujo título é “Perfil de expressão genética durante a diferenciação de osteoclastos mediada por RANKL”, com o objetivo de descrever as alterações na expressão de genes associados à O-GlcNAcilação (O-glicosilação com N-acetilglucosamina) durante a diferenciação de osteoclastos mediada por RANKL, foi feita a análise de transcriptoma da osteoclastogénese, BMMs (*bone marrow microenvironment*) foram tratadas com 30 ng/ml M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*) e 100 ng/ml RANKL por 0, 24, 48, 72 horas. Tendo-se verificado uma diminuição da expressão de *Zfp3611* (Figura 36).

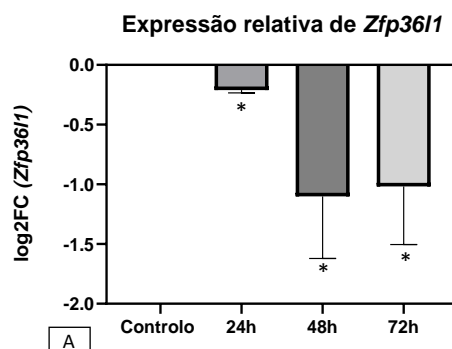


Figura 36 - Análise da expressão relativa de *Zfp3611* em osteoclastos por análise de microarray. Análise estatística obtida por GEO2R (\*p-value≤0,05; n=3).

GSE176265 - Perfil de expressão genética durante a diferenciação de osteoclastos mediada por RANKL(N=3) obtido por GEO2R

No GSE166559 intitulado “Sequenciamento de RNA de próxima geração de amostras knockdown de LSD1 na diferenciação de osteoclastos humanos” criou-se um perfil de expressão por sequenciamento de alta taxa de transferência, em que monócitos humanos CD14-positivos foram nucleofectados com siRNAs controlos ou específicos para LSD1 e cultivados com estimulação M-CSF (20 ng/ml) e RANKL (40 ng/ml) por 0, 24 ou 48 horas, os mRNAs foram obtidos de dois dadores independentes. Verificou-se diminuição da expressão de *ZFP36L1* (Figura 37 A). Neste estudo não houve alteração da expressão do gene *ACP5* às 24h mas ocorreu um aumento às 48h (Figura 37 B).

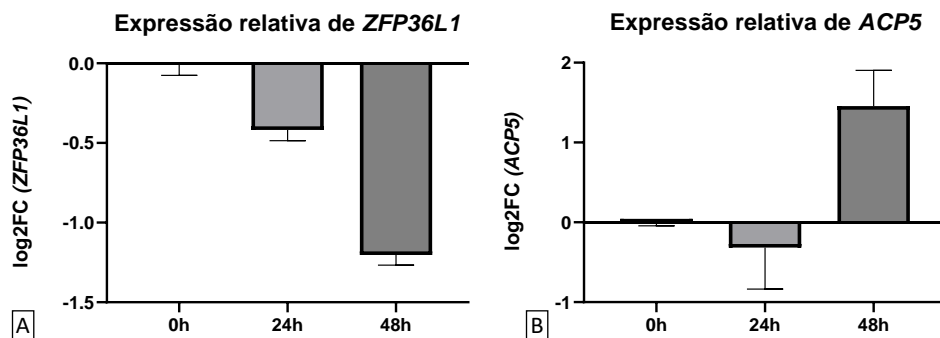


Figura 37- Análise da expressão relativa de *Zfp36l1* em osteoclastos com controlos siRNAs MLS1-specific-RNAs. Análise estatística com One-way ANOVA e teste não paramétrico Krustal-Wallis (\*p-value $\leq$ 0,05; n=2)

GSE166559 – Sequenciação de RNA de próxima geração de amostras knockdown de LSD1 na diferenciação de osteoclastos humanos (N=2)

### 3.14. Diferenciação dos condrócitos

Procurou-se avaliar como a expressão relativa de *Zfp36l1* varia em condrócitos com diferentes graus de diferenciação na placa de crescimento de ratinhos. Neste estudo analisaram-se condrócitos de 3 camadas distintas da cartilagem articular: zona superficial (ZS), zona intermédia (ZI) e região hipertrófica (RH). Para investigar semelhanças e diferenças entre a cartilagem articular e da placa de crescimento e explorar as alterações transcricionais que ocorrem durante o início da sua divergência, realizou-se microdissecção manual de tíbias proximais de ratos com 10 dias de idade. [134]. A partir destes dados analisou-se a expressão relativa de *Zfp36l1* em condrócitos da zona superficial, intermédia e hipertrófica da cartilagem articular.

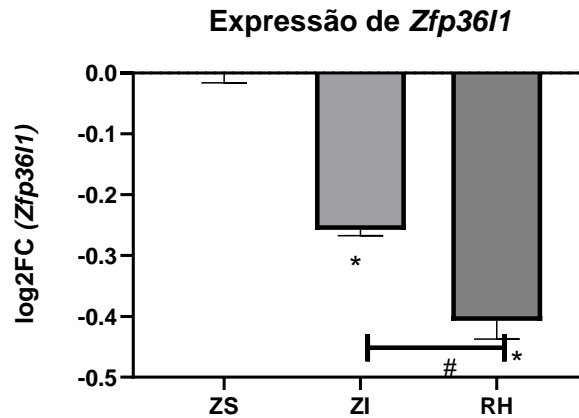


Figura 38 - Logaritmo fold change de *Zfp3611* das zonas superficial (ZS) e intermédia/profunda (ZI) microdissecadas da cartilagem articular e placa de crescimento (RH) da cartilagem da placa de crescimento das epífises tibiais proximais de ratos com 10 dias de idade. GSE54216-Zonas articulares e de cartilagem da placa de crescimento: tibia proximal normal com 10 dias de idade (Comparação estatística com One Way ANOVA (com teste pos-hoc de Tukey para comparação múltipla), com  $p \leq 0,05$ ;  $N=4$ ). ZS: Zona superficial; ZI: Zona intermédia/ profunda; RH: Região hipertrófica.

Verificou-se que na cartilagem articular houve uma diminuição na zona intermédia/profunda, e houve uma diminuição ainda mais acentuada na região hipertrófica da placa de crescimento (Figura 38) [134].

### 3.15. Patogénese da osteoartrose

Foram analisados quatro estudos relativos à patogénese da osteoartrose.

A cartilagem osteoartrítica humana contém não apenas condrócitos (OACs), mas também células estromais mesenquimais (OA-MSCs), cuja abundância aumenta durante a osteoartrose [135]. Na experiência GSE176299 com o título “As células estromais mesenquimais residentes em tecido senescente são uma fonte interna de inflamação na cartilagem osteoartrítica humana” analisou-se o RNA-seq de condrócitos osteoartríticos, células estromais de cartilagem normal e células estromais mesenquimais de cartilagem osteoartrítica. A partir daí, analisou-se a expressão de *Zfp3611*, de modo a relacionar com a inflamação na cartilagem verificando-se um aumento na expressão deste gene (Figura 39 A). Também se analisou a expressão de *Hif1a*, no qual se verificou um aumento mais acentuado de CSCOA do que CondOA (Figura 39B).

Verificou-se diminuição da expressão de *HSPA1A* e *HSPA1B*, enquanto verifica-se uma diminuição de *CD47* em CSCOA e um aumento deste gene em CondOA (Figura 39 C, D e E, respetivamente).

Os genes HSPA1A e HSPA1B são membros da família de genes HSP70, que codificam proteínas de choque térmico. Essas proteínas desempenham um papel fundamental na resposta ao *stress* celular, incluindo o *stress* térmico (calor), e estão envolvidas na proteção das células contra danos e na manutenção da homeostase celular.

O gene *CD47*, também conhecido como *Cluster of Differentiation 47*, codifica uma proteína de superfície celular chamada CD47. A CD47 é uma proteína transmembranar que desempenha várias funções importantes no corpo humano, incluindo o sistema imunológico e a regulação da fagocitose.

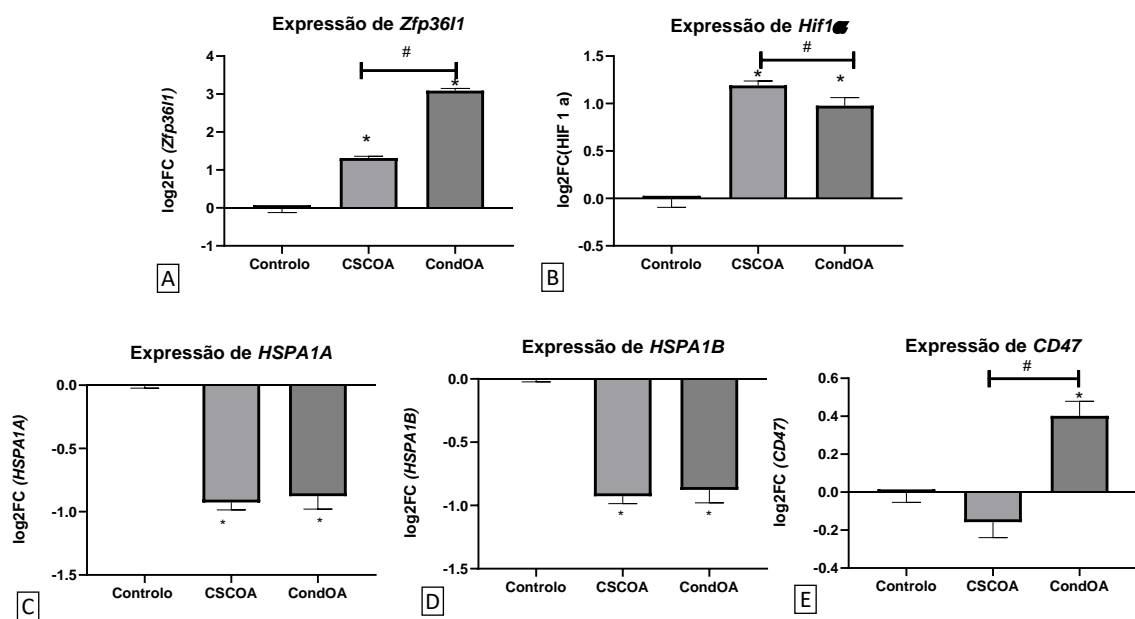


Figura 39- Logaritmo fold change de *Zfp361l* (A), *Hif1a* (B), *Hspa1a* (C), *Hspa1b* (D) e *Cd47* (E) uma sequência de RNA de condrócitos osteoartríticos, células estromais da cartilagem e células estromais mesenquimais da cartilagem osteoartrítica. Análise estatística com one-way ANOVA e teste post hoc (\*p-value  $\leq 0,05$ ; #  $\rightarrow$  estes grupos são estatisticamente significativos entre si)

RNA-seq: de condrócitos osteoartríticos – CondOA;

De células estromais de cartilagem normal – Controlo (cels precursoras de condrócitos sem ao);

De células estromais mesenquimais de cartilagem osteoartrítica – CSCOA

GSE176199 - As células estromais mesenquimais residentes em tecido senescente são uma fonte interna de inflamação na cartilagem osteoartrítica humana (N=3)

Posteriormente no estudo GSE6119 “Glucosamina exógena protege globalmente os condrócitos dos efeitos artritogénicos da IL-1beta” analisou-se uma cultura de condrócitos articulares tratados com glucosamina por 6 horas e depois por interleucina-1  $\beta$  por 14 horas [148]. A cartilagem articular foi isolada das cabeças femorais de ratas Wistar machos sob condições assépticas. Os condrócitos foram obtidos por digestão

sequencial da cartilagem com pronase e colagenase tipo II. Analisou-se a expressão de *Zfp3611* numa cultura de condrócitos articulares tratados com glucosamina por 6 horas e depois por interleucina-1  $\beta$  por 14 horas, o IL-1  $\beta$  vai provocar um fenótipo semelhante à osteoartrose, para aprofundar o conhecimento relativo às propriedades anti-artríticas da glucosamina (Figura 40 B).

IL-1  $\beta$  apresentou uma maior expressão de *Zfp3611* e a Glucosamina com IL-1 $\beta$  apresentou também uma maior expressão deste gene [148]. No entanto, a glucosamina inibiu a atividade do IL-1 $\beta$ . Efeito *rescue*: Quando existe um efeito patogénico menor por parte da glucosamina sobre o IL-1 beta, há inibição do *Zfp3611* (Figura 40 A e B).

Neste estudo verificou-se uma diminuição de *Hspa1a* e *Hspa1b* em todas as condições, e um aumento de *Cd47* em todas as condições (Figura 40 C, D e E respetivamente).

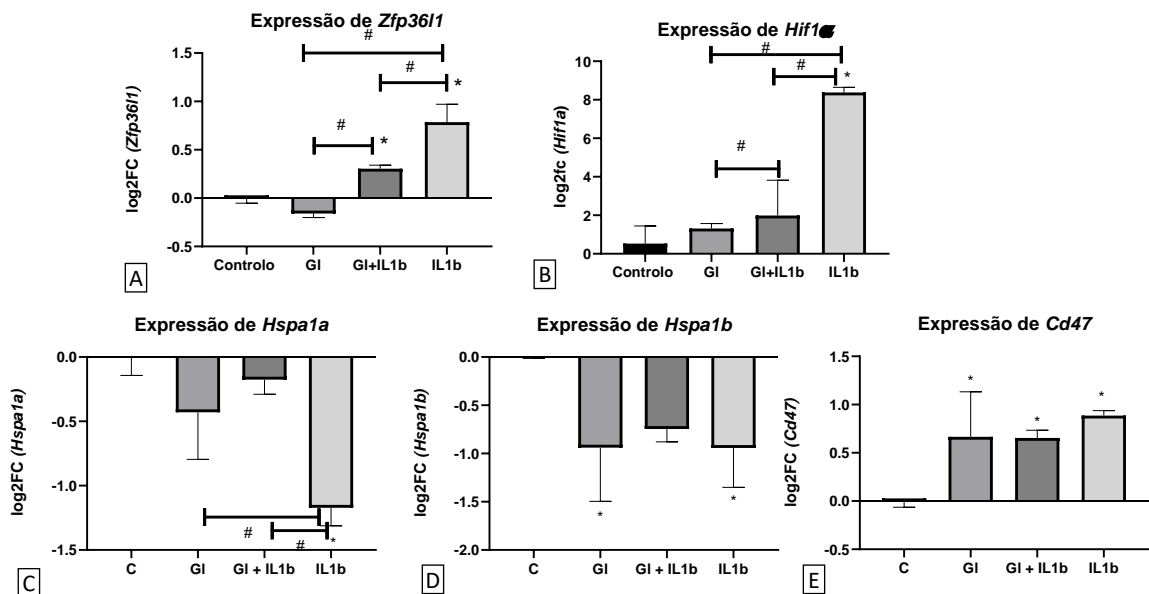


Figura 40- Logaritmo fold change de *Zfp3611* (A), *Hif1a* (B), *Hspa1a* (C), *Hspa1b* (D) e *Cd47* (E) em cultura primária de condrócitos isolados das cabeças femorais de ratos Wistar machos. N=4 (Comparação estatística com One Way ANOVA (com teste pos-hoc de Tukey para comparação múltipla), com  $p \leq 0,05$ ) C: controlo; IL-1b: IL1- $\beta$  ; GI: Glucosamina; GI+IL: Glucosamina + IL1- $\beta$   
GSE6119 - Glucosamina exógena protege globalmente os condrócitos dos efeitos artríticos da IL-1beta (N=4)

No estudo GSE173637 intitulado “A periostina induz a degeneração precoce da cartilagem articular na displasia do desenvolvimento da anca” analisaram-se os perfis de mRNA da cartilagem acetabular de ratazanas com e sem displasia de desenvolvimento da

anca por sequenciamento profundo de modo a investigar os fatores que induzem esta doença. Analisou-se a expressão de *Zfp3611* neste contexto e observou-se um aumento da expressão de *Zfp3611* nos que tinham displasia de desenvolvimento da anca.

Verificou-se uma diminuição de *Hspa1a* e *Hspa1b*, e um aumento de *Cd47* (Figura 41 C, D e E, respetivamente)

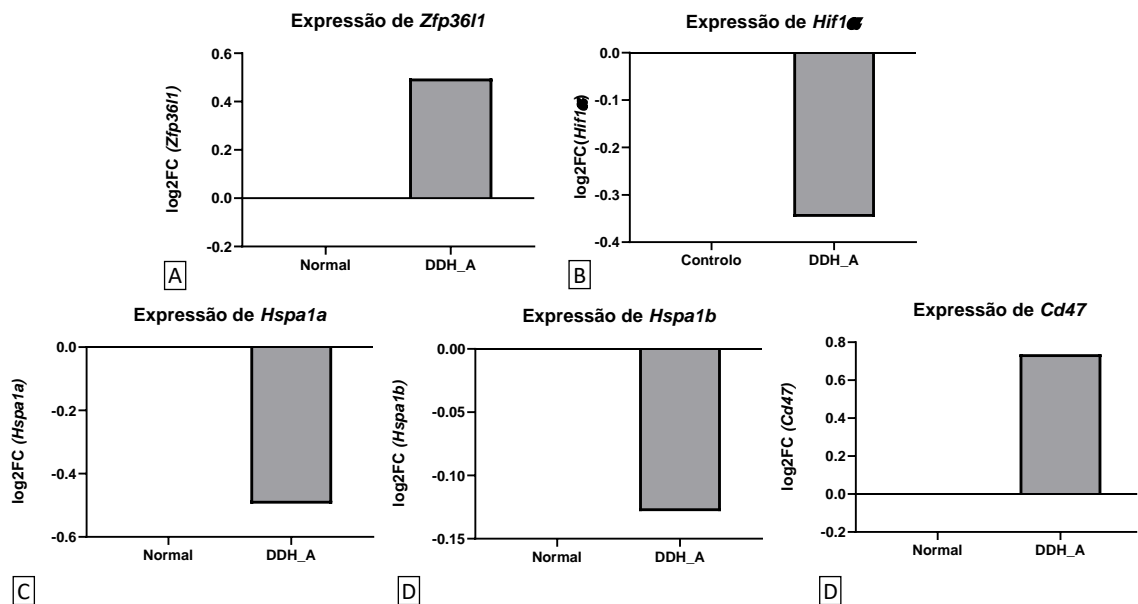
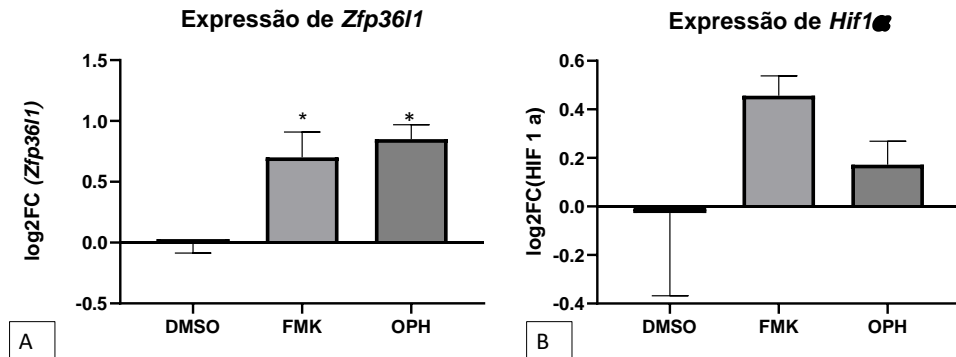


Figura 41 - Análise do logaritmo fold change de *Zfp3611* (A), *Hif1a* (B), *Hspa1a* (C), *Hspa1b* (D) e *Cd47* (E) a partir dos perfis de mRNA da cartilagem acetabular obtidos de ratas controle e DDH com 3 semanas de idade gerados por sequenciamento profundo usando Illumina Miseq. Análise estatística através de teste paramétrico t test (com  $p \leq 0,05$ ).

GSE173637 - A periostina induz a degeneração precoce da cartilagem articular na displasia do desenvolvimento da anca (N=1)

No estudo GSE164835 com o título “Análise baseada em RNA-Seq de condroblastos submetidos à inibição geral da caspase” revelou a modulação de um espectro de genes relacionados à osteoartrose, analisaram-se condroblastos por RNA-seq submetidos à inibição geral da caspase através de dois inibidores (FMK e OPH) comparados com o grupo controlo (DMSO). Para identificar de que modo *Zfp3611* influencia a progressão da osteoartrose quando o RNA-seq de condroblastos é submetido à inibição geral de caspase, avaliou-se a expressão deste gene no estudo GSE164835. Os

condroblastos foram cultivados com 2 inibidores diferentes: Z-VAD-FMK (FMK) e Q-VD-OPH (OPH).



GSE164835 - Análise baseada em RNA-Seq de condroblastos submetidos à inibição geral da caspase revelou a modulação de um espectro de genes relacionados à osteoartrite (N=3)

Figura 42 - Análise do logaritmo fold change de *Zfp3611* (A), *Hif1a* (B) respectivamente através do exame de 2 inibidores diferentes, Z-VAD-FMK (FMK) e Q-VD-OPH (OPH), e grupo controle (DMSO). Comparação estatística com one-way ANOVA test. ( $p \leq 0,05$ ; N=3)

Ao serem cultivados com inibidores das caspases houve uma redução da gravidade das lesões da cartilagem na OA. Observou-se um aumento da expressão de *Zfp3611* nos que tinham inibidores da caspase. (Figura 42 A.) Após inibição da apoptose dos condroblastos observa-se diminuição da expressão de *HIF1  $\alpha$* , efeito oposto ao da expressão de *Zfp3611* (Figura 42 B).

## **CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO**

## CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO

### 4.1. Discussão dos resultados

O objetivo deste estudo é avaliar os valores de expressão do gene *ZFP36L1* disponíveis em vários estudos da base de dados GEO num contexto de osteoartrite e osteoporose, assim como durante o processo de diferenciação de osteoblastos, osteoclastos e condrócitos. Também procuramos estudar, através de ferramentas bioinformáticas, os principais domínios codificados pelo gene da proteína ZFP36L1 e prever a presença de locais de fosforilação, glicosilação (N-glicosilação e O-glicosilação) e localização subcelular. Relativamente à conservação do gene e da proteína procuramos perceber nível de relação filogenética das sequências de nucleótidos que codificam a proteína ZFP36L1(ORF) para várias espécies de vertebrados.

Começou-se pela análise bioinformática dos domínios funcionais da proteína ZFP36L1, conservados através da evolução. ZFP36L1 tem dois domínios principais: TZF e CCR4-NOT [149]. O domínio TZF está envolvido na ligação a RNAs mensageiros específicos, e o domínio CCR4-NOT pode ser reconhecido pelo complexo XRN1 e LSM1-7, marcando-os para degradação [149]. A análise dos domínios TZF revelou que representam cerca de 22,48% da proteína (Figura 17) , foi possível observar que o domínio crítico de interação macromolecular CCH TZF no geral está altamente conservado, em que 90,77% dos aminoácidos estão 100% conservados neste domínio, apenas a 15ª posição está conservada a 64,86% e as restantes posições variam entre 86,78% e 97,29% em cada aminoácido desta sequência nas 37 espécies de vertebrados analisadas, e o domínio na extremidade C-terminal que é alvo de NOT1 no geral também está altamente conservado, variando entre 91,89% e 100% no mesmo alinhamento, o que significa que desempenham funções essenciais na proteína e que são herdados de um ancestral comum. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Blackshear and Perera que comparou os níveis de conservação de ratinho, peixes cartilagosos como a *Leucoraja erinacea* representando os peixes e raias, peixes cartilagíneos como *Lethenteron camtschaticum*, que contém pelo menos 3 sequências que codificam membros separados da família TTP em seu genoma, 1 das quais também é encontrada na lampreia marinha *Petromyzon marinus* peixes cordados como *Branchiostoma floridae*, cuja linhagem se pensa ter divergido da linhagem dos vertebrados há 500 milhões de anos.

Enquanto neste estudo se focaram em organismos aquáticos, a análise aqui descrita por nós permitiu verificar que ZFP36L1 está conservado em muitos mais grupos de inúmeras espécies, como vertebrados terrestres, incluindo mamíferos, marsupiais, répteis, aves, anfíbios, e invertebrados e o peixe pulmonar africano [66]. Foi descoberto que a sequência de todos os mamíferos aqui estudados no domínio NOT1, incluindo *Homo sapiens*, está totalmente conservada. No estudo de Blackshear and Perera foi analisada apenas uma sequência de *Danio Rerio*, enquanto aqui estudou-se as duas sequências, tendo-se descoberto que são 64,8% idênticos entre si (Tabela 3) [66]. Até à data ainda não há estudos referentes às espécies todas que foram analisadas neste estudo em relação ao domínio TZF. Em relação ao domínio CCR4-NOT, os resultados aqui obtidos também estão de acordo com o estudo de Blackshear and Perera, visto que está altamente conservado na sua maioria. Nos mamíferos o domínio TZF está totalmente conservado, e a espécie menos conservada é o peixe pulmonado africano (Figura 18) [66]. Assim como os resultados de destes autores, estes resultados também sugerem que ZFP36L1 na maioria destas espécies, se não em todas, surgiu de uma proteína ancestral que continha locais de ligação a RNA e a NOT1, podendo ter estado presente num organismo ancestral há já 1,5 mil milhões de anos [66]. Segundo alguns estudos este domínio é perdido em plantas e fungos [66].

Posteriormente procedeu-se à análise filogenética destas 37 espécies. A árvore filogenética obtida nos resultados é o resumo de três árvores independentes obtidas por 3 métodos estatísticos distintos. Como o peixe-zebra é um dos modelos básicos de análise biomédica, procedeu-se à análise dos genes *Zfp3611a* e *Zfp3611b* de modo a analisar qual é filogeneticamente mais próximo, tendo-se chegado à conclusão que *Zfp3611a* é ortólogo e *Zfp3611b* é parólogo; enquanto nas restantes espécies analisadas não se encontrou a duplicação genómica do peixe-zebra. Portanto, o peixe-zebra tem dois genes homólogos do gene *zfp3611* devido a uma duplicação ao longo da sua evolução [150].

*Homo sapiens* agrupa-se no grupo dos símios e no grande grupo dos mamíferos, tendo este grupo um grau de 100% por bootstrapping (Neighborjoining e Maximum Likelihood) e o valor de 1 para posterior probability. Esta árvore obtida está de acordo com o estudo de Tréguer *et al* no qual se descobriu que o gene *ZFP36L1* evoluiu de um só gene e que provavelmente *ZFP36L1* e *ZFP36L2* resultaram de um evento de duplicação durante a evolução [151]. Com a diferença que neste estudo só foi analisado *Homo sapiens*, ratinho e *Xenopus tropicalis*, enquanto nesta dissertação foram analisadas mais inúmeras espécies distintas. As ramificações terminais apresentaram elevado grau

de certeza. Apenas a ramificação entre a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) e o cão (*Canis familiaris*) e dentro do grupo dos felinos, apresentou um grau de 0,5684/51/61,2), pelo que, somente estas ramificações poderão não ser certas. É conhecido que os anfíbios e peixes expressam proteínas ortólogas de 3 proteínas TTP comuns de vertebrados. No entanto, no *Xenopus* não há ligação direta a um ortólogo mamífero. Segundo os autores “Belloc and Mendez, 2008” isto mostra que não existem sequências óbvias de ligação a NOT1 no extremo C-terminal, em contraste com os outros membros da família TTP destas espécies provavelmente porque se acumula na primeira metáfase meiótica e quando se perdeu, ocorreu paragem meiótica [66]. No entanto neste artigo mais recente, os autores Blackshear and Perera verificaram que o que foi dito anteriormente por estes autores estava errado, porém é algo que precisa ser melhor estudado [66].

Para prever a localização subcelular do ZFP36L1 utilizou-se os algoritmos Phobius, Deeploc 2.0 e *Nucleolar localization sequence detector* (NOD), que indicaram que não existe uma sequência de aminoácidos com probabilidade para ser péptido sinal para o RE (Figura 20). Depois previu-se que a localização deve ser no núcleo e no citoplasma (Tabela 4). Estando de acordo com Yuki Matsuura *et al* que refere que ZFP36L1 está presente no núcleo e no citoplasma, e este fato está de acordo com a noção que o decaimento de ARE-mediated mRNA representa um evento citoplasmático [152,153]. Foi descoberto também o domínio responsável pela translocação para o núcleo: “LDNSRRLPIFFSRLSISDD”, estando localizado entre os resíduos 320° e 338°, e que ZFP36L1 não se deverá localizar na região do nucléolo (Figura 21). Isto faz sentido uma vez que a ZFP36L1 é uma proteína de ligação ao RNA que desestabiliza vários transcritos de mRNA contendo elementos citoplasmáticos ricos em AU (ARE), promovendo a remoção ou degradação da cauda poli(A) e, portanto, fornece um mecanismo para atenuar a síntese de proteínas (que é produzida pelos ribossomas, que se encontram no RE e no citoplasma) [152].

A seguir previu-se os locais de fosforilação, tendo-se descoberto que a proteína ZFP36L1 humana tem 97 locais de fosforilação, incluindo a serina 334 assim como no estudo de Adachi *et al.*, e de acordo com o estudo de Rataj *et al* o número impressionante de potenciais locais de fosforilação na sequência ZFP36L1 sugere que a proteína tem de integrar múltiplos sinais para fornecer a resposta celular apropriada, sendo que AMPc orchestra todas as etapas que controlam a expressão e função da ZFP36L1, desde a ativação do promotor ZFP36L1 até a fosforilação da proteína ZFP36L1 [149,154]. Nesse estudo identificou-se dois locais de fosforilação da proteína quinase dependente de cAMP

(PKA) em células vivas, S54 e S334, e investigou-se o papel desses fosfatos no controle da semi-vida da proteína ZFP36L1 e na função no decaimento do mRNA [149]. Estes dados indicam que a fosforilação do S334 regula a estabilidade do ZFP36L1 e a sua capacidade de interagir com parceiros de ligação e de desencadear mRNA [154]. A relevância dos locais de fosforilação na proteína ZFP36L1 é fundamental para compreender a função e regulação dessa proteína no contexto de processos biológicos. A fosforilação é um processo pós-traducional em que grupos fosfato são adicionados a resíduos de aminoácidos específicos dentro de uma proteína. Esses grupos fosfato são frequentemente adicionados a resíduos de serina, treonina ou tirosina, resultando em fosforilação de serina (Ser), treonina (Thr) ou tirosina (Tyr). Sendo fundamental para a regulação da atividade: A fosforilação pode ativar ou inativar uma proteína, alterando a sua conformação tridimensional e, conseqüentemente, a sua atividade funcional [155].

Posteriormente para verificar a probabilidade dos resíduos serem N-glicosilados, identificou-se que os resíduos de glicosilação para a ZFP36L1 estão na posição 25 (NYS) e 111 (NSS) da sequência de aminoácidos. Sendo que N representa a asparagina para ser glicosilada e as outras duas letras a sequência Asn-Xaa-Ser/Thr, sendo este um local de N-glicosilação previsto, onde Xaa é qualquer resíduo de aminoácido [156]. A N-glicosilação da proteína ZFP36L1 pode ter várias implicações na regulação da sua função, estabilidade, localização e capacidade de interagir com outros componentes celulares. No entanto não foi possível identificar nenhum estudo funcional que mostrar a função destas alterações pós-tradução. O entendimento dessas modificações pós-traducionais é fundamental para compreender completamente o papel da ZFP36L1 na regulação pós-transcricional da expressão gênica e sua contribuição para processos biológicos específicos.

Em relação à O-glicosilação, foram identificados 18 sítios de glicosilação com score maior que 0,8 e 29 sítios glicosilados com score entre 0,5 e 0,8; o que significa que na proteína ZFP36L1 existem resíduos de aminoácidos que possuem grupos hidroxila (-OH), como serina (Ser) ou treonina (Thr), que são alvos potenciais para a adição de grupos de açúcares (glicanos). Sabe-se que alterações de glicosilação são uma característica comum de diversos cenários de doenças. Estas alterações podem ter origem genética, como no caso das doenças congênitas da glicosilação, ou resultar da desregulação da maquinaria biossintética dos glicanos em resposta à inflamação, infecção e/ou transformação oncogénica [157]. A O-glicosilação aberrante é frequentemente observada no cancro e está associada à agressividade do tumor e ao mau resultado clínico

dos pacientes [157]. O fato de ZFP36L1 ter muitos sítios de o-glicosilação significa que pode desempenhar um papel importante na regulação da sua função e atividade biológica, sendo reconhecido como o gene supressor de tumores [158]. A O-glicosilação pode influenciar a atividade e a função das proteínas no citoplasma e núcleo, alterando as suas propriedades físicas e químicas. Pode, por exemplo, afetar a estabilidade, interações com outras proteínas, capacidade de ligação ao DNA ou à cromatina e localização subcelular; pode também afetar a localização subcelular das proteínas, direcionando-as para compartimentos específicos dentro do citoplasma ou núcleo. Isto pode influenciar a sua função e interações com outros componentes celulares, no entanto não existem estudos publicados sobre o assunto.

Procurou-se identificar SNPs que estivessem correlacionados com o gene *ZFP36L1*, tendo-se encontrado 2 SNPs: rs12434551 e rs3825568 (Tabela 7). Estes dois SNPs podem contribuir para a Artrite reumatóide sistêmica juvenil e há evidências de que estão relacionados um com o outro (Tabela 8). Estes dados confirmam o fato de poderem contribuir para a AIJ, estando de acordo com o estudo de Jiang *et al* [159].

Por fim, procedeu-se à análise de vários estudos contendo o gene *ZFP36L1* no contexto de OP e OA. Com base no estudo realizado pelo grupo de investigação [146], procurou-se analisar a expressão de *Zfp36l1* tendo em conta que uma dieta enriquecida com ferro por 3 meses em que ratinhos Hfe-KO apresentavam um fenótipo semelhante à osteoporose como consequência do excesso de ferro e os ratinhos WT revelaram transitoriamente um fenótipo que levou ao favorecimento da formação de massa óssea em ratinhos Hfe-WT (com dieta rica em ferro) [146]. Ocorreu aumento de *Zfp36l1* em ratinhos Hfe-KO com dieta rica em ferro, acompanhado por perda de osso, enquanto nos ratinhos Hfe-WT houve diminuição de *Zfp36l1* acompanhado por favorecimento de formação óssea (Figura 25). Estes dados sugerem que em condições de OP, *Zfp36l1* estará aumentado, enquanto em condições de ganho de osso, *Zfp36l1* estará diminuído.

Começou-se por identificar os estudos adequados obtidos através da base de dados online com os transcritos de *ZFP36L1* de *Mus musculus*, *Rattus Norvegicus*, *Danio rerio* e *Homo sapiens*. Após compilar os estudos, organizou-se consoante o seu objetivo e etiologia.

No contexto de diferenciação de osteoblastos, ao analisar a média do logaritmo *fold change* das experiências, verifica-se um aumento da expressão de *Zfp36l1* desde que estão no estadio de células mesenquimais até se tornarem pré-osteoblastos e posteriormente, a expressão deste gene mantém-se. Isto está de acordo com o que era

esperado observar, uma vez que *Zfp3611* promove a diferenciação osteoblástica [80]. Em relação ao gene *Hif1a*, verifica-se também um aumento da sua expressão, estando de acordo com o estudo de Hui Kang *et al* que refere *Hif1a* é regulado por *Opg*, que por sua vez, para além de aumentar a angiogénese ou a atividade osteoblástica, a ativação da atividade hipoxia/*Hif1a* promove o desenvolvimento do osso e poderá também influenciar o acoplamento de osteoclastos e osteoblastos, e assim “amortece” a ativação dos osteoclastos [160]. No pico de expressão de *Zfp3611*, há uma diminuição de *Hif1a*, o que sugere regulação por *Zfp3611*. Em relação ao *Runx2*, há uma diminuição inicial e quando se tornam osteoblastos imaturos há um aumento, estando de acordo com o estudo *Toshihisa Komori* de que diz que *Runx2* induz a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos imaturos. (Figura 26, A, B e C) [147].

Posteriormente, para confirmar estes resultados, analisaram-se mais estudos em que há ocorrência de diferenciação osteoblástica. Num estudo realizado em Humanos, o GSE148203, há aumento de *ZFP36L1* e *RUNX2*, estando de acordo com o que foi dito anteriormente, ou seja *ZFP36L1* promove a diferenciação osteoblástica e *RUNX2* induz a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos imaturos (explicando o aumento dos 0 para os 3 dias) (Figura 27 A e B) [147,160].

A seguir no estudo GSE174794 comparou-se a expressão de *ZFP36L1* durante a diferenciação de células mesenquimais em adipócitos e osteoblastos, tendo-se verificado uma diminuição da expressão de *ZFP36L1* nos adipócitos ao longo do tempo e um aumento da expressão deste gene nos osteoblastos ao longo do tempo, o que confirma o fato de *ZFP36L1* poder estar envolvido no processo de diferenciação osteoblástica (aumento de *ZFP36L1* nos osteoblastos) e inibir a diferenciação de adipócitos (diminuição de *ZFP36L1* nos adipócitos) (Figura 28 A e B) [80].

De seguida analisou-se a expressão dos genes *Zfp3611*, *Acp5*, *Rankl*, *Opg*, a razão *Opg:Rankl* em 4 estudos de osteoporose *in vivo*. Verificou-se um aumento da expressão de *Zfp361* em ratinhos e ratas ovariectomizadas no estudo GSE214645 (figura 29A). A ovariectomia é um procedimento cirúrgico em que os ovários são removidos, resultando na perda dos hormonas sexuais femininas, como o estrogénio. Essa perda hormonal está associada a uma diminuição na densidade mineral óssea e à osteoporose em ratas, que é uma condição caracterizada pela fragilidade dos ossos e um aumento no risco de fraturas [18]. Quando os níveis de estrogénio caem após a ovariectomia, podem ocorrer alterações na expressão genética, incluindo aquelas reguladas por *ZFP36L1*, que podem influenciar negativamente a saúde óssea. O estrogénio também é conhecido por

regular positivamente a sinalização da BMP, que promove a diferenciação de células estaminais mesenquimais de pré-osteoblastos para osteoblastos, em vez de adipócitos [18]. Além disso, os estrogénios estimulam a produção de IGF1 e TGF $\beta$  pelos osteoblastos, melhorando a formação óssea [18]. O fato de *Zfp3611* estar aumentado em ratas ovariectomizadas está de acordo com o estudo de Chu-Han Cheng *et al* que explica que a deficiência de estrogénio alterará a expressão dos genes alvo do estrogénio, aumentando a secreção de *IL-1*, *IL-6* e *fator de necrose tumoral (TNF)* (que por sua vez são alvos da regulação negativa por ZFP36L1) e esta deficiência de estrogénio leva a aumento da renovação óssea e ao aumento da reabsorção óssea, o que resulta em osteoporose [18].

Em relação ao gene *ACP5*, este é um importante regulador da função dos osteoclastos e quando a atividade dos osteoclastos é desregulada, pode resultar em uma perda excessiva de densidade mineral óssea, levando à osteoporose. Em contextos de osteoporose, a expressão do gene *ACP5* pode estar aumentada, o que significa que pode haver uma maior produção da enzima TRAP pelos osteoclastos. Isso contribui para a atividade excessiva dos osteoclastos e a reabsorção óssea aumentada [161]. *ACP5* foi visto como um marcador para a atividade dos osteoclastos.

O estrogénio regula *RANKL* e *OPG*, promovendo a expressão de *OPG* e reduzindo assim a reabsorção óssea. Além disso, o estrogénio inibe a diferenciação dos osteoclastos e defende a apoptose dos osteoclastos, aumentando a produção de TGF $\beta$  [19]. No estado de deficiência de estrogénio, a expressão de *RANKL* é induzida, o que leva à osteoclastogênese (há uma diminuição mais acentuada de *OPG* do que *RANKL*), daí haver uma razão *RANKL/OPG* inferior a 1 [18]. O mesmo se passa no estudo GSE30081 (Figura 30).

No seguinte estudo (GSE35959) verifica-se um aumento da expressão de todos os genes em idosos com osteoporose e, quando comparado com as células senescentes, estas apresentam uma diminuição da expressão de todos os genes exceto *OPG* (Figura 31). O fato de *ZFP36L1* estar diminuído em células senescentes está de acordo com o estudo de Kuo-Yun Tseng *et al* em que foi demonstrado que *ZFP36L1* degrada os transcritos de numerosos componentes do fenótipo secretor associado à senescência (*SASP*) que, de outra forma, aumentam a senescência, o que indica um papel regulador do *ZFP36L1* na senescência, e que a regulação negativa (*down-regulation*) de *Zfp36L1* pode contribuir para o desenvolvimento do fenótipo de senescência em bmMSCs (Figura 31 A) [80]. A expressão de *ZFP36L1* apresenta-se aumentada em pacientes idosos com osteoporose, o

que está também de acordo com o estudo de Kuo-Yun Tseng *et al* que sugere que *ZFP36L1* poderá atuar como um intensificador da diferenciação osteoblástica (Figura 30 A) [80]. Nos pacientes idosos sem OP, ocorre o oposto porque, como não têm OP, *ZFP36L1* não está aumentado (Figura 31 A). A análise da expressão de ACP5, OPG e RANK-L não tem significado biológico neste contexto porque os autores apenas analisaram a expressão genética em células do mesênquima e não num contexto *in vivo*, sugerindo que *ZFP36L1* possa servir de marcador molecular para a indução da diferenciação de osteoblastos num contexto patológico de osteoporose. Posteriormente no estudo GSE194301 os autores desenvolveram peixes-zebra com o fenótipo de osteoporose, analisou-se a expressão as duas isoformas (*Zfp3611a* e *Zfp3611b*) de *Zfp3611* do peixe-zebra, tendo-se verificado um aumento em todas as condições, mas sem significado estatístico, mostra a mesma tendência de estudos descritos anteriormente mas são necessários mais estudos em modelos semelhantes para confirmar estes resultados. O que indica que ambas as isoformas poderão ter emergido de *Zfp3611*, visto que têm a mesma ação que *Zfp3611* na osteoporose (mecanismo como já foi descrito anteriormente) (Figura 32 A e B).

A seguir analisou-se a expressão de *Zfp3611* num contexto de excesso de osso. Começou-se por analisar o estudo GSE154800, tendo-se verificado uma diminuição da expressão de *Zfp3611* nos ratinhos DTRADQ quando comparados com os do tipo selvagem (*wild type*) (Figura 33). Estes resultados estão de acordo com o estudo de Zou *et al* que diz que a “remoção” de tecido adiposo leva à osteoesclerose (aumento da densidade óssea) e com o estudo de Tseng *et al* que refere que *ZFp3611* promove a diferenciação osteoblástica mas reprime a diferenciação adipogénica [80,162]. Foi possível verificar que há formação de novo osso nos grupos DTR e começa a estabelecer-se uma diferença significativa e que não existe efeito sinérgico entre o tempo e os diferentes grupos de ratinhos, ou seja, não interferem um no outro (o tempo é uma variável independente dos grupos e vice-versa) e a expressão de *Zfp3611* apresenta-se diminuída (Figura 33).

De seguida analisou-se no contexto de diferenciação dos osteoclastos, no estudo GDS5464 verificou-se que a expressão de *Zfp3611* está diminuída em osteoclastos sem o fator de transcrição NFATc1 (Figura 34). NFATc1 é um regulador mestre da diferenciação de osteoclastos induzida por RANKL e desempenha um papel fundamental na fusão e ativação de osteoclastos através da regulação positiva de vários genes responsáveis pela adesão, migração, acidificação e degradação da matriz óssea inorgânica

e orgânica dos osteoclastos [163], no estudo GSE138324 analisou-se a transição de osteoclastos com BMDM (*bone marrow-derived macrophages*), desde BMDMs até osteoclastos maduros. Os osteoclastos são células altamente especializadas derivadas da linhagem monócito/macrófago da medula óssea (Figura 35 A). A sua capacidade única de reabsorver as matrizes ósseas orgânicas e inorgânicas significa que desempenham um papel fundamental na regulação da remodelação esquelética [164]. Juntos, os osteoblastos e os osteoclastos são responsáveis pelo processo de acoplamento dinâmico que envolve tanto a reabsorção óssea como a formação óssea, agindo em conjunto para manter o esqueleto normal durante a saúde e a doença [164]. Como principal célula de reabsorção óssea do corpo, as alterações na diferenciação ou função dos osteoclastos podem resultar em efeitos profundos no corpo [164]. As doenças associadas à função alterada dos osteoclastos podem variar em gravidade, desde doença neonatal letal devido à incapacidade de formar um espaço medular para hematopoiese, até patologias mais comumente observadas, como a osteoporose, na qual a reabsorção óssea osteoclástica excessiva predispõe à formação de fraturas [164]. Há uma diminuição de *Zfp3611* do 1º ao 5º dia, e principalmente no 1º dia. O que é de esperar visto que quando há reabsorção óssea osteoclástica excessiva, há diminuição de *Zfp3611*.

O estudo GSE176265 foi realizado com o objetivo de descrever as alterações na expressão de genes associados à O-GlcNAcilação. Verificou-se uma diminuição da expressão de *Zfp3611* (Figura 36). Mudanças dinâmicas na O-GlcNAcilação regulam a diferenciação dos osteoclastos e a perda óssea via nucleoporina 153 [165].

Em conjunto, estes resultados sugerem que sem NFATc1 os osteoclastos não se diferenciam, se não há diferenciação dos osteoclastos, há menos destruição de osso, há mais osso, pelo que *Zfp3611* encontra-se diminuído [163], sugerindo que *zfp3611* poderá não ter um papel na diferenciação dos osteoclastos mas sim mas sim como regulador da inflamação pois resultados de outras experiências mostraram uma diminuição de *zfp3611* num contexto de diferenciação terminal, sendo *Zfp3611* regulador de mediadores pró-inflamatórios, logo a sua inibição poderá fazer sentido neste contexto.

No estudo GSE166559 analisaram-se monócitos humanos CD14-positivos que foram nucleofectados com siRNAs controlos ou específicos para LSD1 e cultivados com estimulação M-CSF (20 ng/ml) e *RANKL*, tendo-se verificado uma diminuição de *ZFP36L1*, estando de acordo com o estudo de Chen *et al* que diz que *Zfp3611* promove a diferenciação de monócitos (Figura 37) [166]

Em relação à expressão de *Acp5* como marcador para os osteoclastos (Figura 35B), os resultados obtidos são os esperados porque, como foi dito anteriormente, segundo o estudo de Hayman AR *et al* em contextos de osteoporose, a expressão do gene *ACP5* pode estar aumentada, o que significa que pode haver uma maior produção da enzima TRAP pelos osteoclastos. Isso contribui para a atividade excessiva dos osteoclastos e a reabsorção óssea aumentada [161].

De seguida analisou-se o estudo GSE54216, onde se verificou que na cartilagem articular houve uma diminuição da expressão de *Zfp3611* na zona intermédia/profunda, e houve também uma diminuição ainda mais acentuada na região hipertrófica da placa de crescimento (Figura 38). A placa de crescimento é constituída por condrócitos. Como foi dito anteriormente, quando há uma diminuição acentuada de *Zfp3611*, há diferenciação terminal de condrócitos hipertróficos [84]. No processo de transição entre cartilagem articular e cartilagem mineralizada, *Zfp3611* parece ser menos relevante semelhante ao que se observou nos ratinhos com excesso de osso.

Posteriormente analisou-se a expressão de *Zfp3611* no contexto de osteoartrose em quatro estudos distintos. No primeiro estudo (GSE176199) os autores analisaram o RNA-seq de condrócitos osteoartríticos, células estromais de cartilagem normal e células estromais mesenquimais de cartilagem osteoartrítica. A partir daí, analisou-se a expressão de *Zfp3611*, de modo a relacionar com a inflamação na cartilagem verificando-se um aumento na expressão deste gene (Figura 39 A). Estes resultados estão de acordo com os autores Son *et al* que referem que a *downregulation* de *Zfp3611* é suficiente para inibir a osteoartrose em ratos [84]. *ZFP36L1* parece regular múltiplos fatores responsáveis pela mediação da erosão da cartilagem, formação de osteófitos e esclerose óssea subcondral (enquanto alvos a jusante do *HSPA1A* regulam mediadores da destruição da cartilagem) [84].

Posteriormente analisou-se a expressão de *HSPA1A* e *HSPA1B* tendo-se verificado diminuição da expressão destes genes. *HSPA1A* e *HSPA1B* pertencem à família da proteína Hsp70 (*heat shock protein 70*). Os resultados estão de acordo com o estudo de Son *et al* que refere que o knockdown de *Zfp3611* aumenta a expressão de mRNA de dois membros da família da proteína de choque térmico 70 (HSP70), que atuam como seus alvos diretos [84]. Além disso, a superexpressão de *HSPA1A* em tecidos articulares protege ratinhos contra a OA experimental, inibindo a apoptose de

condrócitos, indicando que a proteína de ligação ao RNA, ZFP36L1, regula os membros da família HSP70 que parecem proteger contra a patogénese da OA, inibindo a apoptose dos condrócitos [84].

Também se analisou a expressão de *Hif1a*. Os condrócitos existem no meio hipóxico e *Hif1a* tem um papel vital na regulação da resposta à hipoxia [167]. O *Hif1a* responde à diminuição da oxigenação celular no tecido, regulando a sobrevivência e a interrupção do crescimento dos condrócitos [167]. Observou-se um aumento da expressão de *Hif1a* em todas as condições. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Zeng *et al* que diz que o *Hif1a* poderia proteger a cartilagem articular, promovendo o fenótipo dos condrócitos, mantendo a viabilidade dos condrócitos e apoiando a adaptação metabólica em condições hipóxicas [167]. A estabilização do *Hif1a* aumenta a diferenciação condrogénica das células progenitoras e minimiza a hipertrofia dos condrócitos [167]. Os resultados sugerem que há regulação de *Hif1a* por *Zfp3611* pois quando CSCOA diminui e CondOA aumenta em *Zfp3611*, o oposto ocorre em *Hif1a* (Figura 39 A e B).

Por último analisou-se a expressão de *Cd47*, tendo-se verificado uma diminuição da expressão deste gene em células estromais mesenquimais de cartilagem osteoartrítica e um aumento em condrócitos osteoartríticos. Isto está de acordo com os autores Wang *et al* pois segundo estes *CD47* promove a patogénese da osteoartrose, promovendo a expressão de mediadores inflamatórios e degradativos em condrócitos, macrófagos e sinoviócitos (o que explica o aumento de *Cd47* em condrócitos osteoartríticos) e há um *breakdown* da cartilagem, o que explica a diminuição da expressão de *Cd47* nas células estromais mesenquimais de cartilagem osteoartrítica [168]. Estas descobertas sugerem que os efeitos combinados do aumento de ligantes como resultado de danos à cartilagem, bem como o aumento da expressão de  $\alpha V\beta 3$  e *CD47*, podem permitir que as células dentro das articulações da OA provoquem respostas patogénicas e, assim, impulsionem a progressão da OA [168]. Além disso, o desenvolvimento de OA pode resultar da sinalização crónica de mediadores inflamatórios e degradadores como resultado do aumento dos níveis de componentes ligantes e recetores após lesão articular [168].

Posteriormente no estudo GSE6119 verificou-se aumento da expressão de *Zfp3611* apenas nas condições que tinha *IL-1B*, sendo este estudo realizado em condrócitos (Figura 40). Através do estudo de Vincent é possível concluir que *IL-1B* provocou um fenótipo parecido à osteoartrose [169]. Assim sendo, como já foi descrito anteriormente, faz sentido que num fenótipo de OA *Zfp3611* encontre-se aumentado enquanto que em

condições normais não [84].O mesmo se passa com os restantes genes analisados, como foi descrito no estudo anterior.

No estudo GSE173637, *Zfp3611* encontra-se aumentado nos que têm displasia de desenvolvimento da anca, estando de acordo com o estudo de Zengini *et al* visto que esta é considerada uma osteoartrose secundária e sendo de esperar resultados semelhantes aos dos outros estudos no contexto de osteoartrose para os restantes genes (Figura 41) [170].

Por último, no contexto de condroblastos submetidos à inibição geral de caspase FMK e OPH, avaliou-se a expressão de *Zfp3611* e *Hif1a* no estudo GSE164835. Ao serem cultivados com inibidores das caspases houve uma redução da gravidade das lesões da cartilagem na OA. Observou-se um aumento da expressão de *Zfp3611* nos que tinham inibidores da caspase (Figura 41 A). Estes resultados estão de acordo com o estudo de Saini *et al* que diz que elevado *Zfp3611* aumenta a atividade das caspases [171]. Assim, a inibição das caspases com fármacos é independente da expressão de *Zfp3611* ou pode revelar mecanismo de compensação.

Após inibição da apoptose dos condroblastos observa-se diminuição da expressão de *HIF1  $\alpha$* , efeito oposto ao da expressão de *Zfp3611* (Figura 42 B). Estando de acordo com o estudo de Zhao *et al* que refere que a hipóxia aumentou a expressão de HIF-1 $\alpha$  e aumentou a apoptose celular, diminuiu a viabilidade celular e os níveis de expressão de *COL1A1* [172]. Os inibidores de caspase-8 e -9 reduziram parcialmente a apoptose de hUSLF. O tratamento com *HIF-1 $\alpha$*  aumentou a ativação de caspase-3, caspase-8 e caspase-9, todas revertidas por knockdown de *HIF- 1A* [172]. Ou seja *HIF-1 $\alpha$*  induz significativamente a apoptose de hUSLFs através do recetor de morte celular e das vias de apoptose associadas à mitocôndria (Figura 42) [172].



## **CAPÍTULO 5: CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS**

## Capítulo 5: Conclusão e perspectivas futuras

### 5.1. Conclusão

Através da análise bioinformática é possível concluir que os dois principais domínios de *Zfp361l* são altamente conservados. Nos mamíferos o domínio TZF está totalmente conservado, o que sugere que *ZFP36L1* na maioria destas espécies surgiu de uma proteína ancestral que continha locais de ligação a RNA e a NOT1, podendo ter estado presente num organismo ancestral. O domínio NOT1 nos mamíferos também está totalmente conservado. A análise filogenética permitiu concluir que *Zfp361la* é ortólogo e *Zfp361lb* do peixe-zebra é parólogo. *ZFP36L1* está presente no núcleo e no citoplasma. O domínio responsável pela translocação para o núcleo é “LDNSRRLPIFFSRLSISDD”, estando localizado entre os resíduos 320° e 338° e não se localiza no nucléolo. *ZFP36L1* tem 97 locais de fosforilação. Em relação à O-glicosilação, foram identificados 18 sítios de glicosilação com score maior que 0,8 e 29 sítios glicosilados com score entre 0,5 e 0,8.

Em condições de OP, *Zfp361l* estará aumentado e em condições de elevada DMO, *Zfp361l* estará diminuído. *Zfp361l* promove a diferenciação osteoblástica e *Runx2* e induz a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos imaturos por isso no contexto de osteoblastos há aumento de *Zfp361l* e aumento de *Runx2*, e *Hif1a* é regulado por *Opg*, que por sua vez, aumentará a angiogénese ou a atividade osteoblástica (por isso *Hif1a* é sobreexpresso). Em adipócitos a expressão de *ZFP36L1* diminuiu ao longo do tempo e nos osteoclastos aumenta longo do tempo, pois *ZFP36L1* poder estar envolvido no processo de diferenciação osteoblástica (aumento de *ZFP36L1* nos osteoblastos) e inibir a diferenciação de adipócitos (diminuição de *ZFP36L1* nos adipócitos). *Zfp361l* está mais expresso em ratas ovariectomizadas. *Zfp361l* está diminuído em células senescentes, *ZFP36L1* degrada os transcritos de *SASP* que, de outra forma, aumentam a senescência, ou seja *ZFP36L1* tem um papel regulador na senescência, e a regulação negativa (*down-regulation*) de *Zfp361l* pode contribuir para o desenvolvimento do fenótipo de senescência. No processo de transição entre a cartilagem articular e cartilagem mineralizada, *Zfp361l* parece ser menos relevante.

No contexto de AO *Zfp361l* encontra-se aumentado e a *downregulation* de *Zfp361l* é suficiente para inibir a osteoartrose em ratos, enquanto *HSPA1A* e *HSPA1B* encontram-se diminuídos pois *ZFP36L1*, regula os membros da família HSP70 que parecem proteger contra a patogénese da OA, inibindo a apoptose dos condrócitos. *Hif1a* por sua vez

aumenta a sua expressão, aumentando a diferenciação condrogénica das células progenitoras e minimizando a hipertrofia dos condrócitos. Os resultados sugerem que há regulação de *Hif1a* por *Zfp3611* (pois quando CSCOA diminui e CondOA aumenta em *Zfp3611*, o oposto ocorre em *Hif1a*). Por último há aumento da expressão de *Zfp3611* em condroblastos submetidos à inibição geral de caspase FMK e OPH. A inibição das caspases com fármacos é independente da expressão de *Zfp3611* ou pode revelar mecanismo de compensação. Há diminuição de *Hif1a* neste contexto pois *Hif1a* induz significativamente a apoptose de hUSLFs através do recetor de morte celular e das vias de apoptose associadas à mitocôndria.

## 5.2. Perspetivas futuras

Futuramente, serão necessários mais estudos *in vivo* em pacientes com OP e OA em tecidos de osso, e *in vitro* de modo a perceber se pode-se inibir a diferenciação terminal dos osteoclastos, entender se realmente Zfp3611 é independente da inibição das caspases, entender a função de *Zfp3611* específica através dos resultados aqui descritos e outros que serão futuramente obtidos, se a ZFP36L1 promove função dos grânulos de TIS. Perceber se a expressão das duas isoformas do peixe-zebra aumenta num contexto de osteoporose como os resultados analisados nesta dissertação sugerem. É de notar que os resultados aqui obtidos são apenas uma pequena amostra, pelo que são necessários mais estudos tanto *in vivo* como *in vitro* para compreender todos os mecanismos aqui descritos.

## CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS

1. Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *CJASN*. 2008;3: S131–S139. doi:10.2215/CJN.04151206
2. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone Remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1092: 385–396. doi:10.1196/annals.1365.035
3. Grabowski P. Physiology of Bone. In: Allgrove J, Shaw NJ, editors. *Endocrine Development*. S. Karger AG; 2015. pp. 33–55. doi:10.1159/000380991
4. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem*. 2006;99: 1233–1239. doi:10.1002/jcb.20958
5. Sudhakar S, Katz MS, Elango N. Analysis of Type-I and Type-II RUNX2 Protein Expression in Osteoblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001;286: 74–79. doi:10.1006/bbrc.2001.5363
6. Becker C. Pathophysiology and Clinical Manifestations of Osteoporosis. *Clinical Cornerstone*. 8: 9.
7. Manolagas SC, Jilka RL. Bone Marrow, Cytokines, and Bone Remodeling — Emerging Insights into the Pathophysiology of Osteoporosis. Epstein FH, editor. *N Engl J Med*. 1995;332: 305–311. doi:10.1056/NEJM199502023320506
8. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*. 2015;2015: 1–17. doi:10.1155/2015/421746
9. Tresguerres FGF, Torres J, López-Quiles J, Hernández G, Vega JA, Tresguerres IF. The osteocyte: A multifunctional cell within the bone. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*. 2020;227: 151422. doi:10.1016/j.aanat.2019.151422
10. Boyce B, Yao Z, Xing L. Osteoclasts Have Multiple Roles in Bone in Addition to Bone Resorption. *Crit Rev Eukar Gene Expr*. 2009;19: 171–180. doi:10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v19.i3.10
11. Rosenberg N, Rosenberg O, Soudry M. Osteoblasts in Bone Physiology – Mini Review. *RMMJ*. 2012;3. doi:10.5041/RMMJ.10080
12. Zhang ZH, Jia XY, Fang JY, Chai H, Huang Q, She C, et al. Reduction of SOST gene promotes bone formation through the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway and compensates particle-induced osteolysis. *J Cell Mol Med*. 2020;24: 4233–4244. doi:10.1111/jcmm.15084
13. Sozen T, Ozisik L, Calik Basaran N. An overview and management of osteoporosis. *Eur J Rheumatol*. 2017;4: 46–56. doi:10.5152/eurjrheum.2016.048
14. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42: 551–555. doi:10.1016/j.injury.2011.03.031

15. Gonçalves MJ, Rodrigues AM, Canhão H, Fonseca JE. Osteoporosis: From Bone Biology to Individual Treatment Decision. *Acta Med Port.* 2013;26: 445–455. doi:10.20344/amp.4271
16. Clynes MA, Harvey NC, Curtis EM, Fuggle NR, Dennison EM, Cooper C. The epidemiology of osteoporosis. *British Medical Bulletin.* 2020; ldaa005. doi:10.1093/bmb/ldaa005
17. Shen Y, Huang X, Wu J, Lin X, Zhou X, Zhu Z, et al. The Global Burden of Osteoporosis, Low Bone Mass, and Its Related Fracture in 204 Countries and Territories, 1990-2019. *Front Endocrinol.* 2022;13: 882241. doi:10.3389/fendo.2022.882241
18. 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. *IJMS.* 2022;23: 1376. doi:10.3390/ijms23031376
19. Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *THE LANCET.* 2002;359: 8.
20. Boyanov M. Whole Body and Regional Bone Mineral Content and Density in Women Aged 20-75 years. *Acta Endo (Buc).* 2016;12: 191–196. doi:10.4183/aeb.2016.191
21. Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltsev N. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2009;9: 1137–1141. doi:10.1002/jbmr.5650090802
21. Kanis JA, Cooper C, Rizzoli R, Reginster J-Y. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2019;30: 3–44. doi:10.1007/s00198-018-4704-5
23. Steffens J, Herrera B, Coimbra L, Stephens D, Rossa Jr C, Spolidorio L, et al. Testosterone Regulates Bone Response to Inflammation. *Horm Metab Res.* 2014;46: 193–200. doi:10.1055/s-0034-1367031
24. Sipos W, Pietschmann P, Rauner M, Kersch-Schindl K, Patsch J. Pathophysiology of osteoporosis. *Wien Med Wochenschr.* 2009;159: 230–234. doi:10.1007/s10354-009-0647-y
25. Kohli S, Kohli V. Role of RANKL-RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications. *Indian J Endocr Metab.* 2011;15: 175. doi:10.4103/2230-8210.83401
26. Kohli S, Kohli V. Role of RANKL-RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications. *Indian J Endocr Metab.* 2011;15: 175. doi:10.4103/2230-8210.83401
27. Sozen T, Ozisik L, Calik Basaran N. An overview and management of osteoporosis. *Eur J Rheumatol.* 2017;4: 46–56. doi:10.5152/eurjrheum.2016.048

28. Eastell R, O'Neill TW, Hofbauer LC, Langdahl B, Reid IR, Gold DT, et al. Postmenopausal osteoporosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2: 16069. doi:10.1038/nrdp.2016.69
29. Kelsey JL. Special Topic: Risk Factors.
30. Pouresmaeili F, Kamali Dehghan B, Kamarehei M, Yong Meng G. A comprehensive overview on osteoporosis and its risk factors. *TCRM*. 2018;Volume 14: 2029–2049. doi:10.2147/TCRM.S138000
31. Tu KN, Lie JD, Wan CKV, Cameron M, Austel AG, Nguyen JK, et al. Osteoporosis: A Review of Treatment Options. : 13.
32. Raje N, Yee. Denosumab, a RANK ligand inhibitor, for the management of bone loss in cancer patients. *CIA*. 2012; 331. doi:10.2147/CIA.S14566
33. Hanley DA, Adachi JD, Bell A, Brown V. Denosumab: mechanism of action and clinical outcomes. *International Journal of Clinical Practice*. 2012;66: 1139–1146. doi:10.1111/ijcp.12022
34. Langdahl BL. Overview of treatment approaches to osteoporosis. *Br J Pharmacol*. 2021;178: 1891–1906. doi:10.1111/bph.15024
35. Tella SH, Gallagher JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2014;142: 155–170. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.09.008
35. Juneja P; Munjal A; Hubbard John B. Anatomy, Joints. In: *Anatomy, Joints* [Internet]. 26 Jul 2021 [cited 27 Sep 2022]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507893/>
37. Sarzi-Puttini P, Cimmino MA, Scarpa R, Caporali R, Parazzini F, Zaninelli A, et al. Osteoarthritis: An Overview of the Disease and Its Treatment Strategies. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2005;35: 1–10. doi:10.1016/j.semarthrit.2005.01.013
38. Pacifici M, Koyama E, Iwamoto M. Mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation: Recent advances, but many lingering mysteries. *Birth Defect Res C*. 2005;75: 237–248. doi:10.1002/bdrc.20050
39. Archer CW, Dowthwaite GP, Francis-West P. Development of synovial joints. *Birth Defect Res C*. 2003;69: 144–155. doi:10.1002/bdrc.10015
40. Bartley EJ, Palit S, Staud R. Predictors of Osteoarthritis Pain: the Importance of Resilience. *Curr Rheumatol Rep*. 2017;19: 57. doi:10.1007/s11926-017-0683-3
41. Allen KD, Thoma LM, Golightly YM. Epidemiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2022;30: 184–195. doi:10.1016/j.joca.2021.04.020
42. World Health Organization News. [cited 2 Aug 2023]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/osteoarthritis>

43. Veronese N, Cereda E, Maggi S, Luchini C, Solmi M, Smith T, et al. Osteoarthritis and mortality: A prospective cohort study and systematic review with meta-analysis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 2016;46: 160–167. doi:10.1016/j.semarthrit.2016.04.002
44. Martel-Pelletier J, Barr AJ, Cicuttini FM, Conaghan PG, Cooper C, Goldring MB, et al. Osteoarthritis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2: 16072. doi:10.1038/nrdp.2016.72
45. Acheson RM, Collart AB. New Haven survey of joint diseases. XVII. Relationship between some systemic characteristics and osteoarthrosis in a general population. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1975;34: 379–387. doi:10.1136/ard.34.5.379
44. Amoako AO, Pujalte GGA. Osteoarthritis in Young, Active, and Athletic Individuals. *Clinical Medicine Insights: Arthritis And Musculoskeletal Disorders* 2014;7: CMAMD.S14386. doi:10.4137/CMAMD.S14386
47. Jin H, Jiang S, Wang R, Zhang Y, Dong J, Li Y. Mechanistic Insight Into the Roles of Integrins in Osteoarthritis. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9: 693484. doi:10.3389/fcell.2021.693484
48. Abhishek A, Doherty M. Diagnosis and Clinical Presentation of Osteoarthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2013;39: 45–66. doi:10.1016/j.rdc.2012.10.007
49. Shane Anderson A, Loeser RF. Why is osteoarthritis an age-related disease? *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 2010;24: 15–26. doi:10.1016/j.berh.2009.08.006
50. Kean WF, Kean R, Buchanan WW. Osteoarthritis: symptoms, signs and source of pain. *Inflammopharmacology*. 2004;12: 3–31. doi:10.1163/156856004773121347
51. Hunter DJ, McDougall JJ, Keefe FJ. The Symptoms of Osteoarthritis and the Genesis of Pain. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2008;34: 623–643. doi:10.1016/j.rdc.2008.05.004
52. Sinusas K. Osteoarthritis: Diagnosis and Treatment. 2012;85: 8.
53. Brady SJ, Brooks P, Conaghan P, Kenyon LM. 7 Pharmacotherapy and osteoarthritis. *Baillière's Clinical Rheumatology*. 1997;11: 749–768. doi:10.1016/S0950-3579(97)80008-8
54. Zhang W, Robertson WB, Zhao J, Chen W, Xu J. Emerging Trend in the Pharmacotherapy of Osteoarthritis. *Front Endocrinol*. 2019;10: 431. doi:10.3389/fendo.2019.00431
55. Anderson BJ. Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. *Pediatric Anesthesia*. 2008;18: 915–921. doi:10.1111/j.1460-9592.2008.02764.x
56. Wienecke T, Gøtzsche PC. Paracetamol versus nonsteroidal anti-inflammatory drugs for rheumatoid arthritis. *Cochrane Musculoskeletal Group*, editor.

Cochrane Database of Systematic Reviews. 2004;2010.  
doi:10.1002/14651858.CD003789.pub2

57. Zarghi A, Arfaei S. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. 2011; 30.
58. Griswold DE, Adams JL. Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): Rationale for selective inhibition and progress to date. *Med Res Rev.* 1996;16: 181–206. doi:10.1002/(SICI)1098-1128(199603)16:2<181::AID-MED3>3.0.CO;2-X
59. Ghlichloo I GV. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs). [cited 27 Sep 2022]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31613522/>
60. Fanelli D, Weller G, Liu H. New Serotonin-Norepinephrine Reuptake Inhibitors and Their Anesthetic and Analgesic Considerations. *Neurology International.* 2021;13: 497–509. doi:10.3390/neurolint13040049
61. Hodgens A, Sharman T. Corticosteroids. [cited 27 Sep 2022]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32119499/>
62. Ensembl. In: Ensembl [Internet]. [cited 20 Jun 2023]. Available: <https://www.ensembl.org/index.html>
63. NCBI ZFP36L1 gene. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/677>
64. Suk F-M, Chang C-C, Lin R-J, Lin S-Y, Liu S-C, Jau C-F, et al. ZFP36L1 and ZFP36L2 inhibit cell proliferation in a cyclin D-dependent and p53-independent manner. *Sci Rep.* 2018;8: 2742. doi:10.1038/s41598-018-21160-z
65. Ciais D, Cherradi N, Feige J-J. Multiple functions of tristetraprolin/TIS11 RNA-binding proteins in the regulation of mRNA biogenesis and degradation. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70: 2031–2044. doi:10.1007/s00018-012-1150-y
66. Blackshear PJ, Perera L. Phylogenetic Distribution and Evolution of the Linked RNA-Binding and NOT1-Binding Domains in the Tristetraprolin Family of Tandem CCCH Zinc Finger Proteins. *Journal of Interferon & Cytokine Research.* 2014;34: 297–306. doi:10.1089/jir.2013.0150
67. Hau HH, Walsh RJ, Ogilvie RL, Williams DA, Reilly CS, Bohjanen PR. Tristetraprolin recruits functional mRNA decay complexes to ARE sequences. *J Cell Biochem.* 2007;100: 1477–1492. doi:10.1002/jcb.21130
68. Tian B, Manley JL. Alternative polyadenylation of mRNA precursors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18: 18–30. doi:10.1038/nrm.2016.116
69. Lai WS, Wells ML, Perera L, Blackshear PJ. The tandem zinc finger RNA binding domain of members of the tristetraprolin protein family. *WIREs RNA.* 2019;10. doi:10.1002/wrna.1531

70. Wells ML, Perera L, Blackshear PJ. An Ancient Family of RNA-Binding Proteins: Still Important! *Trends in Biochemical Sciences*. 2017;42: 285–296. doi:10.1016/j.tibs.2016.12.003
71. Makita S, Takatori H, Nakajima H. Post-Transcriptional Regulation of Immune Responses and Inflammatory Diseases by RNA-Binding ZFP36 Family Proteins. *Front Immunol*. 2021;12: 711633. doi:10.3389/fimmu.2021.711633
72. Galloway A, Turner M. Cell cycle RNA regulons coordinating early lymphocyte development. *WIREs RNA*. 2017;8: e1419. doi:10.1002/wrna.1419
73. Wang K-T, Wang H-H, Wu Y-Y, Su Y-L, Chiang P-Y, Lin N-Y, et al. Functional regulation of Zfp36l1 and Zfp36l2 in response to lipopolysaccharide in mouse RAW264.7 macrophages. *J Inflamm*. 2015;12: 42. doi:10.1186/s12950-015-0088-x
74. Desroches-Castan A, Cherradi N, Feige J-J, Ciaï D. A novel function of Tis11b/BRF1 as a regulator of *Dll4* mRNA 3'-end processing. Wickens MP, editor. *MBoC*. 2011;22: 3625–3633. doi:10.1091/mbc.e11-02-0149
75. Otsuka H, Fukao A, Tomohiro T, Adachi S, Suzuki T, Takahashi A, et al. ARE-binding protein ZFP36L1 interacts with CNOT1 to directly repress translation via a deadenylation-independent mechanism. *Biochimie*. 2020;174: 49–56. doi:10.1016/j.biochi.2020.04.010
76. Kaehler M, Dworschak M, Rodin JP, Ruemenapp J, Vater I, Penas EMM, et al. ZFP36L1 plays an ambiguous role in the regulation of cell expansion and negatively regulates CDKN1A in chronic myeloid leukemia cells. *Experimental Hematology*. 2021;99: 54-64.e7. doi:10.1016/j.exphem.2021.05.006
77. Ma W, Mayr C. A Membraneless Organelle Associated with the Endoplasmic Reticulum Enables 3'UTR-Mediated Protein-Protein Interactions. *Cell*. 2018;175: 1492-1506.e19. doi:10.1016/j.cell.2018.10.007
78. Ribeiro DM, Prod'homme A, Teixeira A, Zanzoni A, Brun C. The role of 3'UTR-protein complexes in the regulation of protein multifunctionality and subcellular localization. *Nucleic Acids Research*. 2020;48: 6491–6502. doi:10.1093/nar/gkaa462
79. Baou M, Jewell A, Murphy JJ. TIS11 Family Proteins and Their Roles in Posttranscriptional Gene Regulation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009;2009: 1–11. doi:10.1155/2009/634520
80. Tseng K-Y, Chen Y-H, Lin S. Zinc finger protein ZFP36L1 promotes osteoblastic differentiation but represses adipogenic differentiation of mouse multipotent cells. *Oncotarget*. 2017;8: 20588–20601. doi:10.18632/oncotarget.15246
81. Buphamalai P, Kokotovic T, Nagy V, Menche J. Network analysis reveals rare disease signatures across multiple levels of biological organization. *Nat Commun*. 2021;12: 6306. doi:10.1038/s41467-021-26674-1

82. Papadopoli D, Boulay K, Kazak L, Pollak M, Mallette F, Topisirovic I, et al. mTOR as a central regulator of lifespan and aging. *F1000Res*. 2019;8: 998. doi:10.12688/f1000research.17196.1
83. Reppe S, Olstad OK, Rian E, Gautvik VT, Gautvik KM, Jemtland R. Butyrate response factor 1 is regulated by parathyroid hormone and bone morphogenetic protein-2 in osteoblastic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;324: 218–223. doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.030
84. Son Y-O, Kim H-E, Choi W-S, Chun C-H, Chun J-S. RNA-binding protein ZFP36L1 regulates osteoarthritis by modulating members of the heat shock protein 70 family. *Nat Commun*. 2019;10: 77. doi:10.1038/s41467-018-08035-7
85. Pubmed. [cited 27 Sep 2022]. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
86. Katoh K. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*. 2002;30: 3059–3066. doi:10.1093/nar/gkf436
87. Posada D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*. 2008;25: 1253–1256. doi:10.1093/molbev/msn083
88. Rindskopf D. Overview of Bayesian Statistics. *Eval Rev*. 2020;44: 225–237. doi:10.1177/0193841X19895623
89. Yang S, De Angelis D. Maximum Likelihood. In: Reisfeld B, Mayeno AN, editors. *Computational Toxicology*. Totowa, NJ: Humana Press; 2013. pp. 581–595. doi:10.1007/978-1-62703-059-5\_24
90. Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 2001;17: 754–755. doi:10.1093/bioinformatics/17.8.754
91. Edler D, Klein J, Antonelli A, Silvestro D. raxmlGUI 2.0: A graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML. Matschiner M, editor. *Methods Ecol Evol*. 2021;12: 373–377. doi:10.1111/2041-210X.13512
92. Holmes S. Bootstrapping Phylogenetic Trees: Theory and Methods. *Statist Sci*. 2003;18. doi:10.1214/ss/1063994979
93. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 1987 [cited 11 Oct 2022]. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
94. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Battistuzzi FU, editor. *Molecular Biology and Evolution*. 2021;38: 3022–3027. doi:10.1093/molbev/msab120
95. Mulder NJ. Protein Domain Architectures. In: Carugo O, Eisenhaber F, editors. *Data Mining Techniques for the Life Sciences*. Totowa, NJ: Humana Press; 2010. pp. 83–95. doi:10.1007/978-1-60327-241-4\_5

96. Wang Y, Zhang H, Zhong H, Xue Z. Protein domain identification methods and online resources. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2021;19: 1145–1153. doi:10.1016/j.csbj.2021.01.041
97. Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, et al. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Research*. 2015;43: D222–D226. doi:10.1093/nar/gku1221
98. CDD - Conserved Domains and Protein Classification. [cited 17 Sep 2022]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>
99. Hunter S, Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, Bateman A, Binns D, et al. InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Research*. 2009;37: D211–D215. doi:10.1093/nar/gkn785
100. Interpro website. [cited 17 Sep 2022]. Available: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>
101. Portugaly E, Harel A, Linial N, Linial M. EVEREST: automatic identification and classification of protein domains in all protein sequences. *BMC Bioinformatics*. 2006;7: 277. doi:10.1186/1471-2105-7-277
102. EVEREST website. [cited 17 Sep 2022]. Available: <http://www.everest.cs.huji.ac.il/>
103. NCBI website. [cited 17 Sep 2022]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
104. Tippmann H-F. Analysis for free: Comparing programs for sequence analysis. *Briefings in Bioinformatics*. 2004;5: 82–87. doi:10.1093/bib/5.1.82
105. Scott MS, Troshin PV, Barton GJ. NoD: a Nucleolar localization sequence detector for eukaryotic and viral proteins. *BMC Bioinformatics*. 2011;12: 317. doi:10.1186/1471-2105-12-317
106. NOD Website. [cited 23 Mar 2023]. Available: <http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-nod/index.jsp>
107. NetNGlyc Website. [cited 4 May 2023]. Available: <https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetNGlyc-1.0/>
108. Hirata, T. K Y. N-Glycosylation. Available: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34495528/>
109. Chuang G-Y, Boyington JC, Joyce MG, Zhu J, Nabel GJ, Kwong PD, et al. Computational prediction of N-linked glycosylation incorporating structural properties and patterns. : 7. doi:10.1093/bioinformatics/bts426
110. O-glyc Website. [cited 5 May 2023]. Available: <https://www.hsls.pitt.edu/obrc/index.php?page=URL1043959855>
111. Hansen JE, Lund O, Tolstrup N, Gooley AA, Williams KL, Brunak S. NetOglyc: Prediction of mucin type O-glycosylation sites based on sequence context and surface accessibility. : 16. doi:10.1023/a:1006960004440

112. NetPhos Website. [cited 1 Jun 2023]. Available: <https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>
113. Jamal S, Ali W, Nagpal P, Grover A, Grover S. Predicting phosphorylation sites using machine learning by integrating the sequence, structure, and functional information of proteins. *J Transl Med.* 2021;19: 218. doi:10.1186/s12967-021-02851-0
114. Govindarajan R, Duraiyan J, Kaliyappan K, Palanisamy M. Microarray and its applications. *J Pharm Bioall Sci.* 2012;4: 310. doi:10.4103/0975-7406.100283
115. Gresham D, Dunham MJ, Botstein D. Comparing whole genomes using DNA microarrays. *Nat Rev Genet.* 2008;9: 291–302. doi:10.1038/nrg2335
116. Dahui Q. Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biol Med.* 2019;16: 4–10. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055
117. Malone JH, Oliver B. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *BMC Biol.* 2011;9: 34. doi:10.1186/1741-7007-9-34
118. NCBI GEO. [cited 17 Sep 2022]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>
119. GEO2R. [cited 17 Sep 2022]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>
120. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15: 550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8
121. Krotov V. A Quick Introduction to R and RStudio. 2017 [cited 24 Sep 2022]. doi:10.13140/RG.2.2.10401.92009
122. Irizarry RA. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* 2003;4: 249–264. doi:10.1093/biostatistics/4.2.249
123. Šašik R, Calvo E, Corbeil J. Statistical analysis of high-density oligonucleotide arrays: a multiplicative noise model. *Bioinformatics.* 2002;18: 1633–1640. doi:10.1093/bioinformatics/18.12.1633
124. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. *affy*—analysis of *Affymetrix GeneChip* data at the probe level. *Bioinformatics.* 2004;20: 307–315. doi:10.1093/bioinformatics/btg405
125. Kemp JP, Morris JA, Medina-Gomez C, Forgetta V, Warrington NM, Youlten SE, et al. Identification of 153 new loci associated with heel bone mineral density and functional involvement of GPC6 in osteoporosis. *Nat Genet.* 2017;49: 1468–1475. doi:10.1038/ng.3949
126. Liu J, Gan L, Ma B, He S, Wu P, Li H, et al. Alterations in chromatin accessibility during osteoblast and adipocyte differentiation in human

- mesenchymal stem cells. *BMC Med Genomics*. 2022;15: 17. doi:10.1186/s12920-022-01168-1
127. Zhou Q, He LL, Du LZ, Zhao NB, Lv CP, Liang JF. Impaired function of skeletal stem cells derived from growth plates in ovariectomized mice. *J Bone Miner Metab*. 2023;41: 163–170. doi:10.1007/s00774-023-01406-1
  128. Zhang J, Lazarenko OP, Blackburn ML, Shankar K, Badger TM, Ronis MJJ, et al. Feeding Blueberry Diets in Early Life Prevent Senescence of Osteoblasts and Bone Loss in Ovariectomized Adult Female Rats. Stadler K, editor. *PLoS ONE*. 2011;6: e24486. doi:10.1371/journal.pone.0024486
  129. Benisch P, Schilling T, Klein-Hitpass L, Frey SP, Seefried L, Raaijmakers N, et al. The Transcriptional Profile of Mesenchymal Stem Cell Populations in Primary Osteoporosis Is Distinct and Shows Overexpression of Osteogenic Inhibitors. Shi X-M, editor. *PLoS ONE*. 2012;7: e45142. doi:10.1371/journal.pone.0045142
  130. Guo W, Jin P, Li R, Huang L, Liu Z, Li H, et al. Dynamic network biomarker identifies cdkn1a-mediated bone mineralization in the triggering phase of osteoporosis. *Exp Mol Med*. 2023;55: 81–94. doi:10.1038/s12276-022-00915-9
  131. Aliprantis AO, Ueki Y, Sulyanto R, Park A, Sigrist KS, Sharma SM, et al. NFATc1 in mice represses osteoprotegerin during osteoclastogenesis and dissociates systemic osteopenia from inflammation in cherubism. *J Clin Invest*. 2008;118: 3775–3789. doi:10.1172/JCI35711
  132. Zhu L, Tang Y, Li X-Y, Keller ET, Yang J, Cho J-S, et al. Osteoclast-mediated bone resorption is controlled by a compensatory network of secreted and membrane-tethered metalloproteinases. *Sci Transl Med*. 2020;12: eaaw6143. doi:10.1126/scitranslmed.aaw6143
  133. Doi K, Murata K, Ito S, Suzuki A, Terao C, Ishie S, et al. Role of LYSINE-SPECIFIC Demethylase 1 in Metabolically Integrating Osteoclast Differentiation and Inflammatory Bone Resorption Through HYPOXIA-INDUCIBLE Factor 1 $\alpha$  and E2F1. *Arthritis & Rheumatology*. 2022;74: 948–960. doi:10.1002/art.42074
  134. Chau M, Lui JC, Landman EBM, Späth S-S, Vortkamp A, Baron J, et al. Gene Expression Profiling Reveals Similarities between the Spatial Architectures of Postnatal Articular and Growth Plate Cartilage. Marcu KB, editor. *PLoS ONE*. 2014;9: e103061. doi:10.1371/journal.pone.0103061
  135. Liu W, Brodsky AS, Feng M, Liu Y, Ding J, Jayasuriya CT, et al. Senescent Tissue-Resident Mesenchymal Stromal Cells Are an Internal Source of Inflammation in Human Osteoarthritic Cartilage. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9: 725071. doi:10.3389/fcell.2021.725071
  136. Gouze J-N, Gouze E, Popp MP, Bush ML, Dacanay EA, Kay JD, et al. [No title found]. *Arthritis Res Ther*. 2006;8: R173. doi:10.1186/ar2082
  137. Nakamura Y, Saitou M, Komura S, Matsumoto K, Ogawa H, Miyagawa T, et al. Reduced dynamic loads due to hip dislocation induce acetabular cartilage

- degeneration by IL-6 and MMP3 via the STAT3/periostin/NF- $\kappa$ B axis. *Sci Rep*. 2022;12: 12207. doi:10.1038/s41598-022-16585-6
138. Hudson BP, Martinez-Yamout MA, Dyson HJ, Wright PE. Recognition of the mRNA AU-rich element by the zinc finger domain of TIS11d. *Nat Struct Mol Biol*. 2004;11: 257–264. doi:10.1038/nsmb738
  139. Vaňáčová Š, Wolf J, Martin G, Blank D, Dettwiler S, Friedlein A, et al. A New Yeast Poly(A) Polymerase Complex Involved in RNA Quality Control. Zamore P, editor. *PLoS Biol*. 2005;3: e189. doi:10.1371/journal.pbio.0030189
  140. Phobius Website. [cited 4 Apr 2023]. Available: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/phobius/>
  141. Almagro Armenteros JJ, Sønderby CK, Sønderby SK, Nielsen H, Winther O. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. Hancock J, editor. *Bioinformatics*. 2017;33: 3387–3395. doi:10.1093/bioinformatics/btx431
  142. Deeploc 2.0. [cited 23 Mar 2023]. Available: <https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepLoc-2.0/>
  143. Sriram V, Willard CA, Liu J, Brutkiewicz RR. Importance of N-linked glycosylation in the functional expression of murine CD1d1. *Immunology*. 2007;0: 070831060847002-??? doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02696.x
  144. Breloy I, Hanisch F-G. Functional Roles of O-Glycosylation. *Molecules*. 2018;23: 3063. doi:10.3390/molecules23123063
  145. Steen PV den, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Concepts and Principles of O-Linked Glycosylation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 1998;33: 151–208. doi:10.1080/10409239891204198
  146. Simão M, Camacho A, Ostertag A, Cohen-Solal M, Pinto IJ, Porto G, et al. Iron-enriched diet contributes to early onset of osteoporotic phenotype in a mouse model of hereditary hemochromatosis. *PLOS ONE*. 2018;13: e0207441. doi:10.1371/journal.pone.0207441
  147. Komori T. Regulation of Osteoblast Differentiation by Runx2. In: Choi Y, editor. *Osteoimmunology*. Boston, MA: Springer US; 2009. pp. 43–49. doi:10.1007/978-1-4419-1050-9\_5
  148. Gouze J-N, Gouze E, Popp MP, Bush ML, Dacanay EA, Kay JD, et al. [No title found]. *Arthritis Res Ther*. 2006;8: R173. doi:10.1186/ar2082
  149. Rataj F, Planel S, Desroches-Castan A, Le Douce J, Lamribet K, Denis J, et al. The cAMP pathway regulates mRNA decay through phosphorylation of the RNA-binding protein TIS11b/BRF1. Wickens MP, editor. *MBoC*. 2016;27: 3841–3854. doi:10.1091/mbc.E16-06-0379

150. Sawai S, Campos-Ortega JoséA. A zebrafish Id homologue and its pattern of expression during embryogenesis. *Mechanisms of Development*. 1997;65: 175–185. doi:10.1016/S0925-4773(97)00071-3
151. Tréguer K, Faucheux C, Veschambre P, Fédou S, Thézé N, Thiébaud P. Comparative Functional Analysis of ZFP36 Genes during *Xenopus* Development. Klymkowsky M, editor. *PLoS ONE*. 2013;8: e54550. doi:10.1371/journal.pone.0054550
152. Stoecklin G. Functional cloning of BRF1, a regulator of ARE-dependent mRNA turnover. *The EMBO Journal*. 2002;21: 4709–4718. doi:10.1093/emboj/cdf444
153. Matsuura Y, Noguchi A, Sakai S, Yokota N, Kawahara H. Nuclear accumulation of ZFP36L1 is cell cycle-dependent and determined by a C-terminal serine-rich cluster. *The Journal of Biochemistry*. 2020;168: 477–489. doi:10.1093/jb/mvaa072
154. Adachi S, Homoto M, Tanaka R, Hioki Y, Murakami H, Suga H, et al. ZFP36L1 and ZFP36L2 control LDLR mRNA stability via the ERK–RSK pathway. *Nucleic Acids Research*. 2014;42: 10037–10049. doi:10.1093/nar/gku652
155. Ardito F, Giuliani M, Perrone D, Troiano G, Muzio LL. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. 2017;40: 271–280. doi:10.3892/ijmm.2017.3036
156. Kasturi L, Chen H, Shakin-Eshleman SH. Regulation of N-linked core glycosylation: use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors. *Biochemical Journal*. 1997;323: 415–419. doi:10.1042/bj3230415
157. Magalhães A, Duarte HO, Reis CA. The role of O-glycosylation in human disease. *Molecular Aspects of Medicine*. 2021;79: 100964. doi:10.1016/j.mam.2021.100964
158. Loh X-Y, Sun Q-Y, Ding L-W, Mayakonda A, Venkatachalam N, Yeo M-S, et al. RNA-Binding Protein *ZFP36L1* Suppresses Hypoxia and Cell-Cycle Signaling. *Cancer Research*. 2020;80: 219–233. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-2796
159. Jiang K, Zhu L, Buck MJ, Chen Y, Carrier B, Liu T, et al. Disease-Associated Single-Nucleotide Polymorphisms From Noncoding Regions in Juvenile Idiopathic Arthritis Are Located Within or Adjacent to Functional Genomic Elements of Human Neutrophils and CD4+ T Cells. *Arthritis & Rheumatology*. 2015;67: 1966–1977. doi:10.1002/art.39135
160. Kang H, Yang K, Xiao L, Guo L, Guo C, Yan Y, et al. Osteoblast Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Pathway Activation Restrains Osteoclastogenesis via the Interleukin-33-MicroRNA-34a-Notch1 Pathway. *Front Immunol*. 2017;8: 1312. doi:10.3389/fimmu.2017.01312

161. Hayman AR, Bune AJ, Cox TM. Widespread expression of tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) in the mouse embryo. *J Anatomy*. 2000;196: 433–441. doi:10.1046/j.1469-7580.2000.19630433.x
162. Zou W, Rohatgi N, Brestoff JR, Li Y, Barve RA, Tycksen E, et al. Ablation of Fat Cells in Adult Mice Induces Massive Bone Gain. *Cell Metabolism*. 2020;32: 801-813.e6. doi:10.1016/j.cmet.2020.09.011
163. Zhao Q, Wang X, Liu Y, He A, Jia R. NFATc1: Functions in osteoclasts. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2010;42: 576–579. doi:10.1016/j.biocel.2009.12.018
164. Tevlin R, McArdle A, Chan CKF, Pluvinage J, Walmsley GG, Wearda T, et al. Osteoclast Derivation from Mouse Bone Marrow. *JoVE*. 2014; 52056. doi:10.3791/52056
165. Li Y-N, Chen C-W, Trinh-Minh T, Zhu H, Matei A-E, Györfi A-H, et al. Dynamic changes in O-GlcNAcylation regulate osteoclast differentiation and bone loss via nucleoporin 153. *Bone Res*. 2022;10: 51. doi:10.1038/s41413-022-00218-9
166. Chen M-T, Dong L, Zhang X-H, Yin X-L, Ning H-M, Shen C, et al. ZFP36L1 promotes monocyte/macrophage differentiation by repressing CDK6. *Sci Rep*. 2015;5: 16229. doi:10.1038/srep16229
167. Zeng C-Y, Wang X-F, Hua F-Z. HIF-1 $\alpha$  in Osteoarthritis: From Pathogenesis to Therapeutic Implications. *Front Pharmacol*. 2022;13: 927126. doi:10.3389/fphar.2022.927126
168. Wang Q, Onuma K, Liu C, Wong H, Bloom MS, Elliott EE, et al. Dysregulated integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3 and CD47 signaling promotes joint inflammation, cartilage breakdown, and progression of osteoarthritis. *JCI Insight*. 2019;4: e128616. doi:10.1172/jci.insight.128616
169. Vincent TL. IL-1 in osteoarthritis: time for a critical review of the literature. *F1000Res*. 2019;8: 934. doi:10.12688/f1000research.18831.1
170. Zengini E, Hatzikotoulas K, Tachmazidou I, Steinberg J, Hartwig FP, Southam L, et al. Genome-wide analyses using UK Biobank data provide insights into the genetic architecture of osteoarthritis. *Nat Genet*. 2018;50: 549–558. doi:10.1038/s41588-018-0079-y
171. Saini Y, Chen J, Patial S. The Tristetraprolin Family of RNA-Binding Proteins in Cancer: Progress and Future Prospects. *Cancers*. 2020;12: 1539. doi:10.3390/cancers12061539
172. Zhao X, Liu L, Li R, Wei X, Luan W, Liu P, et al. Hypoxia-Inducible Factor 1- $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) Induces Apoptosis of Human Uterosacral Ligament Fibroblasts Through the Death Receptor and Mitochondrial Pathways. *Med Sci Monit*. 2018;24: 8722–8733. doi:10.12659/MSM.913384

## ANEXOS

Tabela A1- Sequências terminais das isoformas do RUNX2

Sequência terminal:	Isoformas do RUNX2:
<b>MRIPV</b>	<b>Tipo I</b>
<b>MASNSLFSAVTPCQSQFFW</b>	<b>Tipo II</b>

Tabela A2 – Domínios de ZFP36L1 humano

2 Domínios de ZFP36L1 humano:
<b>RYKTELCRPFEEeNGACKYGDKCQFAHGIH</b>
<b>KYKTELCRTEFHTiGFCPYGPRCHFIHNAE</b>

O RUNX2 é expresso em 2 isoformas diferentes dependendo da sua terminação amino diferente. Se a sequência amino terminal for MRIPV em vez de MASNSLFSAVTPCQSQFFW, é tipo I em vez de tipo II [5]

Tabela A3 – tabela dos locais de previsão de fosforilação do gene *ZFP36L1* humano com o respetivo score de probabilidade e a cinase obtida pelo “Netphos – 3.1.b” (nota: unsp= não específica)

# x	Contexto	Score	Cinase
4T	-MTTTLVSA	0.857	unsp
4 T	-MTTTLVSA	0.548	PKC
30 S	YSAPSAGGC	0.506	CKI
43 T	KAVGTPAGG	0.790	unsp
43 T	KAVGTPAGG	0.552	p38MAPK
43 T	KAVGTPAGG	0.536	cdk5
54 S	PRRHSVTLP	0.995	unsp
54 S	PRRHSVTLP	0.876	PKA
54 S	PRRHSVTLP	0.599	RSK
56 T	RHSVTLPSS	0.793	PKC
59 S	VTLPSKFKH	0.875	PKC
59 S	VTLPSKFKH	0.859	unsp
59 S	VTLPSKFKH	0.568	cdc2
69 S	NQLLSSLKG	0.503	cdc2
70 S	QLLSSLKGE	0.899	unsp
70 S	QLLSSLKGE	0.845	PKC
80 S	APALSSRDS	0.997	unsp
81 S	PALSSRDSR	0.671	PKC
81 S	PALSSRDSR	0.500	cdc2
84 S	SSRDSRFRD	0.996	unsp
90 S	FRDRSFSEG	0.996	unsp
90 S	FRDRSFSEG	0.741	PKB
90 S	FRDRSFSEG	0.703	PKG
90 S	FRDRSFSEG	0.590	PKA
90 S	FRDRSFSEG	0.531	RSK
92 S	DRSFSEGGE	0.996	unsp
92 S	DRSFSEGGE	0.618	PKB
92 S	DRSFSEGGE	0.531	RSK
92 S	DRSFSEGGE	0.519	CKI
101 T	RLLPTQKQP	0.881	PKC
112 S	GQVNSSRYK	0.793	PKC
113 S	QVNSSRYKT	0.988	unsp
113 S	QVNSSRYKT	0.539	cdc2
117 T	SRYKTELCR	0.511	RSK
146 S	HELRSLTRH	0.962	unsp
146 S	HELRSLTRH	0.742	PKC

148 T	LRSLTRHPK	0.569	PKG
153 Y	RHPKYKTEL	0.702	unsp
192 S	ARDLSADRP	0.990	unsp
192 S	ARDLSADRP	0.516	PKA
201 S	RLQHSFSFA	0.540	unsp
203 S	QHSFSFAGF	0.554	CKI
213 T	SAAATAAAT	0.625	PKC
222 S	GLLDSPTSI	0.897	unsp
222 S	GLLDSPTSI	0.560	p38MAPK
222 S	GLLDSPTSI	0.542	cdk5
225 S	DSPTSITPP	0.869	unsp
233 S	PPILSADDL	0.629	unsp
240 S	DLLGSPTLP	0.581	p38MAPK
240 S	DLLGSPTLP	0.576	cdk5
240 S	DLLGSPTLP	0.574	unsp
240 S	DLLGSPTLP	0.514	GSK3
254 S	PFAFSSQEL	0.525	CKII
255 S	FAFSSQELA	0.629	DNAPK
255 S	FAFSSQELA	0.601	ATM
260 S	QELASLFAP	0.531	PKC
265 S	LFAPSMGLP	0.513	cdc2
273 S	PGGGSPPTF	0.511	cdk5
276 T	GSPTTFLFR	0.532	cdc2
283 S	FRPMSESPH	0.932	unsp
283 S	FRPMSESPH	0.516	RSK
285 S	PMSSEPHMF	0.972	unsp
291 S	HMFDSPPSP	0.620	cdk5
291 S	HMFDSPPSP	0.569	cdc2
291 S	HMFDSPPSP	0.521	GSK3
291 S	HMFDSPPSP	0.505	p38MAPK
294 S	DSPPSPQDS	0.997	unsp
294 S	DSPPSPQDS	0.613	cdk5
294 S	DSPPSPQDS	0.589	p38MAPK
294 S	DSPPSPQDS	0.537	GSK3
298 S	SPQDSLSDQ	0.997	unsp
300 S	QDSLSDQEG	0.986	unsp
300 S	QDSLSDQEG	0.636	CKII
300 S	QDSLSDQEG	0.527	cdc2
305 Y	DQEGYLSSS	0.925	unsp
307 S	EGYLSSSSS	0.579	unsp
307 S	EGYLSSSSS	0.549	cdc2
308 S	GYLSSSSSS	0.723	PKC
309 S	YLSSSSSSH	0.909	unsp
309 S	YLSSSSSSH	0.621	cdc2
310 S	LSSSSSSH	0.629	unsp
311 S	SSSSSSHSG	0.910	unsp
311 S	SSSSSSHSG	0.548	cdc2
312 S	SSSSSHSGS	0.996	unsp
312 S	SSSSSHSGS	0.527	CKI
312 S	SSSSSHSGS	0.517	cdc2
314 S	SSSHSGSDS	0.998	unsp
314 S	SSSHSGSDS	0.524	CKI
314 S	SSSHSGSDS	0.512	cdc2
316 S	SHSGSDSPT	0.961	unsp
316 S	SHSGSDSPT	0.546	cdc2
318 S	SGSDSPTLD	0.547	cdk5
318 S	SGSDSPTLD	0.522	p38MAPK
324 S	TLDNSRRLP	0.580	cdc2
334 S	FSRLSISDD	0.997	unsp
334 S	FSRLSISDD	0.604	PKA
336 S	RLSISDD--	0.602	CKII



Maximum  
likelihood -  
RaxML

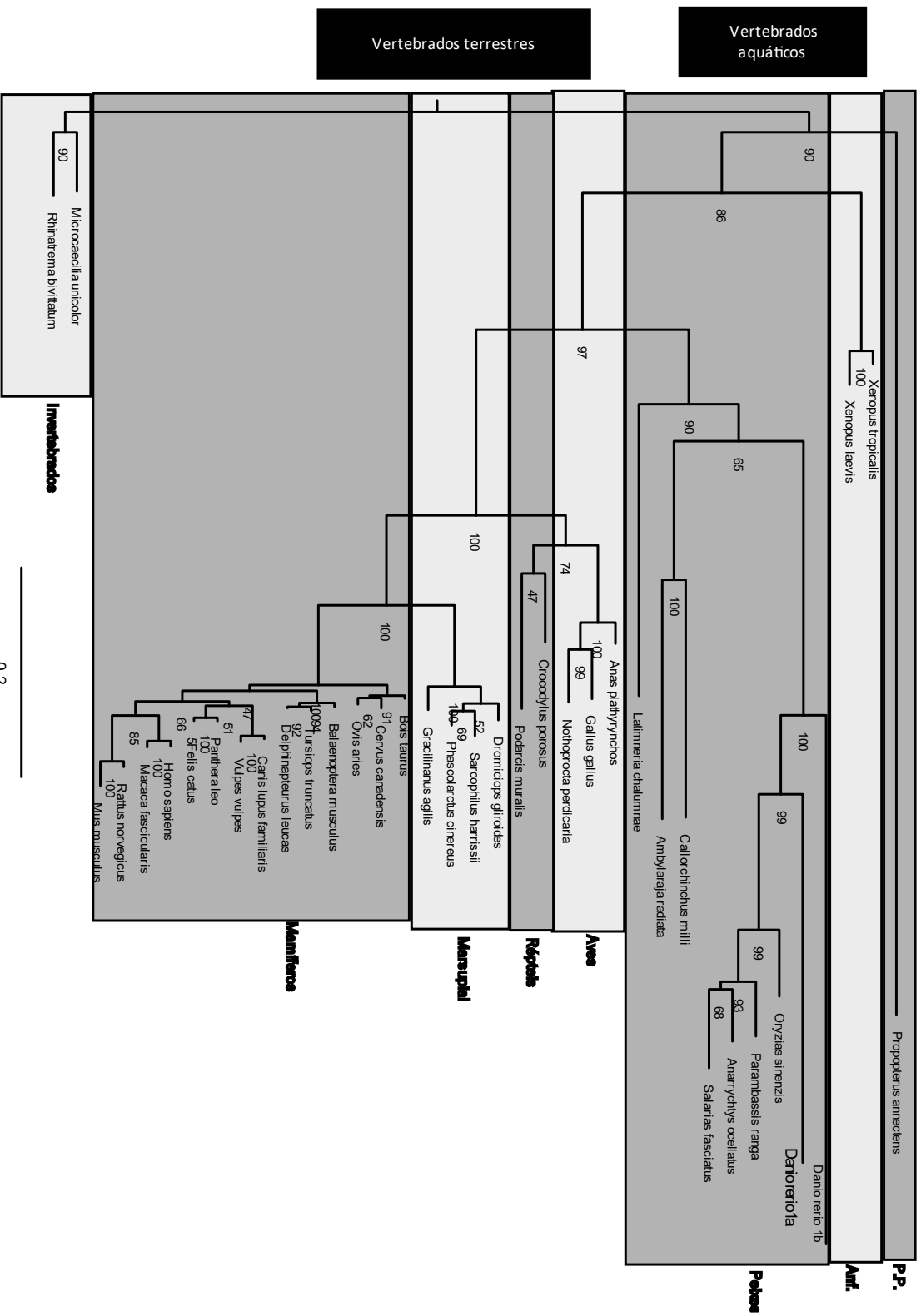


Figura A2 - Árvore filogenética obtida pelo método RaxML referente ao gene ZFP36L1. PP- Peixes pulmonares; Anf- anfíbios; P.C.- Peixes cartilagíneos



**Tabela A4-** Tabela completa dos scores de probabilidade da proteína ZFP36L1 ser O-glicosilada. Foi considerado significativo scores acima de 0,8.

#seqname	source	feature	start	end	score	strand	frame	comment
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	2	2	0.468356	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	3	3	0.452567	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	4	4	0.519202	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	7	7	0.443617	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	9	9	0.296501	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	14	14	0.0729436	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	27	27	0.304407	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	30	30	0.365999	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	43	43	0.568377	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	54	54	0.768839	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	56	56	0.912508	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	59	59	0.828011	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	60	60	0.704993	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	69	69	0.410709	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	70	70	0.800614	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	80	80	0.907508	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	81	81	0.81492	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	84	84	0.785642	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	90	90	0.816849	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	92	92	0.920524	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	101	101	0.922637	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	112	112	0.799966	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	113	113	0.871316	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	117	117	0.307989	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	146	146	0.80927	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	148	148	0.850623	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	155	155	0.700808	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	160	160	0.5	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	163	163	0.529026	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	192	192	0.84527	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	201	201	0.763167	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	203	203	0.723201	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	209	209	0.800721	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	213	213	0.809211	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	217	217	0.63809	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	222	222	0.567921	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	224	224	0.736178	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	225	225	0.856661	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	227	227	0.701649	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	233	233	0.382012	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	240	240	0.425181	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	242	242	0.522534	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	247	247	0.592166	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	254	254	0.164702	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	255	255	0.317563	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	260	260	0.328763	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	265	265	0.5764	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	273	273	0.474107	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	275	275	0.621088	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	276	276	0.208664	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	283	283	0.898303	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	285	285	0.572157	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	291	291	0.621593	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	294	294	0.521331	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	298	298	0.24495	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	300	300	0.212165	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	307	307	0.456735	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	308	308	0.593649	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	309	309	0.594433	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	310	310	0.705501	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	311	311	0.665216	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	312	312	0.754411	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	314	314	0.697449	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	316	316	0.899667	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	318	318	0.424872	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	320	320	0.614628	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	324	324	0.643781	.	.	#POSITIVE
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	331	331	0.206458	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	334	334	0.1546	.	.	
SEQUENCE	netOGlyc-4.0.0.13	CARBOHYD	336	336	0.0793054	.	.	