

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DE MÍMICOS E ANTAGONISTAS DE MIR-21 NA OSTEOGÊNESE

Mestranda: ANGÉLICA SANT'ANNA

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria Pereira

DUQUE DE CAXIAS

ABRIL

2025

ANGÉLICA SANT'ANNA

**INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DE MÍMICOS E ANTAGONISTAS
DE MIR-21 NA OSTEOGÊNESE**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional
(BIOTRANS) da Universidade do
Grande Rio/AFYA como requisito
para a obtenção de Título de Mestre
em Ciências Biomédicas

Orientadora:

Profa. Dra. Cláudia Maria Pereira

DUQUE DE CAXIAS

ABRIL

2025

AGRADECIMENTOS

"A vida sem gratidão é como andar sem a consciência do chão."

Aqui, nesta página, está o chão que possibilitou a evolução da minha caminhada pelo Mestrado. Inicio os agradecimentos ao Criador de todas as possibilidades existentes no Universo — Deus. Sem Ele, a primeira possibilidade não existiria: a minha vida. Por ela, sou profundamente grata.

Aos meus amados pais, agradeço por ainda me verem como uma menina curiosa e questionadora, e, assim, me incentivarem a buscar respostas.

Aos meus filhos, Gabriel e Luisa, que a cada amanhecer me transformam em uma pessoa melhor para o mundo, pelo simples fato de existirem. Agradeço também pelo amor e carinho que me fortaleceram nesta jornada.

Ao meu companheiro e amado Mário Rubens, que me mostrou, dia após dia, que o fruto mais doce é o da árvore que plantamos — mas que nunca plantamos, nem colhemos sozinhos. A ele, minha gratidão por caminhar ao meu lado.

À minha orientadora, Professora Cláudia Maria Pereira, que me ensinou pacientemente a plantar essa árvore e a trilhar o caminho do Mestrado. Cuidadosa, atenciosa e sempre sensível às minhas demandas, deixo registrada minha gratidão, carinho e eterna admiração.

Agradeço ao Laboratório de Genética (Labgen), onde descobri um mundo novo, e aos valiosos colaboradores que ali atuam com dedicação e generosidade. Estendo meu reconhecimento a todos os professores e coordenadores do programa Biotrans — uma verdadeira flor de lótus no cenário acadêmico, que floresce mesmo em meio aos desafios. E, por fim, à Unigranrio, instituição onde me formei em Odontologia e para onde voltei, anos depois, com o coração repleto de entusiasmo e o desejo constante de seguir evoluindo.

EPÍGRAFE

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças.”

(Charles Darwin)

RESUMO

MicroRNAs (miRNAs) estão envolvidos na regulação das funções biológicas do osso e da osteogênese. Eles podem regular a expressão gênica no nível pós-transcricional por meio da degradação ou repressão traducional de moléculas de RNA mensageiro (mRNA) alvo, seja pela degradação da molécula de mRNA ou pela indução do silenciamento traducional de mRNAs alvo. Isso, por sua vez, afeta a proliferação celular, diferenciação e apoptose. Os miRNAs têm potencial clínico significativo, como biomarcadores específicos de doenças e como possíveis agentes terapêuticos melhorando ou revertendo a degeneração do tecido ósseo. Tem sido demonstrado, que miR-21 regula positivamente a diferenciação e mineralização osteogênica, influenciando na expressão dos principais fatores osteogênicos como *fosfatase alcalina (ALP)*, *fator de transcrição relacionado ao runt 2 (RUNX2)*, *Osteopontina (OPN)* e *Osteoprotegerina (OPG)*. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, a modulação de genes relacionados à osseointegração utilizando uma linhagem de osteossarcoma (SAOS-2) transfectada com mímicos e inibidores do miR-21. Para isto, células da linhagem SAOS-2 foram cultivadas em meio de cultura específico e transfectadas com mímicos e inibidores de miR-21. Após a transfecção, as células foram incubadas por 24h e 48h. Logo após, o RNA total foi extraído e a expressão dos genes *ALP*, *RUNX2*, *Colágeno A tipo IA (COL1A1)*, *RANKL*, *OPG* e *OPN* foram avaliados por PCR quantitativa (qPCR). Como resultados, foi observado que o genes *OPG*, *OPN* e *RANKL* não apresentaram amplificação adequada provavelmente devido à curta duração do cultivo e às características da linhagem SAOS-2. A transfecção de células SAOS-2 com mímico de miR-21 promoveu uma hiperexpressão em *RUNX2* após 48 h de cultura, não sendo verificada a ação de inibidores de miR-21 na expressão deste gene. Já *ALP* apresentou-se hiperexpresso após 24h, sendo este aumento mais significativo após 48h de cultura em presença de mímicos de miR-21. A inibição de miR-21 foi verificada somente em 24h e em presença de menor concentração de inibidores de miR-21. Também foi encontrada uma correlação positiva entre a expressão de *RUNX2* e *ALP* 48 horas após a transfecção com mímicos e inibidores de miR-21. Deste modo, *ALP* mostrou uma expressão aumentada de forma dependente do tempo e da concentração de mímicos de miR-21 e sua expressão parece estar relacionada com a de *RUNX2* em SAOS-2. Apesar dos resultados favoráveis que demonstram que miR-21 possui papel importante na regulação da expressão dos marcadores osteogênicos *ALP* e *RUNX2*, as análises por qPCR de *COL1A1*, *OPG*, *OPN*, *RANKL* não demonstraram resultados conclusivos. Os dados obtidos até o momento parecem sugerir o potencial do miR-21 como uma ferramenta terapêutica em procedimentos que envolvem formação e regeneração óssea, incluindo implantes osseointegrados.

Palavras-chave: osteogênese, miR-21, transfecção, mímicos de miRNA, inibidores de miRNA,

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are involved in the regulation of biological functions of bone and osteogenesis. They can regulate gene expression at the post-transcriptional level through translational manipulation or repression of target messenger RNA (mRNA) molecules, either by manipulating the mRNA molecule or by inducing translational silencing of target mRNAs. This, in turn, affects cellular control, differentiation, and apoptosis. miRNAs have significant clinical potential, as specific biomarkers of diseases and as potential therapeutic agents improving or reversing bone tissue degeneration. It has been shown that miR-21 positively regulates osteogenic differentiation and mineralization, influencing the expression of key osteogenic factors such as alkaline phosphatase (ALP), runt-related transcription factor 2 (RUNX2), osteopontin (OPN), and osteoprotegerin (OPG). Therefore, the aim of this study was to evaluate, *in vitro*, the modulation of genes related to osseointegration using an osteosarcoma cell line (SAOS-2) transfected with miR-21 mimics and inhibitors. For this, cells of the SAOS-2 cell line were cultured in a specific culture medium and transfected with miR-21 mimics and inhibitors. After transfection, the cells were incubated for 24h and 48h. Soon after, total RNA was extracted and the expression of the ALP, RUNX2, Collagen A type IA (COL1A1), RANKL, OPG and OPN genes were evaluated by quantitative PCR (qPCR). As a result, it was observed that the OPG, OPN and RANKL genes did not have adequate amplification probably due to the short duration of culture and the characteristics of the SAOS-2 cell line. Transfection of SAOS-2 cells with miR-21 mimics promoted hyperexpression of RUNX2 after 48 h of culture, and no action of miR-21 inhibitors on the expression of this gene was observed. ALP was hyperexpressed after 24 h, and this increase was more significant after 48 h of culture in the presence of miR-21 mimics. MiR-21 inhibition was only observed at 24 h and in the presence of a lower miR-21 inhibitor concentration. A positive correlation was also found between the expression of RUNX2 and ALP 48 h after transfection with miR-21 mimics and inhibitors. Thus, ALP showed increased expression in a time- and concentration-dependent manner with miR-21 mimics, and its expression appears to be related to that of RUNX2 in SAOS-2. Despite the results developed demonstrating that miR-21 plays an important role in regulating the expression of osteogenic markers ALP and RUNX2, qPCR analyses of COL1A1, OPG, OPN, RANKL did not provide conclusive results. The data obtained so far seem to suggest the potential of miR-21 as a therapeutic tool in procedures involving bone training and regeneration, including osseointegrated implants.

Keywords: osteogenesis, miR-21, transfection, miRNA mimics, miRNA inhibitors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição das Células Ósseas.....	18
Figura 2: Mecanismo dos Osteócitos na remodelação óssea.....	22
Figura 3: Remodelação Óssea.....	26
Figura 4: Fontes de colágeno tipo I e conteúdo aproximado em cada tecido.....	29
Figura 5: Osteoclasto e crosstalk.....	32
Figura 6: Biogênese do MicroRNA.....	35
Figura 7: Indução da remodelação óssea por miR-21.....	38
Figura 8: Representação esquemática dos 12 grupos analisados neste estudo....	43
Figura 9: Curva de Melting dos primers de Fosfatase alcalina (ALP), β -Actina (ACTB), RUNX Osteopontina (OPN), RANKL e Osteoprotegerina (OPG).....	46
Figura 10: Curva de Melting do primer para o gene COL1A1.....	47
Figura 11: Curvas de amplificação da amostra de SAOS2 controle 48h para o gene OPG e o endógeno ACTB.....	48
Figura 12: Curvas de amplificação das amostras de SAOS2 submetidas ao tratamento com mimico de miR-21 por 24h e inibidor de miR-21 por 48h para o gene OPG e o endógeno ACTB.....	49
Figura 13: Gráfico de expressão do gene OPG em uma amostras de SAOS-2 tratadas com mímico e inibidor de miR-21.....	50
Figura 14: Curvas de amplificação para o gene OPN e o endógeno ACTB na amostra de SAOS2 que recebeu o inibidor de miR-21 na concentração de 25 ng durante 48h.....	50
Figura 15: Curvas de amplificação do gene RANKL e do endógeno ACTB nas amostras de SAOS2 controle 48h.....	51
Figura 16: Expressão do gene RUNX2 em amostras de SAOS2 tratadas com mímico e inibidor de miR-21 em 24 horas de cultura.....	52
Figura 17: Expressão do gene RUNX2 em amostras de SAOS2 tratadas com mímicos e inibidores de miR-21 durante 48h.....	53
Figura 18: Expressão do gene RUNX2 em amostras de SAOS2 tratadas com mímicos e inibidores de miR-21 durante 24h e 48h.....	54
Figura 19: Expressão de ALP, 24 horas após transfecção com mímico/inibidor de miR-21.....	55

Figura 20: Expressão de ALP 48 horas após transfecção com mímico/inibidor de miR-21.....	56
Figura 21: Comparação da expressão de <i>ALP</i> nos dois tempos de cultura (24 e 48 horas) após transfecção com mímicos/inibidores de miR21.....	57
Figura 22: Correlação entre a expressão relativa de <i>ALP</i> e <i>RUNX2</i> nos diferentes tratamentos durante 48 horas.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACVR1B: Receptor de ativina tipo 1B (do inglês Activin A Receptor Type 1B).

AntiMiR: Anti MicroRNA.

β -catenina: Beta catenina.

BMSC: Células Tronco da medula Óssea (do inglês Bone Marrow Stem Cell).

BMPs : Proteínas morfogenética óssea

BMP2: Proteína morfogenética óssea do tipo 2 (do inglês Bone Morphogenetic Protein 2).

BSPII: Sialoproteína II ÓSSEA (do inglês Bone sialoprotein II).

BMPR1B: Receptor de proteína morfogenética óssea tipo 1B (do inglês Bone morphogenetic protein receptor type 1B).

BMPR2: Receptor de proteína morfogenética óssea tipo II ou BMPR2 (do inglês Bone morphogenetic protein receptor type 2B).

BMTiS: Modificação bioquímica de superfícies de titânio(do inglês Biochemical Modification of Titanium Oral Implants).

CBs: Células osteoprogenitoras.

Ca²⁺: Cálcio, íon cátion bivalente.

CTMs: Células-tronco mesenquimais.

CH-CTMs: Células-tronco Mesenquimais do córion.

PL-CTMs: Células-tronco Mesenquimais da placenta.

DLX5: Drosophila distal-less 5.

FA: Fosfatase Alcalina.

FGF: Fator de Crescimento de fibroblastos.

FZR1: Homólogo de proteína relacionado ao Fizzy do inglês (Fizzy- related protein homolog 1).

hDPSCs : Células-tronco da polpa dentária humana.

LRP5: Proteína 5 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (do inglês Low-density lipoprotein receptor-related protein 5).

miRs: microRNAs.

MEC: Matriz Extra Celular.

MSCs: Células Tronco Mesenquimais (do inglês mesenchymal stem cells)

MSNs: Nanoesferas de silicato de magnésio (do inglês magnesium silicate

nanospheres).

CH-MSCs: Células Tronco Mesenquimais do Córion.

PL-MSCs: Células Tronco Mesenquimais da Placenta.

NFATC1: Fator nuclear de células T ativadas, citoplasmático 1.

NFATC2: Fator nuclear de células T ativadas, citoplasmático 2.

NFATC4: Fator nuclear de células T ativadas, citoplasmático 4.

OPG: Osteoprotegerina

OPN: Osteopontina.

OSX: Osterix.

COL1A1: Cadeia colágeno 1 α 1.

PO4: Fosfato.

RANK: Receptor ativador do fator nuclear κ B.

RANKL: Ativador do receptor do ligante do fator nuclear kappa- B.

RNA: Ácido Ribonucleico.

RUNX2: Fator de transcrição 2 relacionado ao Runt (do inglês....

SLA: Superfície de titânio modificada por micro-rugosidade

TGF- β : Fator de crescimento Beta.

TGFBR2: Fator de crescimento transformador, receptor beta II (humano).

Ti: Titânio.

TNAP Fosfatase Alcalina Não Específica de Tecido.

Wnt: Via de sinalização de Wnt/Wingless.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1 Espectrofotometria do RNA total das amostras extraídas nas duplicatas experimentais.....	43
QUADRO 1 Sequência de primers dos genes analisados nesse estudo.....	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Revisão de Literatura	16
1.1.1. Tecido ósseo	17
1.1.2. Células do Tecido Ósseo	19
1.1.2.1. Os Osteoblastos	19
1.1.2.2. Os Osteócitos	20
1.1.2.3. Os Osteoclástos	22
1.1.3 A Formação e a Remodelação Óssea	24
1.1.4. Genes relacionados a formação e remodelação óssea	26
1.1.4.1. Fosfatase Alcalina	26
1.1.4.2. Colágeno tipo 1	27
1.1.4.3. A Osteoprotegera (OPG)	29
1.1.4.4. O fator de crescimento relacionado ao runt (RUNX2)	30
1.1.4.5. O Receptor Ativador of NF-Kb Ligand (RANKL)	31
1.1.5. Os MicroRNAs (MiRNAs)	33
1.1.6. Os MicroRNAs na Osteogênese	36
1.1.7. O miR-21	37
2. JUSTIFICATIVA	39
3.OBJETIVOS	40
3.1. Objetivo Geral	40
3.2. Objetivo Específico	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1. Cultura de Células	42
4.2. Transfecção com Mímicos e Inibidores do MiR-21	42
4.2.1. Preparo da solução de estoque de mímicos e inibidores de MiR-21 para tranfecção de SAOS2	41
4.3. Análise dos marcadores do metabolismo ósseo	42
4.3.1. Extração do RNA Total	42
4.3.2. Confecção das molécula de cDNA Dos marcadores do metabolismo ósseo.....	45
4.3.3. Avaliação da expressão dos genes relacionados com metabolismo ósseo por PCR quantitativa (qPCR)	45

4.3.4. Padronização dos Primes	46
4.4. Análise de dados.....	47
5. RESULTADOS	48
5.1. Avaliação da expressão relativa dos genes OPG, OPN, RANKL e COL1A1..	48
5.2. Avaliação da expressão relativa de RUNX2	51
5.3. Avaliação da expressão relativa do gene ALP	54
5.4. Correlação de RUNX e ALP	58
6. DISCUSSÃO.....	69
7. CONCLUSÃO	67
8.REFERÊNCIAS	68

1. INTRODUÇÃO

O osso geralmente exibe uma alta capacidade intrínseca de regeneração, no entanto, grandes defeitos ósseos às vezes não conseguem cicatrizar. A regeneração de grandes defeitos ósseos muitas vezes se mostra difícil, pois depende da formação de grandes quantidades de osso em um ambiente impeditivo à osteogênese (Schulze *et al.*; 2023). A remodelação óssea é caracterizada por uma interação dinâmica de mecanismos sequenciais que levam a mudanças na composição da Matriz Extra Celular (MEC) mediadas pela adesão, proliferação e diferenciação celular e pela liberação de moléculas de sinalização ativas (Ruggieri *et al.*; 2021). O isolamento de uma única população de células-tronco esqueléticas por meio de marcadores de superfície celular e o desenvolvimento de tecnologias de células únicas estão permitindo a elucidação precisa da atividade celular e do destino durante o reparo ósseo, fornecendo *insights* importantes sobre os mecanismos que mantêm e regeneram o osso durante a homeostase e o reparo. O aumento da compreensão do desenvolvimento ósseo, bem como do reparo ósseo normal e anormal, tem implicações terapêuticas importantes para o tratamento de doenças ósseas e degeneração relacionada ao envelhecimento (Yuan *et al.*; 2024).

Recentemente, descobriu-se que uma nova classe de fatores reguladores denominados microRNAs (miRNAs) que desempenham um papel crucial no controle do ciclo celular, apoptose e outros processos celulares, incluindo metabolismo e diferenciação. Dados publicados mostraram que alguns miRNAs regulam a homeostase óssea, incluindo formação óssea (Zhao *et al.*; 2013). Nesse contexto, a engenharia tecidual tem ganhado destaque, especialmente através do uso de estruturas bicamadas, arcabouços avançados que replicam a complexidade heterogênea do osso. Desenvolvidas para tratar defeitos ósseos resultantes de traumas, infecções, fraturas, ressecção de tumores, doenças ou anormalidades esqueléticas, essas estruturas visam superar as limitações dos métodos tradicionais, como medicações, cirurgias invasivas, riscos de infecção, morbidade no local doador, reabsorção óssea imprevisível e complicações associadas ao uso de aloenxertos (Teimoori *et al.*, 2023; Arriaga *et al.*, 2019).

Alguns estudos discutem aplicações baseadas em arcabouços de biomateriais com o intuito de fornecer células que expressam miRNAs ou inibidores de miRNAs com a finalidade de induzir a expressão do *fator de transcrição relacionado ao runt 2*

(*RUNX2*) para engenharia de tecido ósseo (Schulze *et al.*, 2023). Alguns miRNAs/anti-miRNAs (entre eles, miRNA-26a, anti-miRNA-31, antimRNA-34a, miRNA-135, anti-miRNA-138, anti-miRNA-146a, miRNA-148b, anti-miRNA-221 e anti-miRNA-335) foram incorporados em aplicações de engenharia de tecido ósseo baseadas em arcabouços e investigados em um modelo de defeito ósseo de tamanho crítico *in vivo* (Arriaga *et al.*, 2019; Mayfield *et al* 2022).

Esses miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes (18 a 24 nucleotídeos), capazes de regular a expressão de genes em nível pós-transcricional através da degradação ou repressão da tradução de moléculas-alvo de RNA mensageiro (mRNA), podendo degradar a molécula de mRNA ou induzir silenciamento traducional de mRNAs alvo, afetando assim a proliferação celular, diferenciação, apoptose e ontogenia (Bartel, 2004). Estudos aprofundados sobre o papel dos miRNAs durante a diferenciação osteogênica de BMSCs (*Bone Marrow Stem Cell* - Células Tronco da medula Óssea) fornecem novas bases teóricas e experimentais para engenharia de tecido ósseo e tratamento clínico (Wang *et al.*, 2019).

Estas vias de sinalização celular interagem entre si durante a diferenciação dos osteoblastos com a participação do ativador do receptor do ligante do fator nuclear kappa- B (*RANKL*) e muitos ativadores ou repressores transcricionais, dentre eles os miRNAs (Kato *et al.*, 2014). Deste modo, estudos com células e estudos *in vivo* têm sido propostos para avaliar como os miRNAs participam destas vias de proliferação e diferenciação de osteoblastos (Nakasa *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2009). Mediante a esta complexidade, vários experimentos têm sido feitos para assim, cada vez mais, a abordagem e tratamento sejam mais efetivos e personalizados (Teimooore *et al.*, 2023). Os reguladores da formação óssea englobam fatores de transcrição essenciais (*Runx2/Cbfa-1* e *Osterix/SP7*) e vias de sinalização importantes como a via da Proteína Morfogenética Óssea (BMP), de sinalização de Wnt/Wingless (WNT) canônica, Notch, via do Receptor ativador do fator nuclear Kb (*RANK*)-Osteoprotegerina (OPG) - *RANKL* entre outras mediadas por cinases e fatores de crescimento (Zhao *et al.*, 2014). Com base nisso, o presente estudo tem por objetivo avaliar a expressão de genes na presença de mímicos e inibidores de miR-21, um miRNA que promove a osteogênese, regulador da osteoclastogênese e promotor da diferenciação de osteoclastos *in vitro* (Hu *et al*; 2017).

1.1. REVISÃO DE LITERATURA

A formação, o desenvolvimento e a reparação óssea são temas de grande relevância, especialmente diante dos desafios para manter um metabolismo ósseo eficaz e promover a regeneração em situações de alta prevalência, como fraturas e doenças ósseas. O sistema musculoesquelético fornece o arcabouço físico do corpo dos mamíferos, servindo como ponto de fixação para músculos, tendões e ligamentos, e permitindo a locomoção. Além disso, os ossos abrigam os microambientes necessários para a hematopoiese adulta. Dessa forma, a capacidade única do corpo de reparar o osso e restaurá-lo a um estado totalmente funcional ressalta a importância crucial dos ossos na fisiologia dos mamíferos (Salhotra *et al.*, 2020).

Os defeitos ósseos são tratados utilizando enxerto ósseo autógeno — considerado o padrão-ouro para cirurgias — aloenxertos e biomateriais que apresentam biocompatibilidade e osteointegração, permitindo a comunicação entre o tecido ósseo hospedeiro e os materiais substituídos. Além disso, empregam-se as estratégias de osteocondução, que se refere à capacidade dos materiais de serem colonizados por células ósseas e vasos sanguíneos do hospedeiro, e de osteoindução, que induz as células-tronco mesenquimais dos tecidos envolvidos a se diferenciarem em células ósseas (Sheikh *et al.*, 2019). O desenvolvimento ósseo ocorre por meio de uma série de eventos síncronos que resultam na formação do arcabouço corporal. O potencial de reparo do osso e do microambiente ao redor — incluindo células inflamatórias, endoteliais e de Schwann — persiste durante toda a vida adulta, permitindo a restauração do tecido ao seu estado funcional homeostático (Salhotra *et al.*, 2020).

Estudos indicam que inúmeros pacientes sofrem de perda óssea, defeitos ósseos e pseudoartrose devido a traumas, osteoporose, osteoartrite (OA), câncer e outras doenças. A vanguarda na prevenção e no tratamento dessas doenças reside no estudo de como promover a osteogênese e acelerar a formação óssea (Dimitriou *et al.*, 2011; Tuckermann e Adams; 2021). Pesquisadores têm desvendado vários mecanismos de sinalização importantes envolvidos na regulação dessas células ósseas em níveis genéticos e moleculares, incluindo as principais vias de sinalização, como o Notch, BMP e WNT canônica (Tezuka *et al.*, 2002; Chen, 2004; Hu *et al.*, 2005). E alguns miRNAs exercem sua influência por

meio de uma variedade de vias de sinalização, como TGF- β /SMAD e Wnt/ β -catenina (Xiong et al., 2019). Há evidências substanciais até o momento, tanto de estudos *in vitro* quanto *in vivo*, de que o mi-R21 exógeno pode acelerar com sucesso a síntese óssea nova no contexto de perda óssea devido a lesão ou osteoporose. Isso dá suporte à exploração de aplicações do miR-21 exógeno na terapia regenerativa óssea no futuro (Subramaniam *et al.*, 2023).

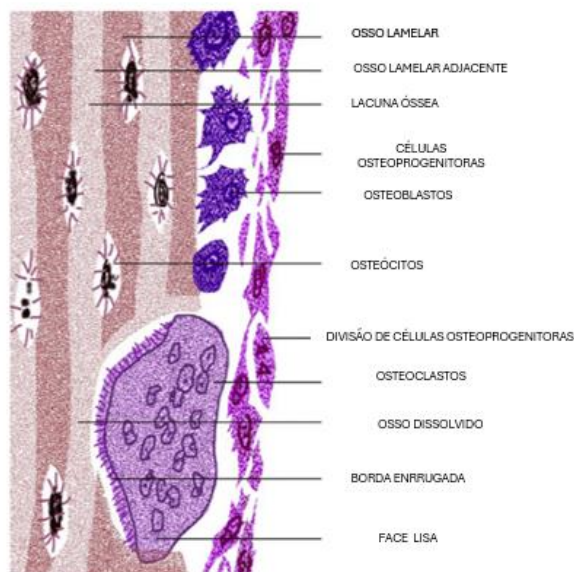
1.1.1 O tecido ósseo

O desenvolvimento e a formação do esqueleto (ossificação) ocorrem por dois processos distintos — ossificação intramembranosa e endocondral (Schulze *et al.*, 2023). A ossificação intramembranosa, ocorre diretamente no tecido mesenquimal, onde células mesenquimais se diferenciam em osteoblastos e começam a produzir matriz óssea, processo comum nos ossos do crânio e da face, e a ossificação endocondral que ocorre a partir de um modelo cartilaginoso pré-existente, que é gradualmente substituído por osso, como acontece nos ossos longos (Moore *et al.*, 2004), e nos ossos de articulações que suportam carga, e requerem tecido cartilaginoso pré-formado (Pfeiffenberger *et al.*, 2021)

O osso é composto por cerca de 30% de material orgânico e 70% de inorgânico. Com um dos sistemas de biomineralização mais complexos. Seus componentes inorgânicos são principalmente hidroxapatita e apatita carbonatada, respondendo por cerca de 65% da massa total (FZ *et al.*, 2009). Dentre os componentes orgânicos, aproximadamente 90% são formados por colágeno, enquanto os 10% restantes consistem principalmente em proteínas não colágenas, lipídios, proteoglicanos, osteopontina e outras proteínas da matriz óssea (Wang *et al.*, 2019; Hu *et al.*, 2019).

Tal como a cartilagem, o osso consiste em células e substância intercelular orgânica - a matriz óssea. As células do tecido ósseo são: os osteócitos, que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz; os osteoblastos, que sintetizam a parte orgânica da matriz e localizam-se na sua periferia; e os osteoclastos, células gigantes, móveis e multinucleadas que reabsorvem o tecido ósseo, participando dos processos de remodelação dos ossos (Figura 1) (Junqueira e Carneiro, 2012).

Figura 1: Distribuição das Células Ósseas



Fonte: Zhi *et al.*; 2019

Legenda: Camadas que ilustram o osso lamelar e a atividade celular associada à remodelação óssea, presença de osteócitos em lacunas ósseas, células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteoclastos atuando sobre a matriz óssea dissolvida. A borda enrugada indicando a ação osteoclástica.

O osso é um órgão multifacetado que consiste em vários tecidos, como o osso cortical e o osso esponjoso com o compartimento da medula e o periósteo. Cada tecido é composto por uma série de células diferenciadas e precursoras (Bauer *et al.*, 2000). Juntas formam um órgão complexo com papéis fisiológicos importantes dentro do corpo. As propriedades biomecânicas do sistema esquelético desempenham um papel crucial no suporte estrutural, na sustentação de carga para movimento e na proteção física dos órgãos internos. Além das funções de armazenamento mineral e homeostase do cálcio, o órgão ósseo tem importantes funções hematopoiéticas e imunológicas como o local de geração de células sanguíneas e diferenciação de células imunes (Takayanagi *et al.*, 2004).

A homeostase do sistema esquelético está na dependência de uma remodelação equilibrada, ou seja, da dinâmica balanceada entre a atividade dos osteoblastos células de formação óssea, e osteoclastos, células de reabsorção óssea. Este balanço é firmemente controlado por alguns sistemas regulatórios, como o sistema imune. Um balanço desfavorável pode acarretar reabsorções patológicas, como nas periodontites, artrites reumatóides e doenças osteoporóticas

(Sims *et al.*, 2008). A mineralização começa com o osteoblasto formando vesículas especializadas ligadas à membrana, chamadas vesículas da matriz, dentro de seu citoplasma, contendo enzimas como fosfatase alcalina, íons como cálcio e fosfato e outras moléculas necessárias para a mineralização. Pequenos aglomerados minerais amorfos, que servem como locais de nucleação para a formação de cristais de hidroxiapatita, são liberados no espaço extracelular, onde continuam a crescer, alinhar-se e integrar-se às fibras de colágeno do osteoide. Íons de cálcio e fosfato da corrente sanguínea são depositados na estrutura de colágeno, formando cristais de hidroxiapatita (Subramaniam *et al.*, 2023).

1.1.2. As células do tecido ósseo

1.1.2.1. Os Osteoblastos

Os osteoblastos secretam o colágeno tipo I como proteína mais abundante da matriz extra celular, compreendendo cerca de 10% da massa óssea. Duas cadeias de procolágeno $\alpha 1$ (codificadas pelo gene *COL1A1*) e uma cadeia $\alpha 2$ (*COL1A2*) são automontadas em uma hélice tripla, que são estão alinhadas lado a lado e longitudinalmente, reticuladas e, finalmente, construídas em fibras de colágeno (Ito e Nagata; 2021). Durante a ossificação, o mesênquima se condensa e se torna altamente vascularizado, permitindo a diferenciação de algumas células em osteoblastos, que iniciam a deposição da matriz óssea não mineralizada, chamada tecido osteóide. Posteriormente, o fosfato de cálcio se incorpora à matriz, promovendo sua mineralização. Os osteoblastos interagem ativamente com osteoclastos e osteócitos, desempenhando um papel fundamental na manutenção da massa óssea (Grigoriadis *et al.*, 1988; Capulli *et al.*, 2014). Os osteoblastos, exibem um citoplasma abundante em retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi, estruturas indispensáveis para a síntese, modificação e secreção das proteínas que compõem a matriz óssea. Esses osteoblastos depositam predominantemente colágeno tipo I (espinha dorsal da matriz orgânica), além de outras proteínas não colagênicas, tais como Osteocalcina (OCN) Osteopontina (OPN) e outras proteínas sialoproteicas, que desempenham funções essenciais na mineralização e regulação do metabolismo ósseo (Florencio *et al.*, 2015). Os osteoblastos derivam de células-tronco mesenquimais (CTMs) que residem na

medula óssea. O desenvolvimento dos osteoblastos requer a ativação da sinalização Wnt/ β -catenina e a expressão de vários fatores de transcrição mestres, incluindo o *Runx2*, *osterix (Osx)* e o *homeobox 5 Distal-less (DLX5)* (Hill *et al.*, 2005; Yoshida *et al.*, 2002). Essa diferenciação osteogênica é controlada por diferentes fatores moleculares, principalmente pertencentes às vias das BMPs. Essa célula osteoprogenitora torna-se, então, um pré-osteoblasto, seguindo a transcrição de genes osteogênicos precoces, como a *fosfatase alcalina (ALP)* e a *COL1A1*, cuja expressão é então mantida durante toda a vida dos osteoblastos maduros, além de outros marcadores osteoblásticos comuns, como *OPN*, *sialoproteína II óssea (BSP II-* do inglês *Bone sialoprotein*) e *OCN*. Após deposição óssea pelos osteoblastos, haverá três destinos possíveis: (1) sofrer apoptose; (2) tornar-se células de revestimento ósseo; ou (3) tornar-se osteócitos (Ponzetti *et al.*, 2021).

1.1.2.2. Os Osteócitos

Os osteócitos estão localizados dentro de lacunas circundadas por matriz óssea mineralizada, onde apresentam morfologia dendrítica, os osteócitos são derivados da linhagem de MSCs por meio da diferenciação de osteoblastos. Nesse processo, quatro estágios reconhecíveis foram propostos: osteócito-osteóide, pré-osteócito, osteócito jovem e osteócito maduro (Florencio *et al.*, 2015).

A comunicação entre células também é realizada por um fluido intersticial que flui pelos canálculos dos osteócitos. Essa rede é essencial na coordenação da resposta do osso aos sinais mecânicos e biológicos (Civitelli *et al.*, 2008), diferentemente dos osteoblastos e osteoclastos, que foram definidos por suas respectivas funções durante a formação e reabsorção óssea, os osteócitos foram definidos apenas por sua morfologia e localização. Durante décadas, devido às dificuldades em isolar os osteócitos da matriz óssea, levou-se à noção errônea de que essas células seriam células passivas, e suas funções foram mal interpretadas (Boyce e Xing, 2008).

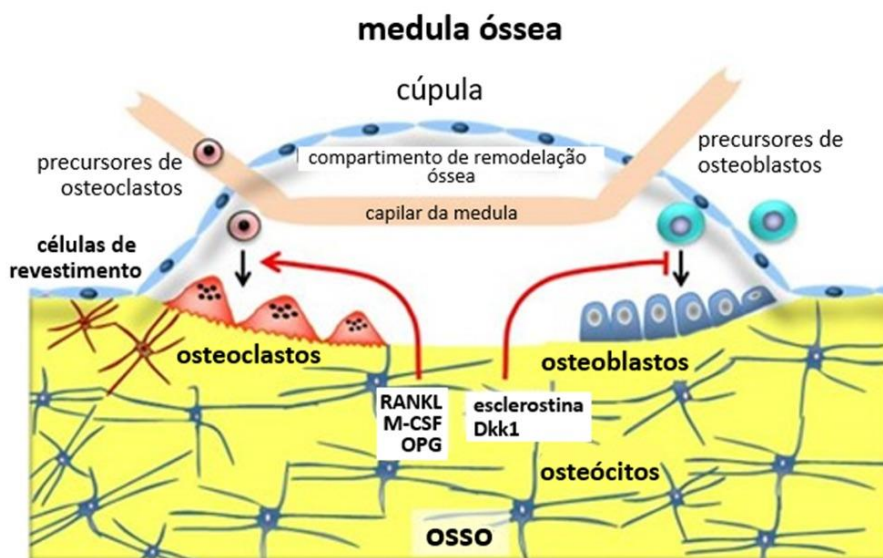
Uma vez que ocorre a mineralização do osteoide, a ultraestrutura do osteócito passa por novas mudanças, com redução do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi, o que corresponde a uma diminuição na síntese e secreção de proteínas. Neste estágio, muitos dos marcadores previamente expressos nos osteoblastos, incluindo *OCN*, *BSP II*, *colágeno tipo I* e *ALP*, estão regulados

negativamente ou silenciados, enquanto os marcadores dos osteócitos, como a proteína da matriz dentinária 1 (DMP1) e *Sost*, encontram-se em níveis elevados (Capulli *et al.*, 2014).

De fato, demonstrou-se que a apoptose dos osteócitos é um evento regulador para a formação dos osteoclastos. Essa apoptose ocorre em condições específicas, principalmente após a menopausa ou sob condições patológicas, como microfraturas, estando intimamente associada ao aumento da reabsorção óssea. Deste modo, osteócitos apoptóticos expressam níveis mais elevados de fatores que promovem a osteoclastogênese, como *RANKL*, *TNF-alfa*, *IL-6* e *IL-1*, em comparação com osteócitos normais (Franz-Odenaal *et al.*, 2006).

É sabido também que osteócitos maduros embutidos na matriz secretam seletivamente esclerostina, o produto do gene *Sost*, que antagoniza vários membros da família de proteínas BMP e se liga a LRP5/LRP6, prevenindo a sinalização Wnt canônica (Bellido *et al.*, 2005), evitando assim a osteoclastogênese (Figura 2). Um estudo recente concluiu que a integrina $\alpha 5$ é essencial para a resposta osteogênica dos osteócitos à carga mecânica, sua ausência compromete a sobrevivência osteocítica, reduz a atividade osteoblástica endosteal e atenua a sinalização via β -catenina, indicando seu papel central na mecanotransdução óssea.

Figura 2: Mecanismo dos Osteócitos na remodelação óssea.



Fonte: (Bellido et al; 2019)

Legenda: Osteócitos apoptóticos podem iniciar a remodelação óssea enviando sinais para células de revestimento, que se retraem da superfície óssea para formar uma estrutura chamada compartimento de remodelação óssea (BRC). Os precursoros de osteoclastos são transportados para o BRC pelos capilares da medula, diferenciam-se em osteoclastos maduros sob a influência de citocinas pró e anti-osteoclastogênicas (RANKL, M-CSF e OPG) derivadas de osteócitos e iniciam a remodelação óssea. Os precursoros de osteoblastos da medula óssea ou da circulação diferenciam-se em células maduras sintetizadoras de osso em resposta a fatores liberados da matriz óssea pela reabsorção. A diferenciação e a função dos osteoblastos são controladas por moléculas derivadas de osteócitos, incluindo esclerostina e Dkk1.

1.1.2.3. Os Osteoclastos

Os osteoclastos são células multinucleadas terminalmente diferenciadas, que se originam de células mononucleares da linhagem de células-tronco hematopoiéticas, sob a influência de vários fatores (Florencio *et al.*, 2015). Em resposta a vários hormônios de reabsorção óssea, os osteoblastos/células estromais produzem as citocinas essenciais o M-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos) e RANKL (Sims *et al.*, 2008). O M-CSF e o RANKL são fatores-chave para a diferenciação e função dos osteoclastos. O M-CSF é um fator de crescimento essencial para a diferenciação e sobrevivência de células mieloides (Mun *et al.*, 2020). RANKL, um membro da família TNF, induz a diferenciação, sobrevivência, fusão e ativação dos osteoclastos (Matsumoto *et al.*, 2004).

Os osteoclastos têm o papel de manter a homeostase da matriz óssea durante o desenvolvimento e a remodelação esquelética, e assim devem atender eficientemente às suas demandas energéticas para reabsorção óssea dentro de sua vida útil relativamente curta e dissolver os componentes inorgânicos e orgânicos da matriz óssea, aderindo firmemente à superfície óssea (Deng *et al.*, 2024). Os citoesqueletos dos osteoclastos criam um microambiente isolado entre a membrana plasmática das células e a superfície óssea, onde o mineral da matriz é mobilizado pelo meio ácido e a matriz orgânica é degradada pela protease lisossomal, catepsina K (Arriaga *et al.*, 2019). Por esse mecanismo de selamento e secreção, eles degradam simultaneamente a matriz e dissolvem o mineral do osso, ao mesmo tempo em que protegem as células vizinhas dos efeitos nocivos do HCl. A sinalização mediada por *RANKL* e integrina da matriz óssea ativa os osteoclastos (Teitelbaum *et al.*, 2006). Deste modo, o gene *RANKL* é um fator crucial para a osteoclastogênese e é expresso por osteoblastos, osteócitos e células estromais. Quando *RANKL* se liga ao seu receptor *RANK* nos precursores dos osteoclastos, a osteoclastogênese é induzida (Sodek e Mckee, 2000).

Por outro lado, outro fator chamado OPG, que é produzido por uma ampla gama de células, incluindo osteoblastos, células estromais e fibroblastos gengivais e periodontais se liga ao *RANKL*, impedindo a interação *RANK/RANKL* e, conseqüentemente, inibindo a osteoclastogênese (Boyce e Xing, 2008). As células osteoclásticas desempenham um papel crucial na remodelação óssea ao reabsorver as porções de osso que se encontram danificadas ou que precisam ser substituídas para manter a integridade estrutural. Essa ação de reabsorção, coordenada com a formação de novo osso pelos osteoblastos, garante que o tecido ósseo se adapte às exigências mecânicas e biológicas impostas ao longo da vida (Sodek e McKee, 2000).

1.1.3. A formação e a remodelação óssea

A diferenciação em direção à linhagem osteogênica é controlada por diferentes fatores moleculares, principalmente pertencentes às vias das BMPs, onde células osteoprogenitoras comuns, se tornam ainda mais diferenciadas após a ativação de fatores transcricionais osteogênicos, como *RUNX2*, *Osterix* e *DLX5*. Essa célula osteoprogenitora torna-se, então, um pré-osteoblasto, seguindo a transcrição de genes osteogênicos precoces, como *ALP* e *COL1A1*, cuja expressão é então mantida durante toda a vida dos osteoblastos maduros, além de outros marcadores osteoblásticos comuns, como *OPN*, sialoproteína II óssea (*BSP II*- do inglês Bone sialoprotein) e *OCN* (Ponzetti *et al.*, 2021). A sinalização canônica Wnt/ β -catenina fornece um microambiente osteogênico para BMSCs (Lei; 2018). A via Wnt/ β -catenina é frequentemente referida como o caminho canônico que promove a determinação do destino celular, a proliferação e sobrevivência, através do aumento dos níveis da β -catenina e da expressão gênica pelo fator de transcrição *Frizzled* (*Lef/Tcf*). A ativação desta via de sinalização intensificador linfóide/T ocorre com a ligação de Wnt a *Frizzled* (Krishnan *et al.*, 2006).

Durante a sequência de proliferação celular da osteogênese, *RUNX2* regula a expressão de genes que codificam osteocalcina, Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), RANKL, esclerostina e *Osterix* (Qin *et al.*, 2022). E a diferenciação de osteoblastos requer a atividade de fatores de transcrição específicos. Esses fatores de transcrição são expressos e funcionam em pontos de tempo distintos durante o processo de diferenciação, definindo assim vários estágios de desenvolvimento da linhagem de osteoblastos (Long, 2012). Diversos fatores, sejam eles parácrinos, autócrinos ou endócrinos, influenciam o desenvolvimento e a maturação dos osteoblastos. Entre esses, destacam-se as BMPs, os fatores de crescimento (como FGF e IGF), os fatores angiogênicos (por exemplo, endotelina-1, além de hormônios como o paratormônio (PTH) e agonistas de prostaglandina. Esses elementos modulam a diferenciação dos osteoblastos e, em especial, a ação do PTH e das BMPs está fortemente vinculada à ativação das vias de sinalização Wnt (Hauge *et al.*, 2001).

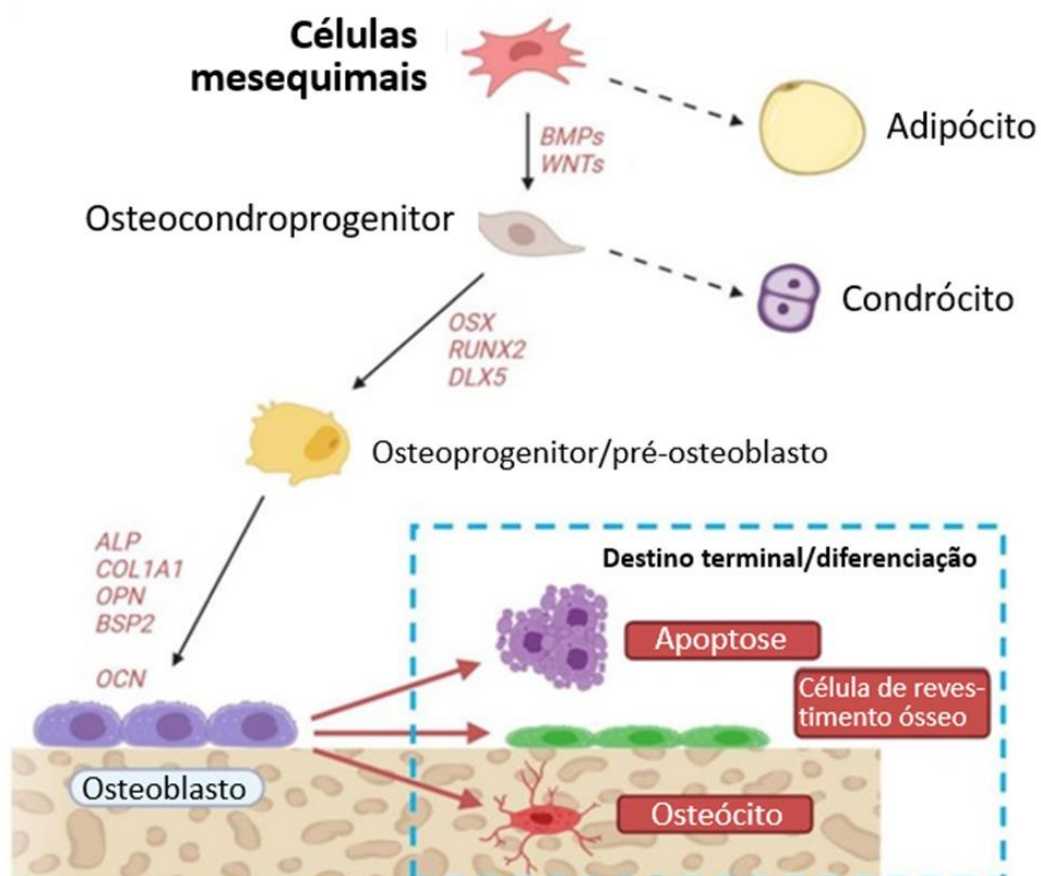
A remodelação óssea mantém a resistência óssea e a homeostase mineral-cálcica, e envolve células ósseas, incluindo osteoclastos reabsorventes de osso, osteoblastos formadores de osso, osteócitos e células de revestimento ósseo

(Hauge *et al.*, 2001). Sendo assim, um processo altamente complexo pelo qual o osso antigo é substituído por osso novo, em um ciclo composto por três fases: (1) início da reabsorção óssea pelos osteoclastos, (2) a transição (ou período de reversão) da reabsorção para a formação de novo osso e (3) a formação óssea pelos osteoblastos (Sims *et al.*, 2008).

Estudos mostram a atividade das prostaglandinas no tecido ósseo pela manutenção do equilíbrio da remodelação óssea e suas reações a mediadores humorais e estresse mecânico (Lisowska *et al.*, 2018). São conhecidas como metabólitos do ácido araquidônico, atuando por meio de receptores de membrana específicos e desempenhando um papel importante na regulação das funções dos osteoblastos e osteoclastos (Blackwell *et al.*, 2010). A prostaglandina PGE2, com seus quatro receptores definidos (EP1R, EP2R, EP3R e EP4R), é crucial para manter o turnover ósseo equilibrado (Hata *et al.*, 2004). A maioria dos dados confirmam que, entre as prostaglandinas, a PGE2 participa de todos os processos de resposta ao trauma, incluindo homeostase, inflamação e cicatrização, e desempenha um papel fundamental na fisiologia óssea (Lisowska *et al.*, 2018).

Uma vez que os osteoblastos terminam seu trabalho de depor o osso onde ele é necessário, eles têm três destinos possíveis: (1) sofrer apoptose; (2) tornar-se células de revestimento ósseo; ou (3) tornar-se osteócitos (Ponzetti *et al.*, 2021) (Figura 3).

Figura 3: Diferenciação Celular



Fonte: Ponzetti e Rucci (2021)

Legenda: Destino de células-tronco mesenquimais, que podem se diferenciar em adipócitos, condrócitos ou, via osteocondroprogenitores, em osteoblastos. A progressão para pré-osteoblasto é regulada pelos fatores de transcrição OSX, RUNX2 e DLX5. Osteoblastos expressam marcadores como ALP, COL1A1, OPN e BSP2. O destino final dos osteoblastos inclui apoptose, transdiferenciação em células de revestimento ósseo ou diferenciação em osteócitos.

1.1.4. Genes relacionados a formação e a remodelação óssea

1.1.4.1. Fosfatase Alcalina (ALP)

A ALP é uma ectoenzima ancorada em glicosilfosfatidilinositol que catalisa a hidrólise de vários compostos de éster de fosfato em fosfato inorgânico (P_i) e álcool (Komori *et al.*, 1997). A fosfatase é codificada pelo gene *ALPL* expresso ricamente no osso, fígado e rim, mas também no sistema nervoso central, fibroblastos e tipos de células endoteliais (Weiss *et al.*, 1988). Esses genes são usados como

marcadores de osteoblastos e indicadores de formação óssea, pois são fortemente expressos em osteoblastos e vesículas da matriz no osso. A diferenciação de osteoblastos a partir de células-tronco mesenquimais é induzida pelo *RUNX2*. Esses osteoblastos regulam a calcificação óssea secretando componentes da matriz extracelular, como colágeno tipo I e OCN, e modulam a concentração local de fosfato via TNAP (Fosfatase Alcalina Não Específica de Tecido). Durante sua maturação, os osteoblastos liberam vesículas de matriz que acumulam Ca^{2+} e Pi , iniciando a formação de hidroxiapatita. Em uma segunda fase, a liberação desses cristais promove a continuidade da mineralização, sendo a ALP essencial para ao hidrolisar PPi em Pi (Millán et al., 2012).

Em um estudo com o objetivo de investigar os efeitos do miR-21 na função dos osteoblastos foi observado um aumento da atividade ALP e mineralização acelerada da matriz foram observados em células MC3T3-E1 pré-osteoblastos de camundongos em comparação com o grupo de não indução (controle). O miR-21 regula positivamente a diferenciação e a mineralização óssea (Oka et al., 2019). Em um estudo que se buscava investigar os efeitos do miR-21 na função dos osteoblastos foi observado o aumento da atividade da ALP e mineralização acelerada da matriz em células MC3T3-E1 pré-osteoblastos de camundongos, em comparação com o grupo de não indução (controle) (Oka et al., 2020).

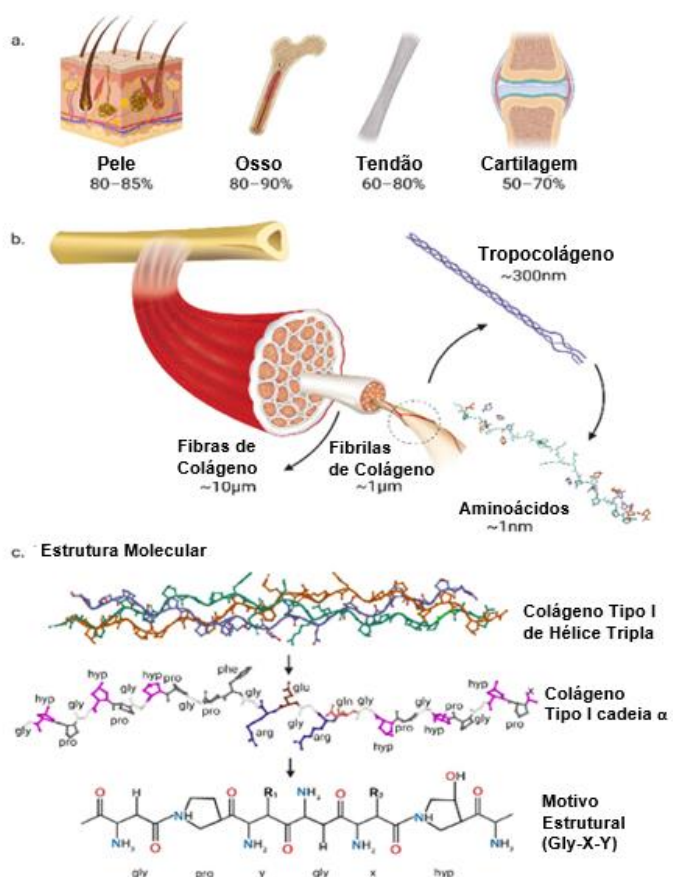
1.1.4.2. Colágeno tipo 1

O colágeno é a proteína estrutural mais abundante encontrada em humanos e mamíferos, particularmente na matriz extracelular (MEC). Sua função primária é manter o corpo unido. A superfamília de proteínas do colágeno inclui mais de 20 tipos que foram identificados. No entanto, o colágeno tipo I é o principal componente em muitos tecidos (Amirrah et al., 2022) (Figura 4). Os tecidos ósseos têm mais de 90% de colágeno tipo I com uma pequena quantidade de colágeno tipo V com cristais de hidroxiapatita (HA) ancorados pela estrutura de colágeno (Fedarko et al., 2013). O colágeno mineralizado é a unidade elementar do osso e é responsável por suas propriedades mecânicas únicas; a combinação sinérgica de estrutura mineral inorgânica rígida acoplada a uma rede de colágeno mais deformável e macia (Olamma et al., 2009). No osso, a rede de colágeno com cristais de HA forma

um composto altamente complexo e intimamente entrelaçado, ordenado, que é organizado em lamelas, ou camadas, que têm apenas alguns microns de espessura. A estrutura de colágeno é predominantemente fibrilas de colágeno tipo I em tramas concêntricas de matrizes 3D elaboradas, e os cristais de HA ancorados têm 28 nm de largura, 50 nm de comprimento e 2 nm de espessura (Cui *et al.*, 2007). O colágeno mineralizado, é constituído principalmente por cristais à base de fosfato de cálcio, que no osso são encontrados consistindo principalmente de íons de cálcio e fosfato, com traços de íons de magnésio, carbonato, hidroxila, cloreto, flúor e citrato (Cui *et al.*, 2007). O osso é formado por osteoblastos que secretam osteoide (Robin *et al.*, 2024), neste processo *RUNX2* é um dos fatores de transcrição precoce mais importantes responsáveis pela diferenciação osteoblástica (Karsenty 2003, Wu *et al.*, 2016). A expressão de *RUNX2* depende da sinalização Wnt, que leva a altos níveis de β -catenina em MSCs. Por sua vez, *RUNX2* induz a expressão posterior do gene do fator de transcrição *Osterix*, também envolvido na diferenciação de MSCs em osteoblastos. Esta célula osteoprogenitora comprometida torna-se então um pré-osteoblasto, seguindo a transcrição de genes osteogênicos iniciais, como a *ALP* e a cadeia de colágeno $1\alpha 1$ (*COL1A1*), cuja expressão é então mantida durante toda a vida dos osteoblastos maduros (Ponzetti *et al.*, 2021). Após a diferenciação completa, os osteoblastos produzem uma MEC fibrilar rica em colágeno tipo I não mineralizada: o osteoide (Karaplis *et al.*; 2008).

Existem etapas bem conhecidas dependentes de enzimas da formação de colágeno que são reguladas por miRNA específico de tecidos, visando o mRNA *COL1A1* e vários outros fatores de codificação de mRNA relevantes para a formação de colágeno (Cava *et al.*, 2019)

Figura 4: Fontes de colágeno tipo I e conteúdo aproximado em cada tecido.



Fonte: Amirrah *et al.*, 2022

Legenda: ilustração do conteúdo aproximado de colágeno tipo I em tecidos específicos isolados da pele, osso, tendão e cartilagem. O potencial clínico desses colágenos está ganhando precedência, particularmente em tecidos ósseos e cutâneos

1.1.4.3. A Osteoprotegerina (OPG)

A OPG também denominada de TNFRSF11B, foi identificada inicialmente durante esforços para descobrir homólogos do TNFRSF em ratos. Posteriormente, os homólogos de OPG em humanos e camundongos foram identificados, apresentando uma homologia superior a 85% (Simonet *et al.*, 1997; Walsh *et al.*, 2014). A alta massa óssea nos camundongos foi associada com reduções acentuadas no número e na atividade dos osteoclastos. A proteína foi então denominada “osteoprotegerina” (Rodan *et al.*, 1986). A OPG é expressa principalmente por células estromais da medula óssea, mas pode ser induzida em linfócitos B, DCs e DCs foliculares (Yun *et al.*, 1998). Ela é formada por sua vez,

pelos osteoblastos quando estes reagem com citocinas, como o estrogênio, o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), e as BMPs. A OPG ainda pode ser produzida em células do ligamento periodontal, em fibroblastos gengivais e em células epiteliais (Pereira *et al.*, 2011). A OPG é altamente expressa na placenta e em outros órgãos, incluindo a pele, pulmão, fígado, artérias e trato gastrointestinal, tanto em níveis de mRNA, quanto de proteína (Simonet *et al.*, 1997). O silenciamento da OPG em células osteoblásticas leva à osteopenia grave sem afetar a OPG sérica (Tsukakasi *et al.*, 2020). Esta proteína é um receptor que se liga ao RANKL competindo com o RANK. A frequência de OPG produzida regula a massa óssea, pelo que uma alta frequência de OPG faz com que o RANKL esteja menos disponível para ligação com o RANK e favorecendo assim o aumento da massa óssea, enquanto uma baixa frequência de OPG faz com que o RANKL se torne mais disponível para a ligação com o RANK favorecendo a reabsorção e diminuição da massa óssea (Baud'huin *et al.*, 2007; Narducci e Nicolin, 2009; Duarte *et al.*, 2009).

1.1.4.4. O fator de transcrição relacionado ao runt 2 (RUNX2)

RUNX2 é um membro da família *RUNX* de fatores de transcrição abundantemente expressos em cartilagem e osso calcificados, e é considerado um interruptor regulador mestre essencial para a diferenciação osteoblástica (Arvidson *et al.*, 2011). O fator de transcrição *RUNX2* é expresso na célula mesenquimal pluripotente inicial antes de expressão do fenótipo osteoblástico e aumenta durante a diferenciação osteoblástica, consistente com seu papel genético na maturação do fenótipo de osteoblasto (Banerjee *et al.*, 1997; Komori *et al.*, 1997). A atividade de *RUNX2* promove a diferenciação osteoblástica, e contribui para a regulação da renovação óssea, favorecendo a expressão de osteoprotegerina (OPG), uma molécula secretada pelos osteoblastos que inibe a formação e ativação dos osteoclastos (Thirunavukkarasu *et al.*, 2000). A haploinsuficiência de *Runx2* em camundongos ou *RUNX2* em humanos levou a clavículas hipoplásicas e fechamento tardio das fontanelas, defeitos que são característicos da displasia cleidocraniana em humanos (Lee *et al.*, 1997). Na sinalização WNT dependente da β -catenina, o processo inicia quando proteínas WNT se ligam aos seus receptores Frizzled e aos co-receptores LRP5 ou LRP6. Essa ligação impede a degradação

da β -catenina, fazendo com que ela se acumule dentro da célula. A β -catenina então migra para o núcleo e ativa a transcrição de genes relacionados à osteogênese. Como resultado as células expressam RUNX2 e OSX formando osteoblastos maduros, essenciais para a formação óssea (Long, 2012). Em um estudo recente, demonstraram que *RUNX2* regula positivamente a expressão do gene *Fam102a* por meio de sua ligação a uma região intensificadora (*enhancer*), e não ao promotor clássico. A superexpressão de *Fam102a* em pré-osteoblastos MC3T3-E1 resultou em aumento da expressão de *SP7* (Osterix) e promoção da diferenciação osteoblástica. Em contrapartida, a inibição de *Fam102a* levou à redução de *SP7* e à inibição do processo de osteoblastogênese. Além disso, a deleção dos sítios de ligação de RUNX2 na região intensificadora aboliu a ativação transcricional de *Fam102a*, evidenciando que sua expressão depende diretamente da ação de RUNX2 (Yamashita *et al.*; 2025).

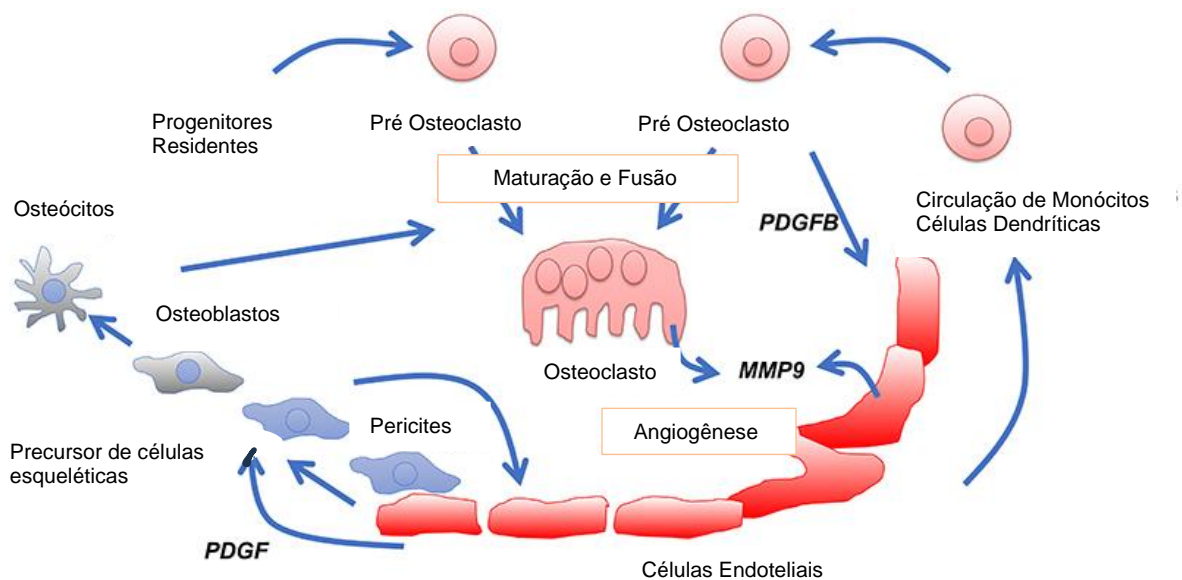
1.1.4.5. O Receptor Activator of NF- κ B Ligand (*RANKL*)

A descoberta do sistema RANKL/RANK/OPG na regulação da reabsorção óssea, em meados da década de 1990, levou a grandes avanços em nossa compreensão de como a modelagem e a remodelação óssea são reguladas (Boyce *et al.*, 2008). RANKL existe como uma proteína homotrimérica e é tipicamente ligada à membrana em células T osteoblásticas e ativadas ou é secretada por algumas células, como células T ativadas (Takayanagi *et al.*, 2007). A maioria dos fatores conhecidos por estimular a formação e atividade de osteoclastos induz a expressão de *RANKL* por células estromais osteoblásticas. No entanto, *RANKL* também é altamente expresso em linfonodos, timo, glândulas mamárias e pulmão e em níveis baixos em uma variedade de outros tecidos, incluindo baço e medula óssea (Kearns *et al.*, 2007).

A função principal da proteína RANKL é estimular a diferenciação dos osteoclastos e inibir a apoptose dos mesmos (Mine *et al.*, 2010). RANKL pode ser denominada de diferentes formas na literatura, tais como: citocina relacionada com o TNF, indutora de ativação (TRANCE), ligante da osteoprotegerina (OPGL), fator de diferenciação dos osteoclastos (ODF) (Baud'huin *et al.*, 2007). É uma proteína de membrana do tipo I, que se expressa na superfície de osteoclastos e em células dendríticas facilitando a sinalização imunológica (Pereira *et al.*, 2011). A ligação de

RANKL a RANK resulta no recrutamento de uma proteína adaptadora conhecida como TRAF 6 (fator 6 associado ao receptor de TNF) para locais específicos dentro do domínio intracelular de RANK. TRAF 6 atua como um segundo mensageiro para ativar várias vias de proteína quinase, bem como fatores de transcrição, incluindo fator nuclear-B (NF- κ B). O NF- κ B ativado transloca-se para o núcleo e regula positivamente a expressão de c-fos, que então interage com o fator nuclear de células T ativadas (NFAT)-c1 induzindo a osteoclastogênese (Kearns *et al.*, 2009). A tríade molecular OPG, RANK e RANKL apresenta o seguinte consenso, a OPG atua como um receptor chamariz, ligando-se à RANKL e impedindo que ela se conecte e ative o RANK. Essa inibição resulta na rápida interrupção da formação, fixação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos (Schneeweis *et al.*, 2005).

Figura 5: Osteoclasto e crosstalk.



(Tuckermann *et al.*, 2021)

Legenda: Os osteoclastos são gerados pela maturação e fusão de células mieloides residentes e precursoras circulantes, estas últimas derivadas da circulação. A molécula de sinalização limitante da taxa de fusão é a RANKL, liberada principalmente por osteócitos e osteoblastos, derivadas de células precursoras esqueléticas frequentemente perivasculares. A RANKL precisa exceder a ação antagonista da osteoprotegerina (Opg). Pré-osteoclastos não fundidos são gatilhos essenciais da angiogênese via PDGF-B, enquanto osteoclastos maduros foram sugeridos para facilitar a angiogênese pela degradação da matriz extracelular.

A remodelação óssea é um processo que depende do equilíbrio entre a formação óssea pelos osteoblastos e a reabsorção óssea pelos osteoclastos. O eixo RANK/RANKL/OPG desempenha papel central nesse equilíbrio, (Feng e McDonald; 2011). Os miRNAs foram identificados como reguladores importantes deste eixo. Em particular, o miR-21 tem sido associado ao aumento da atividade osteoclástica, promovendo a expressão de RANKL e reduzindo a expressão de OPG em condições patológicas, como a osteoporose e a reabsorção óssea em múltiplos mielomas (Hu *et al.*, 2017; Pitari *et al.*, 2015).

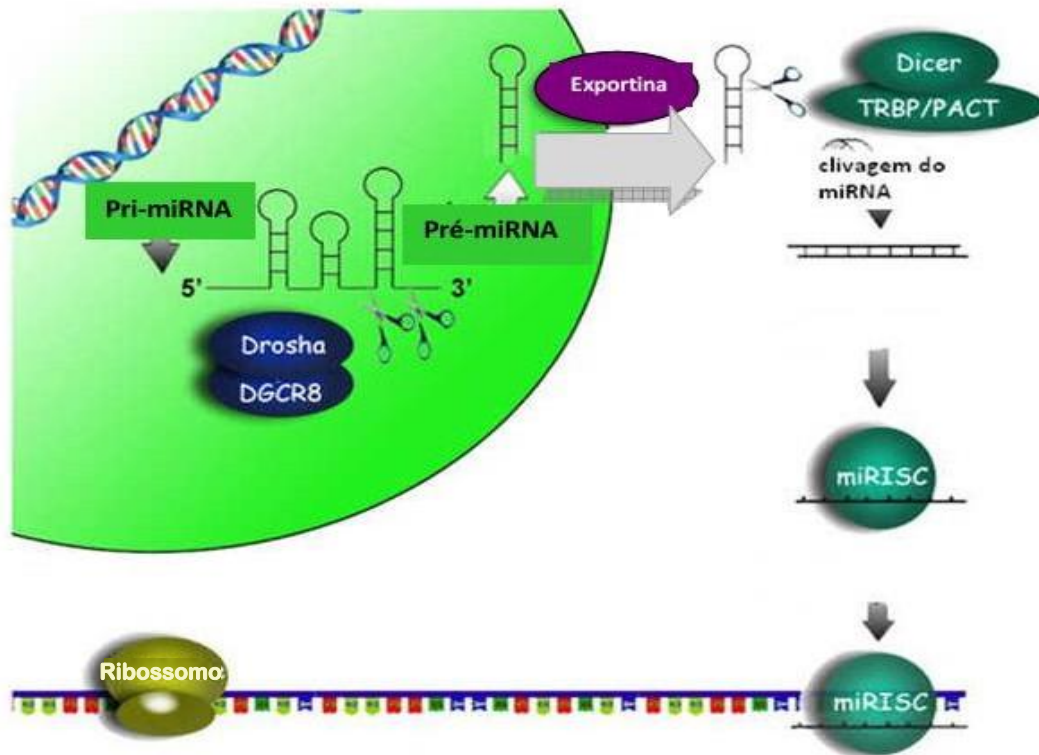
1.1.5. Os MicroRNAs (miRNAs)

A descoberta de microRNAs (miRNAs) em 1993, seguida por desenvolvimentos e descobertas na biologia de pequenos RNAs, redefiniram o cenário biológico, alterando significativamente os dogmas de longa data que definiam a regulação genética (Bhaskaran *et al.*, 2014). Estes pequenos RNAs desempenham um papel significativo na modulação de uma série de processos fisiológicos e patológicos que vão desde o desenvolvimento embrionário até a progressão neoplásica. Assinaturas únicas de miRNA de várias doenças hereditárias, metabólicas, infecciosas e neoplásicas acrescentaram uma nova dimensão aos estudos que analisam a sua patogênese e destacam o seu potencial para serem biomarcadores fiáveis (Bhaskaran *et al.*, 2014).

MicroRNAs (miRNAs) são RNAs endógenos de ~22 nucleotídeos que podem desempenhar papéis reguladores importantes em animais e plantas. Embora tenham passado despercebidos até recentemente, os miRNAs compreendem uma das classes mais abundantes de moléculas reguladoras de genes em organismos multicelulares e provavelmente influenciam a produção de muitos genes codificadores de proteínas (Bartel *et al.*, 2004). Os miRNAs podem atuar intracelularmente ou ser secretados ativamente pelas células e contribuir para a comunicação intercelular ou célula-tecido. Eles ligam as regiões 3'-UTR nos mRNAs e promovem a repressão ou degradação translacional com base, respectivamente, em suas complementaridades imperfeitas ou perfeitas com o mRNA alvo (Monti, 2022). Os miRNAs são transcritos como longos transcritos primários (pri-miRNAs) cuja maturação ocorre através de eventos de processamento sequencial: o processamento nuclear dos pri-miRNAs em

precursores de ~ 70 nucleotídeos (pré-miRNAs) e o processamento citoplasmático de pré-miRNAs em miRNAs maduros (Lee *et al.*, 2002).

Estas moléculas são principalmente transcritas pela RNA polimerase II como precursores de moléculas de miRNA primário (pri-miRNA) . Em animais a primeira etapa de processamento, ocorre no núcleo onde a *RNase III Drosha* atua sobre os pri-mRNAs gerando um pré-miRNA, um pequeno duplex de RNA de ~ 65-70 nucleotídeos com formato *hairpin* (Figura 6). Esta ação pode ser facilitada por proteínas de processamento de RNA, como a hnRNP A1. Os pré-miRNAs são então exportados para o citoplasma por um complexo receptor de transporte nuclear, exportina-5 – RanGTP onde são processados pelo *Dicer* em miRNAs maduros de ~ 22 nt (duplexes de miRNA-miRNA*, onde o miRNA é o *antisense*, ou fita guia / madura, e o miRNA* é o sentido, ou fita passageira) (Gomes, 2013).

Figura 6: Biogênese do MicroRNA.

Fonte: Lawrie, 2013.

Legenda: O processamento de microRNAs inicia-se com transcrição de seu gene pela RNA polimerase II, gerando um longo transcrito primário (pri-miRNA). A enzima Drosha cliva o pri-miRNA no núcleo produzindo o pré-miRNA. O pré-miRNA contendo aproximadamente 70 nt é transportado ao citoplasma pela exportina-5. Uma vez no citoplasma, o pré-miRNA é processado pela RNase III, Dicer, gerando um miRNA fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos. A fita antisense é incorporada a um complexo de enzimas denominado RISC que guia a fita até o mRNA. Fonte: Lawrie, 2013.

Existem duas formas que podem ser utilizadas para modular a atividade de um miRNA. A primeira é a transfecção para transportar o miRNA terapêutico para dentro da célula de interesse (Davidson; McCray, 2011), cujo objetivo é conseguir as mesmas funções biológicas dos miRNAs endógenos. A segunda forma consiste em inibir a função de um miRNA usando oligonucleotídeos antisense quimicamente modificados promovendo afinidade de ligação, bioestabilidade e propriedades farmacocinéticas adequadas, conhecidos como antimisRs (Ebert e Sharp, 2010).

1.1.6. MicroRNAs na Osteogênese

Os miRNAs regulam a expressão gênica, controlando a formação óssea dependente de osteoblastos e a remodelação óssea relacionada aos osteoclastos (Ny, 2020). Vários estudos demonstraram que os miRNAs desempenham um papel importante na diferenciação osteogênica das BMSCs (Wang et al., 2019). Foi demonstrado por exemplo que o miR-2861 promove a diferenciação de osteoblastos, suprimindo a expressão da histona desacetilase 5 (HDAC5) no nível pós-tradução, contribuindo para a formação óssea (Li et al., 2009). Outros miRNAs estão envolvidos no processo de osteogênese como como miR-29, miR-125b, miR-140 e miR-133a (Mizuno et al., 2008; Miyaki et al., 2010). Com objetivo de fabricar um novo nanomaterial, e a fim de investigar seu potencial valor de aplicação no tratamento de defeitos ósseos irregulares, foram utilizadas nanoesferas de silicato de magnésio (MSNs) carregadas de microRNA-146a-5p (miR-146a) e assim fabricar um nanobiomaterial (MSN+miR-146), que demonstrou efeitos na diferenciação osteogênica de células-tronco da polpa dentária humana (hDPSCs), concluindo que o complexo MSN+miR-146 não só promoveu a regeneração óssea mas também teve um impacto positivo na modulação da resposta inflamatória e na promoção da diferenciação osteogênica (Yang et al., 2024).

Um estudo que procurava identificar os miRNAs com capacidade de regular o processo angiogênese-osteogênese, verificou que a superexpressão de miR-26a em BMMSCs, promoveu a função osteogênica através da regulação positiva no processo osteogênese-angiogênese *in vitro*. Já uma avaliação *in vivo* demonstrou que a regulação positiva do acoplamento angiogênico-osteogênico usando o miR-26, promoveu a expressão de miR-26a no defeito ósseo e no tecido circundante de maneira controlada e sustentada, melhorando significativamente a vascularização e a formação de osso (Li et al., 2013). Foi demonstrado que o miR-20 aumenta a osteogênese de células mesenquimais ósseas humanas (hBMSCs) ao diminuir a sinalização do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ) e do inibidor ligado à membrana da activina de BMP (BAMBI). De acordo com os resultados, os marcadores osteoblásticos *BMP2*, *BMP4*, *Runx2*, *Osx*, *OCN* e *OPN* estavam elevados (Sriram et al., 2014).

1.1.7. O miR-21

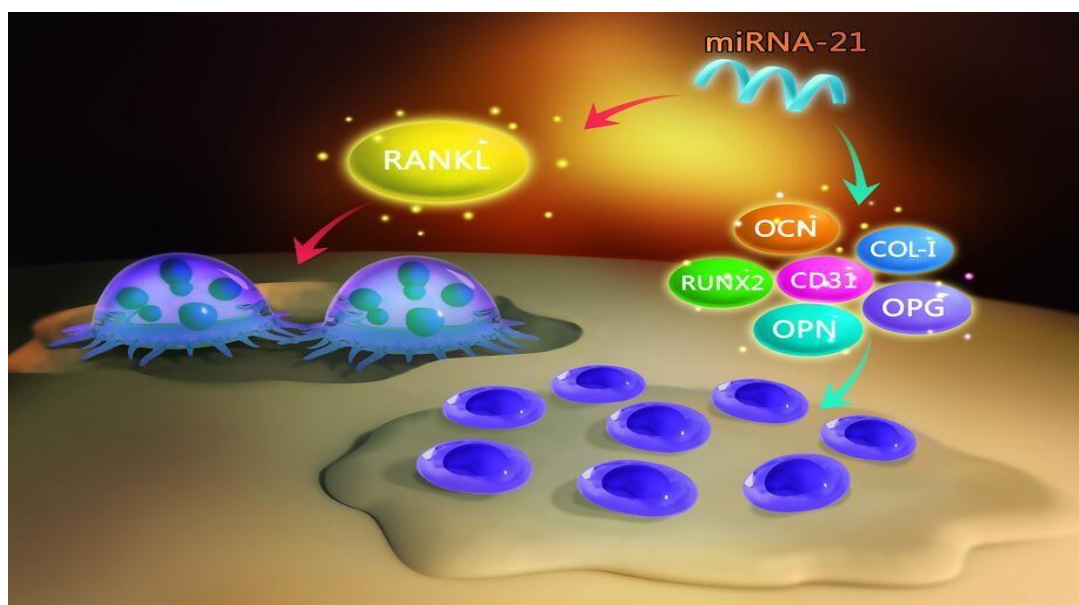
O gene hsa-miR-21 está localizado no cromossomo 17q23.2. O pri-miR-21 (transcrito primário contendo miR-21) está situado na região intrônica do gene *tmem49*. O pri-miR-21 é transcrito pelo seu próprio promotor e é finalizado com sua própria cauda poli(A). O transcrito pri-miR-21 é subsequentemente processado em miR-21 maduro (Wijnen *et al.*, 2013). O miR-21 promove a osteogênese, assim como também é um regulador da osteoclastogênese e promotor da diferenciação de osteoclastos *in vitro* (Hu *et al.*; 2011). Em outros relatos, a superexpressão de miR-21 e miR-29b em células tumorais induziu angiogênese através da regulação positiva de fatores de crescimento angiogênicos, como HIF-1a e VEGF (Li *et al.*, 2013). O miR-21 é um miRNA versátil que está envolvido em uma variedade de eventos fisiológicos e eventos fisiológicos e patológicos. Os níveis de miR-21 aumentam durante a diferenciação de células-tronco embrionárias (Gangaraju *et al.*, 2009).

O *crosstalk* intercelular entre osteoblastos e osteoclastos é mediado por miR-21 que controla a resposta da homeostase óssea, fornecendo alvos potenciais para a manutenção da função dos osteoblastos (Oka *et al.*, 2020) (Figura 7). O microRNA-21 (miR-21) tem sido identificado como um importante modulador positivo da osteogênese, atuando sobre vias de sinalização como Wnt/ β -catenina e Smad (Li *et al.*, 2017; Oka *et al.*, 2021). Outro estudo sugere que a ativação da via Wnt/ β -catenina resulta na estabilização de β -catenina citoplasmática, que, translocada ao núcleo, induz a transcrição de *RUNX2*, impulsionando a diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos maduros (Gaur *et al.*, 2010). Estudos recentes reforçam o papel pró-osteogênico do miR-21, demonstrando que exossomos derivados de pacientes com traumatismo cranioencefálico, ricos em miR-21-5p, promovem a diferenciação osteoblástica, mostrando que a supressão do miR-21 comprometeu significativamente a formação óssea, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sugerindo seu papel regulador via inibição de Smad7 (Lin *et al.*, 2019). Em um outro modelo experimental, utilizando coelhos, foi observado que a inibição de miR-21 reduziu a ativação da via ERK/TGF- β 1/Smad e prejudicou a cicatrização de fraturas (Sheng *et al.*, 2019).

Em um estudo sobre o miR-21 na formação de osteoblastos, foi relatado que este miRNA regula positivamente a diferenciação e mineralização osteogênica,

facilitando a expressão dos principais fatores osteogênicos (*ALP*, *RUNX2*, *OPN*, *OSX* e *Mef2c*) em células MC3T3-E1. E que, uma deficiência de miR-21 suprime a expressão desses fatores, tanto nos níveis de mRNA, quanto de proteína, indicando o miR-21 como regulador positivo da diferenciação osteoblástica (Oka *et al.*, 2020).

Figura 7: Indução da remodelação óssea por miR-21.



Fonte: Geng *et al.*, 2020.

Legenda: miR-21 na regulação da osteogênese e da remodelação óssea. O miR-21 influencia positivamente a expressão de genes relacionados à formação óssea, como RUNX2, OCN, OPN, COL1A1 e CD31, além de modular a expressão de OPG e RANKL, componentes-chave da via de sinalização RANK/RANKL/OPG.

Estudos *in vitro* indicaram que o miR-21 poderia não apenas promover a diferenciação angiogênica e osteogênica de MSCs, mas também aumentar a atividade osteoclástica. Os resultados imuno-histoquímicos mostraram que os níveis de expressão de OPG e RANKL aumentaram significativamente com a adição de miR-21, indicando uma rápida remodelação óssea (Geng *et al* 2020).

Pudemos observar que há a participação do miR-21 atuando diretamente na osteogênese. Assim, esse estudo se propõe a investigação da ação do miR-21, na modulação da expressão de biomarcadores envolvidos nos fatores genéticos da osteogênese.

2. JUSTIFICATIVA

A regeneração e a cicatrização óssea constituem processos biológicos complexos, caracterizados por fases dinâmicas e interdependentes: inflamação, reparo e remodelação (Oryan *et al.*, 2017). Recentemente, tem havido um interesse crescente no entendimento dos mecanismos genéticos e epigenéticos que regulam esses eventos, com destaque para os miRNAs. Os miRNAs vêm sendo reconhecidos por sua versatilidade como biomarcadores de doenças e por seu potencial terapêutico na modulação da regeneração tecidual (Cheng *et al.*, 2017).

No contexto do tecido ósseo, os miRNAs atuam como reguladores pós-transcricionais, promovendo a degradação ou a repressão translacional de mRNAs específicos, modulando a expressão de genes relacionados à diferenciação osteoblástica, remodelação óssea e mineralização da matriz (Wijnen *et al.*, 2013). Dentre eles, destaca-se o miR-21, cuja ação osteogênica já foi descrita em diferentes modelos celulares. Diante disso, este projeto propõe avaliar a influência dos mímicos e inibidores de miR-21 na expressão de genes osteogênicos em células SAOS-2. O entendimento sobre os efeitos moduladores do miR-21 pode indicar caminhos promissores para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no campo da medicina regenerativa.

Além da relevância científica, este estudo colabora com o aprimoramento técnico do grupo envolvido, fornecendo subsídios metodológicos para futuras investigações e avanço de tecnologias que poderão ser aplicadas no desenvolvimento de biomateriais e terapias celulares.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi verificar a ação de miR-21 na modulação da expressão de genes relacionados com o processo de osteogênese em uma linhagem celular derivada de tecido ósseo.

3.2. Objetivos Específicos

- Realizar a transfecção de mímicos e de antagonistas de miR-21 na linhagem de osteossarcoma, SAOS-2;
- Verificar a expressão de marcadores relacionados com o metabolismo ósseo na linhagem SAOS-2 com a utilização de duas concentrações (25ng e 50 ng) em dois intervalos de tempo (24h e 48h);
- Verificar se existe correlação entre a expressão gênica dos marcadores de metabolismo ósseo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultura de Células

Para esse estudo, foi utilizada uma linhagem de osteossarcoma (SAOS-2) proveniente da *American Type Culture Collection* (ATCC - <https://www.atcc.org/>). Estas células foram cultivadas em placas de cultura de células contendo 6 poços, em presença de antibióticos, em meio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco®, Invitrogen™ GmbH, Karlsruhe, Alemanha) (Govindan *et al.*, 2022) em temperatura de 37°C e a 5% de CO₂. Foram semeadas 5 x10⁶ células em cada poço e no momento da transfecção as células apresentavam 80% de confluência.

4.2. Transfecção com mímicos e inibidores de miR-21

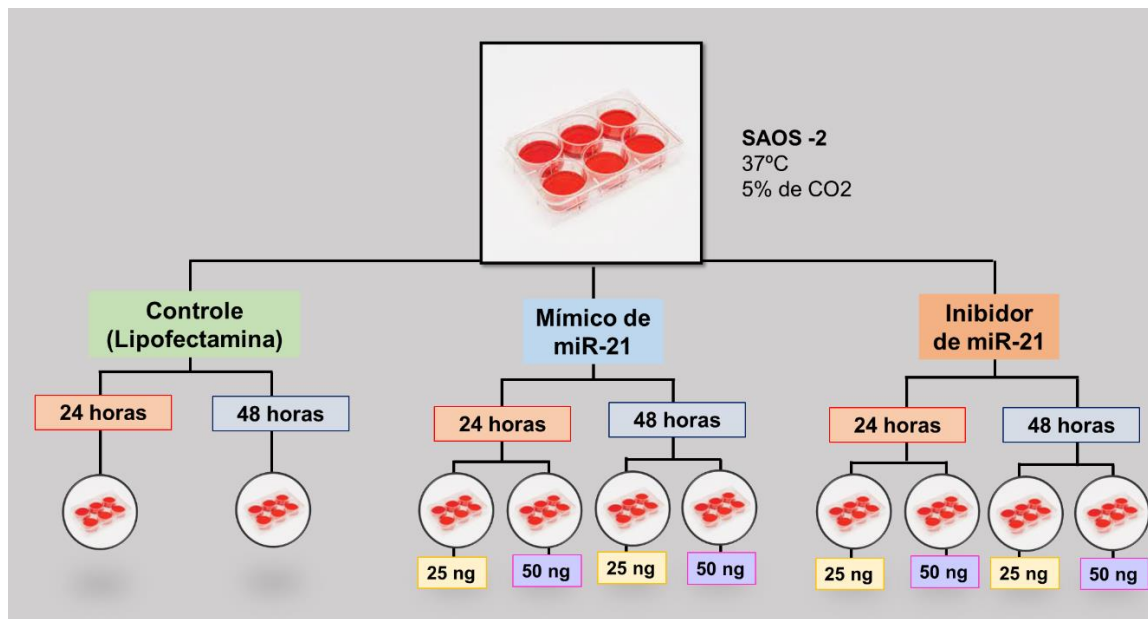
4.2.1. Preparo da solução de estoque de mímicos e inibidores de miR-21 para transfecção em SAOS2

Primeiramente, foi preparada uma solução de estoque com concentração de 100 µM de miRNAs mímicos (cat#4464066) e inibidores (cat#4464084) de miR-21 *miRVana mimic and inhibitor* (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA). Cerca de 5 nmol de miRNA mímico e inibidor foi ressuspendido usando 50 µL da água livre de nuclease, para uma concentração final de 100 µM. Essas soluções de estoque foram armazenadas a -20°C. Posteriormente, cada solução foi diluída em alíquotas de 10 µM, minutos antes da transfecção.

4.2.2. Transfecção de células de SAOS-2

Nesse estudo foram estabelecidos dez grupos para análise: o primeiro grupo denominado de grupo controle – continha células SAOS2 que receberam apenas o reagente de transfecção (Lipofectamine RNAiMAX® – ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), o segundo grupo continha as células que receberam o tratamento com mímico + lipofectamina, e o terceiro grupo continha as células que receberam o tratamento com o antagonista (inibidor) + lipofectamina. Todos estes três grupos foram cultivados em dois intervalos de tempo (24 e 48h) e em duas concentrações diferentes (25ng e 50ng) totalizando 10 grupos. Todos os experimentos foram realizados em duplicata (**Figura 8**).

Figura 8: Representação esquemática dos 10 grupos analisados neste estudo.



Legenda: A linhagem SAOS2 foi cultivada em placas de 6 poços (5,0 x10⁶ células por poço) em dez condições: grupo controle – contendo células SAOS2 apenas transfectadas com lipofectamina; grupo mímico de miR-21- contendo células SAOS2 transfectadas com mímico de miR-21 e lipofectamina; e terceiro grupo - grupo inibidor de miR-21 contendo células SAOS2 transfectadas com inibidor de miR-21 e lipofectamina. Essas células foram cultivadas em dois intervalos de tempo (24 e 48 horas) e em duas concentrações diferentes de mímicos/inibidores (25 ng e 50ng).

4.3. Análise de marcadores relacionados ao metabolismo ósseo

4.3.1. Extração do RNA total

Após a transfecção, as células foram tripsinizadas e recolhidas de cada poço. Logo após, o RNA total dessas células foi extraído pelo método do Trizol modificado (Thermo Fisher Scientific). Resumidamente, foram adicionados 300 µL de Trizol às amostras coletadas e incubadas com 1,0 µL (20 µg) de glicogênio por 5 min a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 60 µL de clorofórmio para centrifugação por 5 min para separar as fases. A fase superior foi transferida para um novo tubo de polipropileno onde o RNA foi precipitado pela adição de 0,7 volumes de isopropanol gelado, com incubação à -20 °C *overnight*. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 30 min a 4 °C a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 500 µl de etanol 70%. O *pellet* seco (30 min a temperatura ambiente) foi dissolvido em 15 µl de água livre de RNase para quantificação no espectrofotômetro Denovix DS-11 (Wilmington,

DE, EUA – Tabela 1) .

Tabela 1: Espectrofotometria do RNA total das amostras extraídas nas duplicatas experimentais

Amostra	260/280	Concentração em ng/μL
EXP1 LIPO 24H	1,81	1092,92
EXP1 LIPO 48H	1,72	557,20
EXP1 MIMC1 24H	1,55	445,98
EXP1 MIMC1 48H	1,45	1125,08
EXP1 MIMC2 24H	1,81	883,52
EXP1 MIMC2 48H	1,83	772,59
EXP1 INIB C1 24H	1,67	423,71
EXP1 INIB C2 24H	1,75	813,65
EXP1 INIB C1 48 H	1,78	754,44
EXP1 INIB C2 48H	1,81	692,05
EXP2 LIPO 24H	1,55	1352,34
EXP2 LIPO 48H	1,80	674,88
EXP2 MIM C1 24H	1,81	568,37
EXP2 MIM C1 48H	1,85	682,94
EXP2 MIM C2 24H	1,89	753,08
EXP2 MIM C2 48H	1,89	740,38
EXP2 INIB C1 24H	1,48	1805,54
EXP2 INIB C2 24H	1,51	1892,46
EXP2 INIB C1 48 H	1,56	981,63

EXP2 INIB C2 48H	1,46	960,18
-------------------------	------	--------

Legenda: EXP1 – replicata nº1; EXP2 – replicata nº2; CTR – células controle sem transfecção; MIMC1 – mímico à concentração de 25 ng; MIMC2 – mímico à concentração de 50 ng; INIBC1 – inibidor à concentração de 25 ng; INIBC2 – inibidor à concentração de 50 ng; LIPO – células transfectadas apenas com a lipofectamina

4.3.2. *Confecção das moléculas de cDNA dos marcadores de metabolismo ósseo*

Para a confecção das moléculas de cDNAs, foi utilizado o protocolo do kit QuantiTect ReverseTranscription kit (Qiagen, Venlo, Baixos) conforme as condições fornecidas pelo fabricante. Resumidamente, o DNA genômico foi eliminado das amostras utilizando 1 µg de RNA total e 2µL de gDNA *Wipeout buffer 7x*. Após dois minutos de incubação por 42°C, seguiu-se à reação de transcrição reversa. Cada amostra recebeu 1 µL de *Quantiscript Reverse Transcriptase*, 4 µL de *Quantiscript RT Buffer, 5x* e 1 µL de *RT Primer Mix*. As amostras foram incubadas à 42 °C durante 30 min e posteriormente a 95°C por 3 minutos. Terminada a reação, o produto da síntese foi diluído 10x pela adição de 180 µL de água livre de RNase.

4.3.3. *Avaliação da expressão de gene relacionados com o metabolismo ósseo por PCR quantitativa (qPCR).*

Foram avaliados seis marcadores do metabolismo ósseo. Os *primers* para os genes *Fosfatase Alcalina (ALP)*, *RUNX2 Colágeno A tipo IA (COL1A1)*, *RANKL*, *Osteoprotegerina (OPG)* e *Osteopontina (OPN)* foram desenhados utilizando as ferramentas *in silico* Nucleotide (NCBI), *University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser* e *Gene Runner*. O gene β -actina (*ACTB*) foi utilizado como normalizador para as reações de qPCR. As sequências dos *primers* estão disponíveis no Quadro 1. A expressão gênica foi avaliada utilizando o corante fluorescente Sybr Green (Thermo Fischer) e realizada no instrumento QuantStudio 7 Flex da Applied Biosystems® (Life Technologies). As reações foram realizadas em triplicata, sempre em presença de um controle negativo com volume total 10 µL para cada reação. O método utilizado para avaliar a expressão relativa foi o $2^{-\Delta\Delta C_t}$ segundo descrito por Livak e Schmittgen (2001).

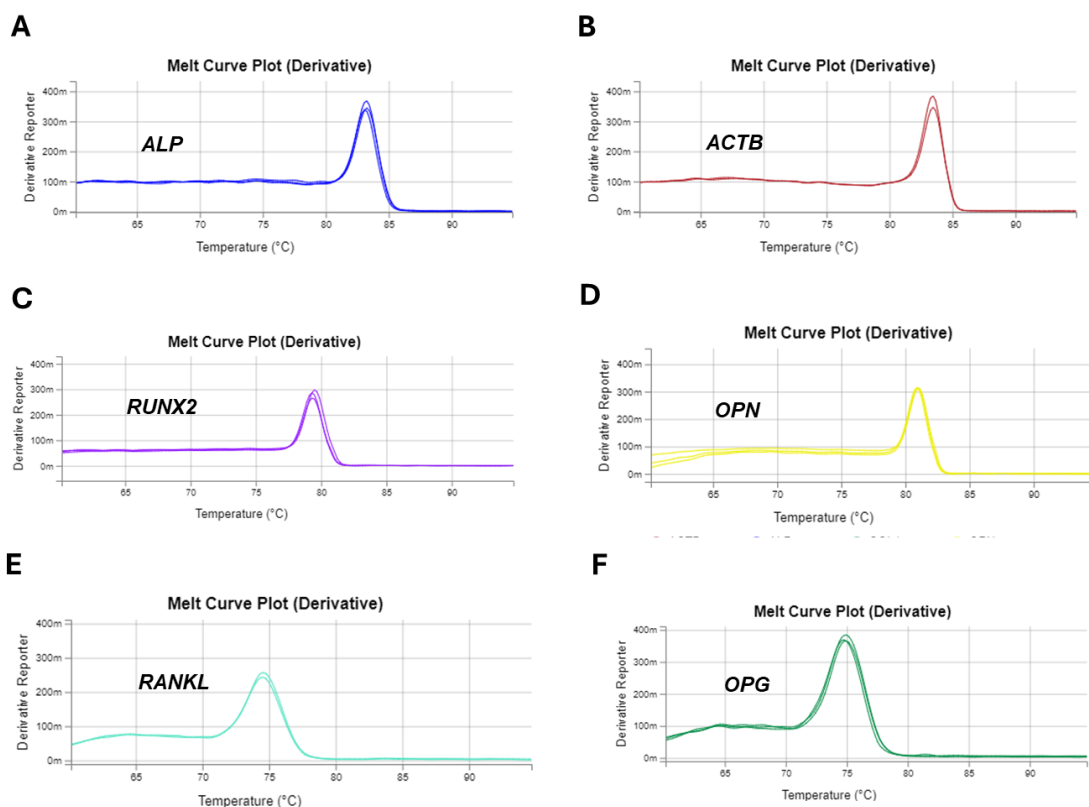
Quadro 1: Sequência de *primers* dos genes avaliados nesse estudo e seus respectivos tamanhos de *amplicons*.

Primers	Sequências	Pares de Bases
<i>Osteoprotegrina (OPG)</i>	R: 5'- ACTGTATTCCGCTCTGGGGTTCC- 3' F: 5'- AACCGTGTGTGTGAATGCGAGG – 3'	119 pb
<i>Colágeno A tipo 1A (COL1A1)</i>	F: 5'- CTGCTGGTCCCCGAGGTC – 3' R: 5'- CGGGGGGACCAACAGGACC -3'	132 pb
<i>Fosfatase Alcalina (ALP)</i>	F : 5' - AACCCAGACACAAGCATTCCCA – 3' R : 5'- CGGAGAGCGAAGGGTCAGTCA – 3'	152 pb
<i>RUNX2</i>	F: 5'- TGGACGAGGCAAGAGTTTCACC-3' R: 5'- TCTGTCTGTGCCTTCTGGGTTCC-3'	123 pb
<i>Osteopontina (OPN)</i>	F: 5' - CGCCGACCAAGGAAAACACTCAC-3' R: 5'- TTGGAAGGGTCTGTGGGGCT-3'	209 pb
<i>RANKL</i>	F: 5'- TAGAAAACCACCAAATGAACCCCA-3' R: 5' - GCTGTGAGTGCTTCCCTTTTTTC – 3'	132 pb
<i>ACTB</i>	F: 5' - CCAACCGCGAGAAGATGACCCAGAT – 3' R: 5' - CACGATGGAGGGGAAGACGG-3'	280

4.3.4. Padronização dos *primers*

Em seguida os *primers* foram padronizados para as reações de acordo com a quantidade em milimols (10 mM) e foram avaliadas as suas curvas de *melting* com a finalidade de verificar a especificidade de cada produto amplificado. Os *primers* de *ALP*, *RUNX2*, *OPN*, *RANKL* , *OPG* e o normalizador *ACTB* amplificaram apenas um fragmento demonstrando especificidade destes *primers* (Figura 9; A-D).

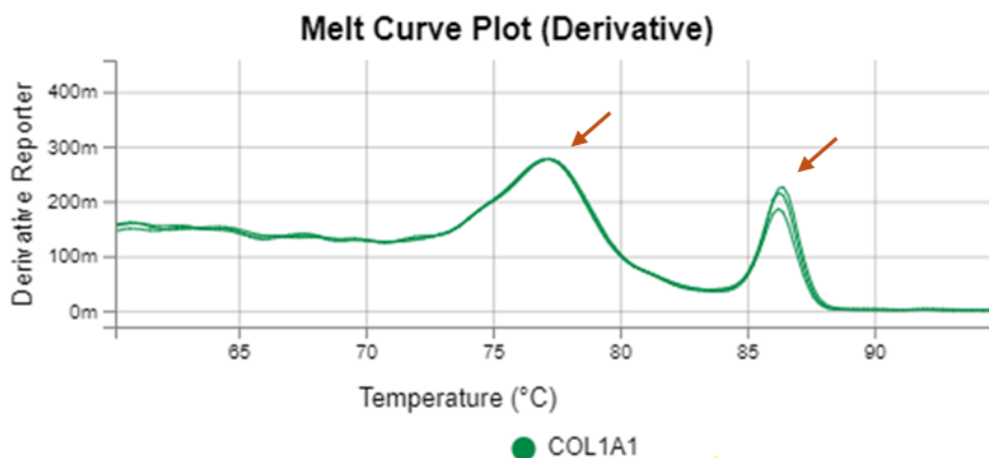
Figura 9: Curva de Melting dos primers de Fosfatase alcalina (ALP), β -Actina (ACTB), RUNX Osteopontina (OPN), RANKL e Osteoprotegerina (OPG).



Legenda: As curvas de *melting* demonstram especificidade dos primers (A) da fosfatase alcalina (ALP), de (B) β -actina (ACTB), (C) RUNX2, (D) Osteopontina (OPN), RANKL, e osteoprotegerina (OPG) por meio de amplificação de um único pico.

Porém, a avaliação da curva de *melting* do *primer* para COL1A1 demonstrou a presença de mais de um pico, indicando a presença de amplificação de produto inespecífico, levando à decisão de excluir este gene das análises do presente estudo (Figura 10).

Figura 10: Curva de Melting do primer para o gene COL1A1.



Legenda: A curva de *melting* do primer de COL1A1 demonstrou a presença de dois picos (setas vermelhas) durante a amplificação, indicando formação de produto inespecífico durante a reação de PCR quantitativa.

4.4. Análise de dados

As análises da expressão dos miRNAs foram realizadas de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK e SCHMITGEN, 2001). O método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ou método comparativo de C_t é uma equação matemática, na qual as mudanças na expressão gênica são calculadas baseadas nas diferenças entre as amostras calibradoras (controle) e as experimentais (transfectadas com mimico ou inibidor de miR-21), normalizadas por uma referência (gene *ACTB*). Foi determinada uma linha de corte de $\pm 2,0$ para determinar a diferença no nível de expressão nas amostras transfectadas em relação à amostra controle, considerando um gene hiperexpresso com valores de *fold change* ≥ 2 e *hipoexpresso* $\leq 0,5$.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *Software Prism 5.0* (GraphPad Software Inc.) e do SPSS versão . Para avaliar se os dados apresentavam *distribuição* normal foram utilizados os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Diferenças significativas entre os grupos foram avaliadas pelos testes: Teste de T bicaudal (*two-tailed t-test*) e *Anova one way*. Variações significativas foram submetidas às análises *Post hoc* com os testes de Tukey. Para avaliar a correlação entre a expressão dos genes avaliados foi utilizada a Correlação de Spearman. Foi adotado o nível de significância de $p \leq 0,05$.

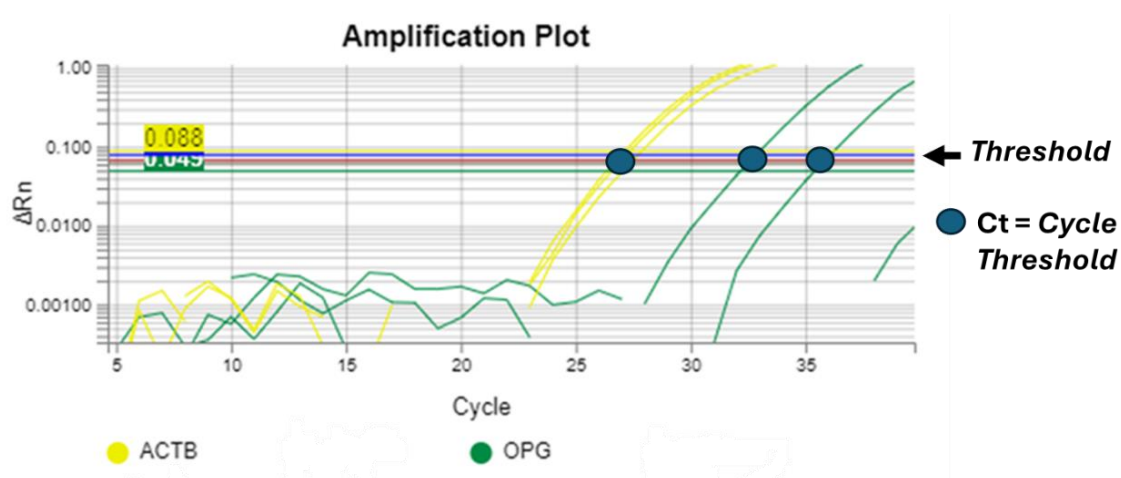
5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da expressão relativa dos genes *OPG*, *OPN* e *RANKL* e *COL1A1*

Durante a avaliação dos genes *OPG*, *OPN* e *RANKL* por qPCR não foram observadas curvas de amplificação na maioria das amostras no período de 24h e 48h. Este fato impossibilitou o cálculo da expressão relativa pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Um exemplo de amplificação insatisfatória está exemplificado pela a curva de amplificação do gene *OPG* na amostra Controle cultivada por 48h analisada por qPCR (Figura 11). Na imagem, podemos notar que as replicatas dessa amostra subiram de maneira não uniforme e com valores de *Cts* (*Cycle Threshold* – ponto que equivale ao ciclo de PCR em que a curva de amplificação atravessa a linha do Threshold) muito altos (acima de 33,0). Um bom exemplo de amplificação pode ser observado nessa mesma amostra, porém, na avaliação do controle endógeno (*ACTB*). Neste caso, observamos que as triplicatas subiram de modo mais uniforme, com curvas deslocadas mais para a esquerda e com valores de *Cts* menores comparados à *OPG*, o que parece indicar extração adequada do RNA total, boa conversão do cDNA e boa amplificação por qPCR nesta amostra.

Figura 11: Curvas de amplificação da amostra de SAOS2 controle 48h para o gene *OPG* e o endógeno *ACTB*.

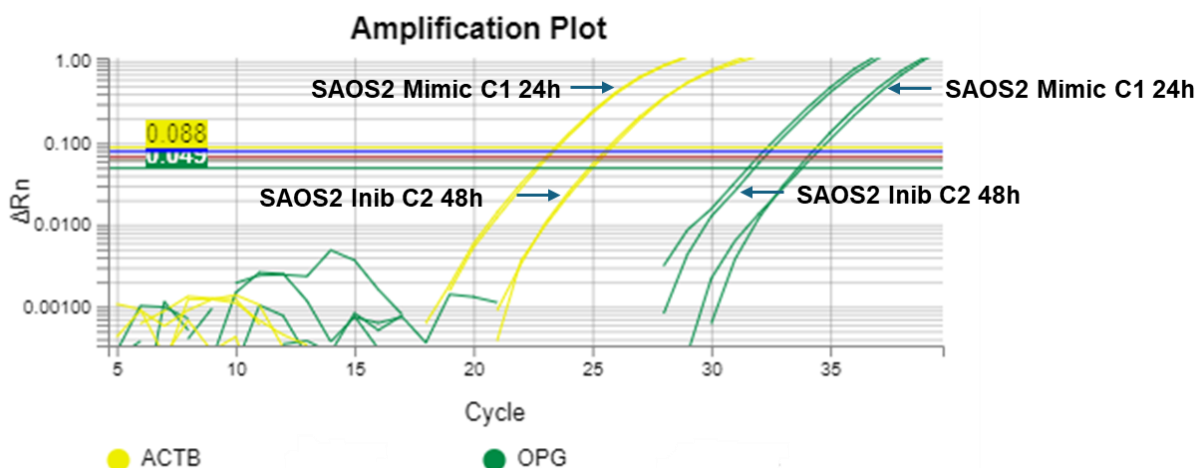


Legenda: O gráfico apresenta as curvas de amplificação da amostra controle (48h) para o gene *OPG* (curvas em verde) e o controle endógeno *ACTB* (curvas em amarelo). As linhas horizontais coloridas representam o *Threshold* e os círculos azuis representam os pontos em que as curvas

atravessam a linha de *Threshold* (Cts). A avaliação do gene *OPG* apresentou amplificação insatisfatória, com curvas deslocadas para a direita do gráfico. As amostras foram corridas em triplicata.

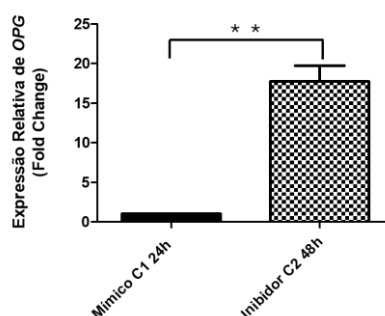
Apenas duas amostras demonstraram boas amplificações para *OPG*: as amostras que receberam o mímico de miR-21 na concentração C1 (25ng) cultivadas por 24h e as amostras que receberam o inibidor de miR-21 na concentração C2 (50 ng) cultivadas por 48h (Figura 12). Entretanto, com a ausência de amplificação e conseqüentemente, ausência dos valores de Cts das amostras Controle 24h e Controle 48h, inviabilizaram o cálculo da expressão relativa. Mas, uma comparação entre duas amostras demonstrou que a expressão de *OPG* em presença do inibidor de miR-21 foi 17x maior, quando comparamos com a amostra que recebeu o mímico de miR-21, sendo esse aumento estatisticamente significativo ($p = 0,007$) (Figura 13).

Figura 12: Curvas de amplificação das amostras de SAOS2 submetidas ao tratamento com mímico de miR-21 por 24h e inibidor de miR-21 por 48h para o gene *OPG* e o endógeno *ACTB*.



Legenda: O gráfico apresenta as curvas de amplificação da amostra controle (48h), para o gene *OPG* (curvas em verde) e o controle endógeno *ACTB* (curvas em amarelo). Podemos observar que as amostras submetidas ao tratamento com mímico de miR-21 por 24h e com inibidor de miR-21 por 48h apresentaram boas curvas de amplificação. As linhas horizontais coloridas dispostas na metade do gráfico representam o *Threshold*. As amostras foram corridas em triplicata.

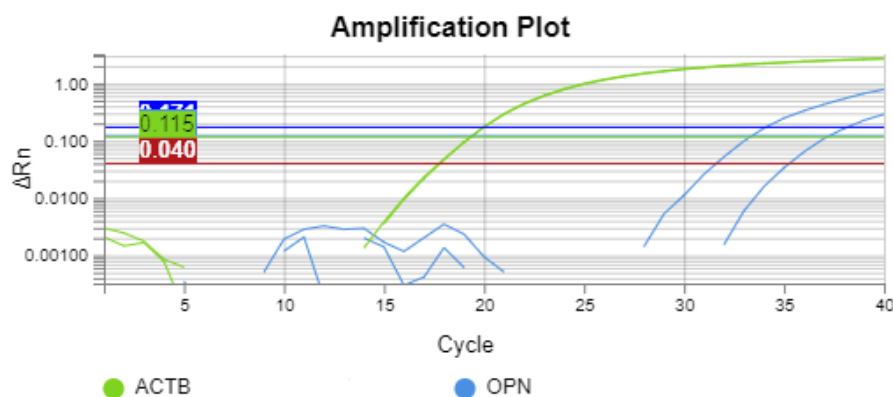
Figura 13: Gráfico de expressão do gene *OPG* em amostras de SAOS-2 tratadas com mímico e inibidor de miR-21.



Legenda: Expressão relativa de *OPG* avaliada pelo método de PCR quantitativa (qPCR) após transfecção com mímico de miR-21 24 horas e inibidor de miR-21 48 horas em duas concentrações (C1- 25ng e C2- 50ng). Nota-se um aumento de expressão significativo de *OPG* nas amostras que receberam o inibidor de miR-21 na concentração de 50ng em comparação às amostras que receberam o mímico de miR-21 na concentração de 25 ng. As amostras foram feitas em triplicata. O gene *ACTB* foi usado como gene endógeno. *Two-tailed t-test*. ** $p < 0,001$ – estatisticamente significativo.

Da mesma maneira, o gene *OPN* não apresentou boa amplificação nas amostras analisadas (Figura 14) assim como o gene *RANKL* (Figura 15).

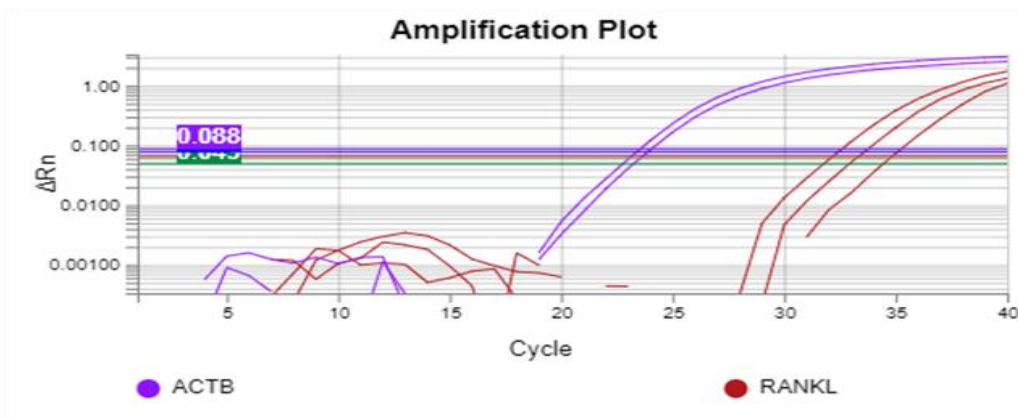
Figura 14: Curvas de amplificação para o gene *OPN* e o endógeno *ACTB* na amostra de SAOS-2 que recebeu o inibidor de miR-21 na concentração de 25 ng durante 48h.



Legenda: O gráfico apresenta as curvas de amplificação para o gene *OPN* (curvas em azul) e o

controle endógeno *ACTB* (curvas em verde) na amostra SAOS-2 que recebeu o inibidor de miR-21 na concentração de 25 ng por (48h). As linhas horizontais coloridas dispostas na metade do gráfico representam o *Threshold*. As curvas de amplificação de *OPN* apresentaram amplificação insatisfatória e encontram-se deslocadas mais para a direita do gráfico. As amostras foram corridas em triplicata

Figura 15: Curvas de amplificação do gene *RANKL* e do endógeno *ACTB* nas amostras de SAOS2 controle 48h.



Legenda: O gráfico apresenta as curvas de amplificação para o gene *RANKL* (curvas em vermelho) e controle endógeno *ACTB* (curvas em lilás) na amostra SAOS-2 controle 48h. As linhas horizontais coloridas dispostas na metade do gráfico representam o *Threshold*. As curvas de amplificação de *RANKL* apresentaram amplificação insatisfatória e encontram-se deslocadas mais para a esquerda do gráfico. As amostras foram corridas em triplicata.

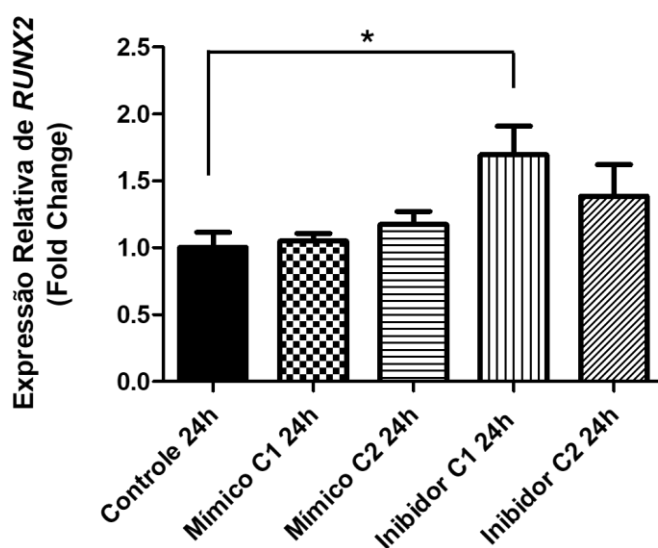
As análises de qPCR para o gene *COL1A 1* (como mencionado no tópico 4.3.4. de Material e Métodos) não puderam ser realizadas em virtude da presença de um pico adicional observado durante a investigação da curva de *melting* deste gene. Apesar de terem sido providenciados novos *primers* com as mesmas sequências (*forward* e *reverse*) por suspeita inicial de possível contaminação, a persistência do pico adicional em uma nova análise da curva de *melting* fez com que esse gene fosse excluído deste estudo, uma vez que o tempo era escasso para a realização de desenho de novas sequências e padronização de *primers*.

5.2. Avaliação da expressão relativa do gene *RUNX2*

Quando avaliamos o gene *RUNX2* por qPCR baseado no valor de corte adotado (± 2) de acordo com o $2^{-\Delta\Delta Ct}$, não observamos hipo ou hiperexpressão de *RUNX2* em 24 horas de cultura, apesar do FC para *RUNX2* nas células tratadas com Inibidor na Concentração de 25 ng (Inibidor C1) apresentarem Fold Change (FC) = 1,7 (Figura 16). Porém, quando realizamos a comparação estatística entre

os grupos utilizando os valores de FC, verificamos diferença significativa entre os grupos analisados ($p=0,036$). Quando realizamos a comparação entre dois grupos, verificamos que essas diferenças foram encontradas na comparação do grupo Controle x Inibidor C1 ($p= 0,038$). Apesar de parecer haver uma diferença na expressão entre o Mímico C1 24h com o Inibidor C1 24h, esta diferença não foi estaticamente significativa ($p= 0,054$) (Figura 16).

Figura 16: Expressão do gene *RUNX2* em amostras de SAOS2 tratadas com mímico e inibidor de miR-21 em 24 horas de cultura.

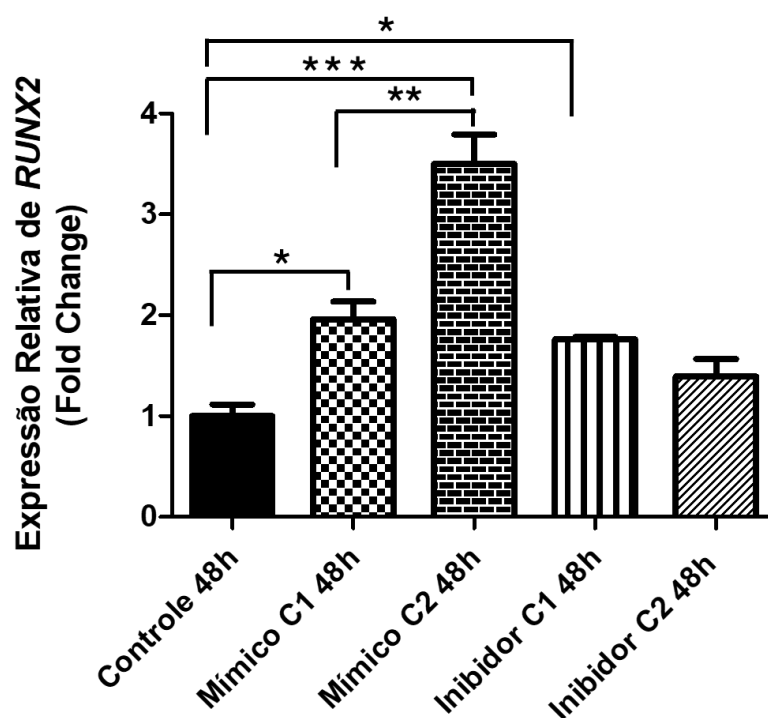


Legenda: Expressão relativa de *RUNX2* avaliado pelo método de PCR quantitativa (qPCR) 24 horas após transfecção do mímico/inibidor de miR-21 em duas concentrações (C1- 25ng e C2-50ng). Observa-se uma diferença significativa nos valores de Fold Change para *RUNX2* entre as amostras que receberam o Inibidor C1 em comparação ao Grupo Controle. As amostras foram feitas em triplicata. O gene *ACTB* foi usado como gene endógeno. *Anova one-way*. Tukey's test.* $p \leq 0,05$ = estatisticamente significativo

Já a análise de *RUNX2* no tratamento com mímicos/inibidores de miR-21 por 48h demonstrou um aumento de expressão de 2x deste gene nas células que receberam Mímico de miR-21 na concentração de 25ng e um aumento de expressão de 3,5x nas células que receberam o mímico de miR-21 na concentração de 50 ng (Figura 17). Não observamos hipoexpressão deste gene em presença dos inibidores de miR-21. Quando comparamos os níveis de FC entre os grupos verificamos uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0002$). Quando comparamos o grupo Controle com os diferentes tratamentos, verificamos

diferenças estatisticamente significativas entre o grupos Controle x Mímico C1 ($p=0,015$), os grupos Controle x Mímico C2 ($p= 0,0001$), os grupos Controle x Inibidor C1 ($p=0,039$). Importante mencionar a diferença significativa encontrada também entre a expressão de *RUNX2* nos grupos Mímico C1 x Mímico C2 ($p= 0,002$) (Figura 17).

Figura 17: Expressão do gene *RUNX2* em amostras de SAOS2 tratadas com mímicos e inibidores de miR-21 durante 48h.

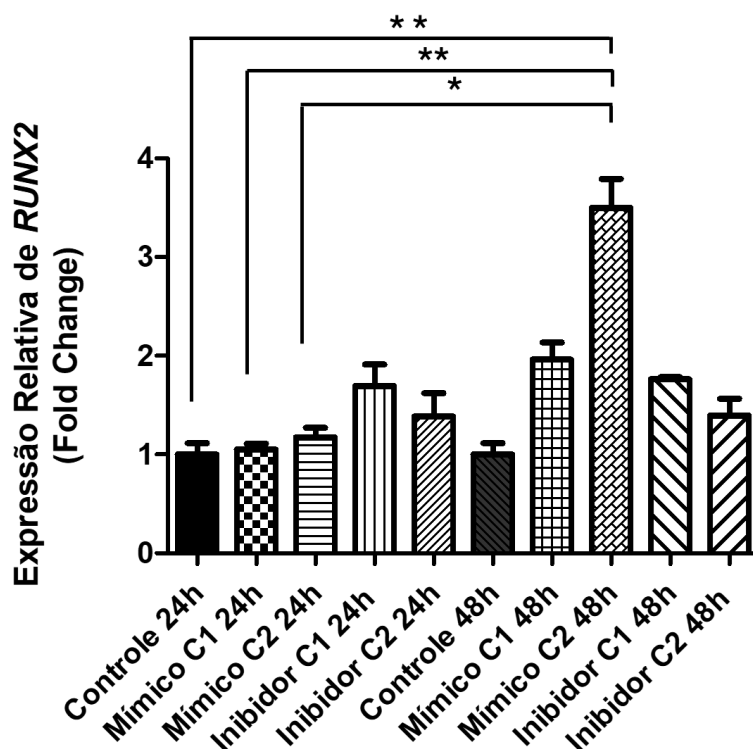


Legenda: Expressão relativa de *RUNX2* avaliada pelo método de PCR quantitativa (qPCR) 48 horas após transfecção do mímico/inibidor de miR-21 em duas concentrações (C1- 25ng e C2- 50ng). Nota-se um aumento de expressão significativo de *RUNX2* nas amostras que receberam Mímico de miR-21 na concentração de 50ng em comparação aos demais grupos. As amostras foram feitas em triplicata. O gene *ACTB* foi usado como gene endógeno. Anova one-way. Tukey's test (*Post hoc*). * $p \leq 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – estatisticamente significantivos.

Quando comparamos os grupos 24h e 48h na análise para *RUNX2*, verificamos diferença significativa nos valores de FC para *RUNX2* entre esses diferentes tempos de cultivo ($p= 0,037$). Na análise comparativa entre dois grupos, foram observadas diferenças significativas entre os valores de FC de *RUNX2* nas amostras que receberam o Mímico de miR-21 na concentração de 50 ng em 48 horas de cultura entre os grupos: Controle 24h x Mímico C2 48h ($p=0,001$), grupos Mímico C1 24h x Mímico C2 48h ($p= 0,001$) e grupos Mímico C2 24h x Mímico C2 48h x ($p= 0,002$) (Figura 18). Também foram observada diferença significativa

entre os grupos Mímico C1 24h X Mímico C1 48h ($p=0,001$)

Figura 18: Expressão do gene *RUNX2* em amostras de SAOS2 tratadas com mímicos e inibidores de miR-21 durante 24h e 48h



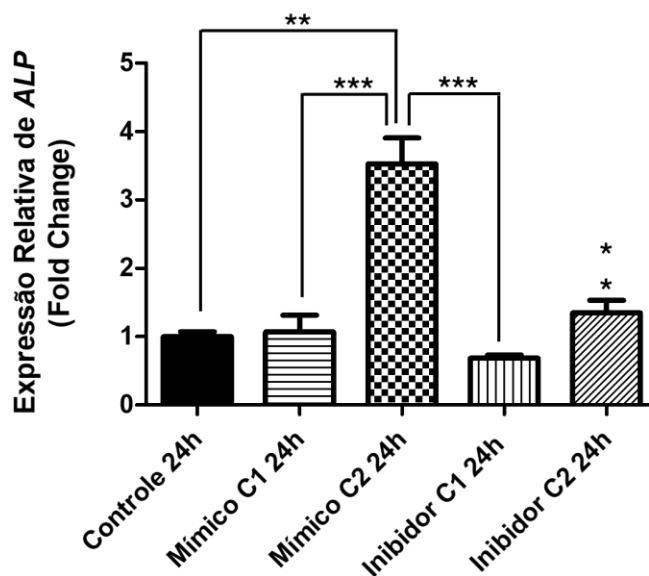
Legenda: Expressão relativa de *RUNX2* avaliada pelo método de PCR quantitativa (qPCR) 24h e 48 horas após transfecção do mímico/inibidor de miR-21 em duas concentrações (C1- 25ng e C2- 50ng). Nota-se uma diferença significativa na expressão de *RUNX2* entre as amostras que receberam o Mímico de miR-21 na concentração de 50 ng com incubação por 48h em comparação às demais amostras. As amostras foram feitas em triplicata. O gene *ACTB* foi usado como gene endógeno. . Anova one-way. Tukey's test (Post hoc). ** $p < 0,01$, * $p \leq 0,05$ – estatisticamente significativo.

5.3. Avaliação da expressão relativa do gene *ALP*

As análises de expressão do gene *ALP* com as células incubadas por 24 horas demonstraram que este gene encontrou-se hiperexpresso em 3,5x nas células que receberam Mímico na concentração de 50ng em comparação ao Controle (Figura 19). Não foi observada hipoexpressão deste gene em presença de inibidores de miR-21. Nas análises de dados, verificou-se na comparação dos valores de FC para *ALP*, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Na

comparação entre os valores de FC entre dois grupos, observou-se diferença significativa na expressão de *ALP* entre os grupos Controle x Mímico C2 24h ($p < 0,001$), Mímico C1 x Mímico C2 ($p < 0,001$), Mímico C2 x Inibidor C1 ($p < 0,0001$) e Mímico C2 x Inibidor C2 ($p = 0,004$) (Figura 19).

Figura 19: Expressão de *ALP*, 24 horas após transfecção com mímico/inibidor de miR-21.

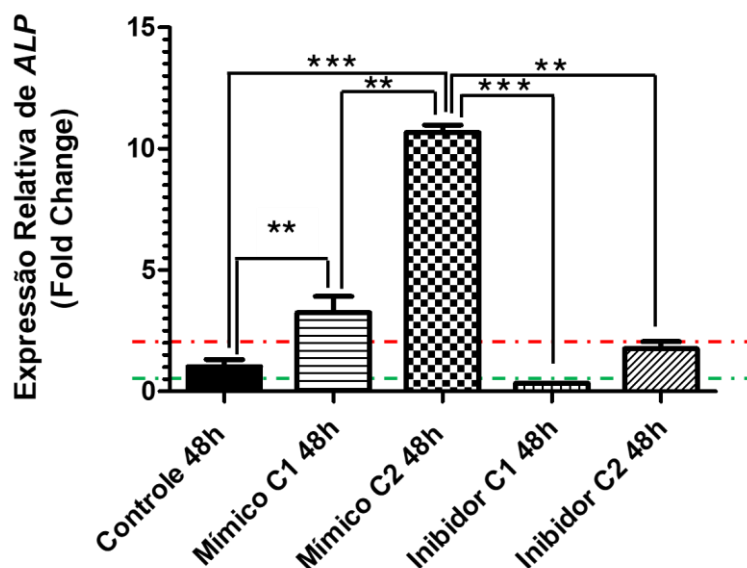


Legenda: Expressão relativa de *ALP* avaliada pelo método de PCR quantitativa (qPCR) 24 horas após transfecção do mímico/inibidor de miR-21 em duas concentrações (C1- 25ng e C2-50ng).. Nota-se que as amostras que receberam o mímico de miR-21 na concentração de 50 ng apresentaram hiperexpressão para *ALP*. Já as amostras que receberam o Inibidor de miR-21 na concentração de 25 ng apresentaram *ALP* hipoexpresso. As amostras foram feitas em triplicata. O gene *ACTB* foi usado como gene endógeno. Anova one-way. Tukey's test(*Post hoc*). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ - estatisticamente significantivos

Em seguida, o gene *ALP* foi analisado nas amostras com 48h de cultura. Verificou-se que *ALP* apresentou uma hiperexpressão de 3,2x nas amostras que receberam Mímico na Concentração de 25ng (Mímico C1- 48h) e de 10,7x nas amostras que receberam o mímico na concentração de 50ng após 48h (Mímico C2 -48h (Figura 20)). Já as amostras que receberam o inibidor na Concentração de 25ng apresentaram uma redução na expressão em torno de 3x (FC=0,33). Houve uma diferença estatisticamente significativa entre os valores de FC na comparação entre os grupos ($p < 0,0001$). Na comparação entre dois grupos,

observamos uma diferença significativa entre os grupos Controle 48h x Mímico C1 48h ($p=0,007$), Controle 48h x Mímico C2 48h ($p<0,0001$). Em relação às células que foram transfectadas com 50 ng de Mímico com 48h de incubação (Mímico C2), observamos uma diferença na expressão de *ALP* bastante significativa entre essa amostra o grupos Mímico C1 ($p=0,006$), grupo Inibidor C1 ($p<0,0001$) e o grupo Inibidor C2 ($p=0,001$) no tempo de 48H, Houve diferença de expressão significativa quando comparamos o grupo Inibidor C1 x Inibidor C2 ($p=0,001$)

Figura 20: Expressão de *ALP* 48 horas após transfecção com mímico/inibidor de miR-21.

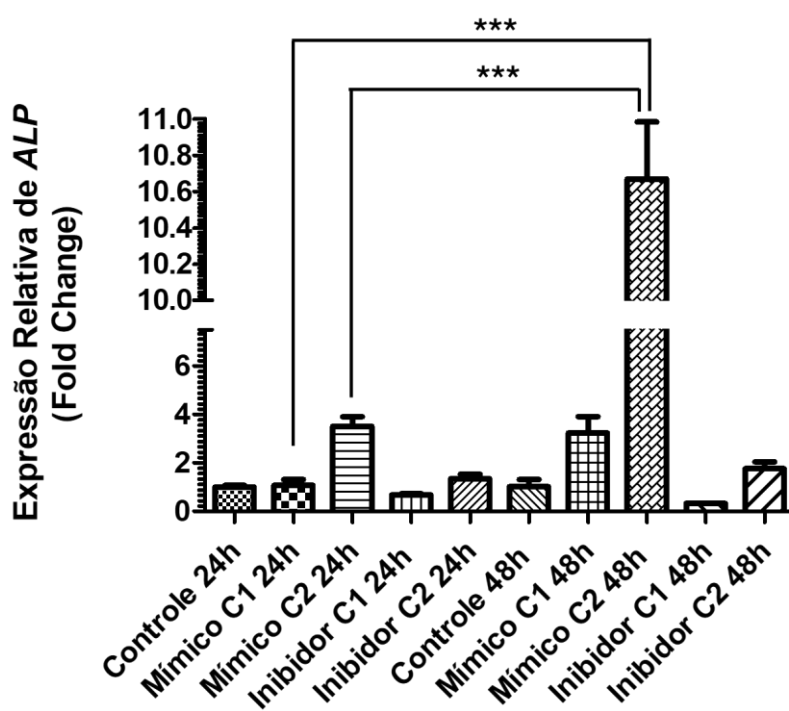


Legenda: Expressão relativa de *ALP* avaliado pelo método de PCR quantitativa (qPCR) 48 horas após transfecção do mímico/inibidor de miR-21 em duas concentrações (C1- 25ng e C2-50ng).As linhas vermelha e verde representam a linha de corte para diferença de expressão, segundo o cálculo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Todas as amostras que apresentarem valores de *Fold Change* acima de 2,0 (acima da linha vermelha) foram consideradas hiperexpressas e todas as amostras que apresentarem valores abaixo de 0,5 (linha verde) foram consideradas hipoexpressas. Nota-se uma hiperexpressão de *ALP* nas amostras transfectadas com 25 ng e 50 ng de mímicos de miR-21 e uma redução na expressão na amostra que foi transfectada com 25 ng de inibidor de miR-21. As amostras foram feitas em triplicata. O gene *ACTB* foi usado como gene endógeno. *Anova one-way. Tukey's test(Post hoc)*. ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ - estatisticamente significantivos.

Em seguida comparamos todos os grupos de 24 e 48h e verificamos uma diferença estatisticamente significativa na expressão de *ALP* entre os grupos analisados ($p<0,0001$) (Figura 21). Quando comparamos os dois tempos e as duas diferentes concentrações de mímicos e inibidores verificamos diferenças

estatisticamente significativas entre os grupos Mímico C1 24h x Mímico C1 48h ($p=0,0001$), Mímico C1 24hx Mímico C2 48h ($p<,0,0001$), Mímico C2 24h x Mímico C2 48h ($p=0,001$), Mímico C2 24h x Inibidor C1 48h ($p<,0,0001$), Mímico C2 24hx Inibidor C2 48h ($p< 0,0001$). Podemos notar no gráfico de expressão relativa a diferença significativa entre a expressão de ALP induzida pelo mímico na concentração de 50ng em 48 horas de cultura, comparada com as duas concentrações de mímicos nas 24 horas de cultura (Figura 21).

Figura 21: Comparação da expressão de *ALP* nos dois tempos de cultura (24 e 48 horas) após transfecção com mímicos/inibidores de miR-21.



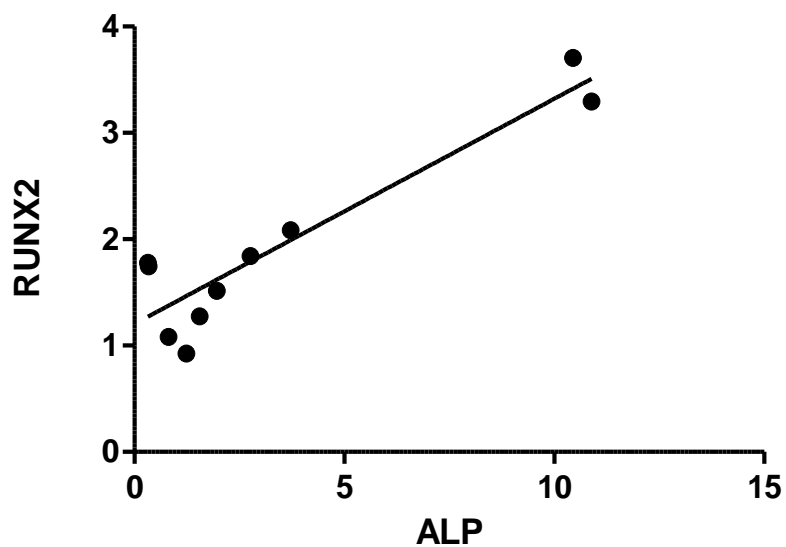
Legenda: Expressão relativa de *ALP* avaliada pelo método de PCR quantitativa (qPCR) 24 e 48 horas após transfecção do mímico/inibidor de miR-21 em duas concentrações (C1- 25ng e C2- 50ng). As linhas vermelha e verde representam a linha de corte para diferença de expressão, segundo o cálculo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Todas as amostras que apresentarem valores de *Fold Change* acima de 2,0 (acima da linha vermelha) foram consideradas hipoexpressas e todas as amostras que apresentarem valores abaixo de 0,5 (linha verde) foram consideradas hipoexpressas. As amostras foram feitas em triplicata. O gene *ACTB* foi usado como gene endógeno. Anova one-way. Tukey's test (Post hoc) .** $p<0,01$ *** $p<0,001$ - estatisticamente significantivos.

5.4. Correlação entre a expressão de *RUNX2* e *ALP*

Apesar de não ter sido observada correlação entre a expressão de *RUNX2* e *ALP* nas primeiras 24 horas de cultura, foi observada uma correlação moderada

positiva entre a expressão de *ALP* e de *RUNX2* após 48 horas de cultura em presença de mímicos e inibidores de miR-21 ($r_s = 0,761$ e $p = 0,036$) (Figura 22).

Figura 22: Correlação entre a expressão relativa de *ALP* e *RUNX2* nos diferentes tratamentos durante 48 horas.



6. DISCUSSÃO

No curso da cicatrização e formação óssea, é necessário que os osteoblastos passem por proliferação, diferenciação e estimulação da mineralização dentro da matriz extra celular óssea. Dentro dos osteoblastos, uma gama diversificada de genes, como *OCN*, *OPN*, *OPG*, *ALP* e *COL1A1* entre outros, sofrem alterações sequenciais na expressão gênica fenotípica que correspondem a essa série de eventos (Zhang *et al.*, 2020; Blahna *et al.*, 2012., Li *et al.*, 2019). Estudos recentes destacaram o papel crucial dos miRNAs na facilitação da proliferação e diferenciação de MSCs em osteoblastos .

Este presente estudo teve como objetivo verificar a ação de miR-21 na modulação da expressão dos genes *OPN*, *OPG*, *RANKL*, *COL1A1*, *RUNX2* e *ALP* relacionados com a osteogênese em uma linhagem celular derivada de tecido ósseo.

Para isto, realizou-se a transfecção de uma linhagem celular osteoblástica SAOS-2 com mímicos e inibidores de miR-21 em duas concentrações diferentes (25ng e 50 ng) e cultivadas em dois intervalos de tempo diferentes (24h e 48h). A escolha dessa linhagem foi baseada em estudos prévios destinados à avaliação do processo de diferenciação osteoblástica, reparo ósseo, bioengenharia e indução da expressão de marcadores ósseos (Huo *et al.*, 2013; Seyedmajidi *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019; Dvarakova *et al.*, 2023).

O próximo passo foi avaliar a expressão dos seis genes nos 10 grupos experimentais por qPCR. Entretanto, durante a padronização dos *primers*, os *primers* do gene *COL1A1* apresentaram um pico inespecífico na curva de *melting*, sendo este gene, portanto, excluído deste estudo.

As reações de qPCR foram baseadas no sistema de detecção por *Sybr Green*, neste presente estudo. Este sistema funciona da seguinte maneira: *Sybr Green* é um corante fluorescente que se liga preferencialmente ao DNA fita dupla de forma independente da sequência, quando isso acontece, o nível de emissão de fluorescência do *Sybr Green* aumenta consideravelmente. Baseado neste mecanismo, a quantidade de amplicons (produtos de PCR) gerados pode ser quantificada diretamente em cada ciclo (Palaz *et al.*, 2021). Nesse tipo de análise, é essencial a utilização de *primers* adequados para a garantia de uma amplificação precisa e específica. Portanto, a sensibilidade da detecção usando *Sybr Green*

pode ser comprometida pela formação de primer-dímeros (capacidade dos primers se anelarem entre si), pela falta de especificidade dos *primers* ou pela concentração dos *primers*. Em alguns casos, podemos nos deparar com a formação de um produto inesperado de fita-dupla, havendo a incorporação do *Sybr Green* a este produto e o registro de um sinal fluorescente (Ponchel *et al.*, 2003).

Nesse presente estudo, todas as sequências de *primers* foram desenhadas pelo nosso grupo, utilizando as ferramentas *in silico Nucleotide* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>) , *University of California Santa Cruz* (UCSC) (<https://genome.ucsc.edu>) e *Gene Runner* (<http://www.generunner.net>) . O *Gene Runner* é um algoritmo que possibilita o desenho de *primers* (oligos) e a verificação *in silico* da formação de estruturas secundárias durante a reação de PCR. Quando os *primers* foram desenhados para este presente estudo, a possibilidade de formação de estruturas secundárias foi checada logo no início das análises. Durante essa checagem, todas as sequências de *primers* atenderam às especificações para um bom *primer*. Porém, quando começaram as padronizações e análises das curvas de *melting*, verificou-se que o *primer* do gene *COL1A1* formava uma estrutura secundária, que em princípio foi considerado uma contaminação da solução de estoque. Novos *primers* foram solicitados baseados nas mesmas sequências *forward* e *reverse*. Porém, novamente foi observada a presença da estrutura secundária (formação de dois picos) durante a curva de *melting*. Importante mencionar, que essa estrutura secundária estava ausente nos Programas *GeneRunner*, *Multiple Primer Analyzer* (ThermoFisher Scientific), *OligoEvaluator* (Sigma-Aldrich) e *PCR Primer Stats* (https://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html).

Além da presença de dímeros uma outra hipótese para explicar a natureza do pico secundário na curva de *melting* dos *primers* do gene *COL1A1* , seria a presença de uma nova isoforma desse gene, resultado de um *splicing* alternativo. Cerca de noventa e dois por cento dos genes humanos expressam transcritos oriundos de *splicing* alternativo, conferindo uma variedade de isoformas de proteínas que desempenham diferentes funções (Wang *et al.*, 2004; Kalsotra; Cooper, 2011). A fluorescência por *Sybr Green* constitui uma boa estratégia para a identificação de amplicons (transcritos) por meio da análise da curva de *melting*. A análise da curva de *melting* representa a medida de dissociação de duas fitas de DNA, dependentes de temperatura durante o aquecimento (Camacho e Philipp,

2016). Porém, para a confirmação de que a estrutura secundária observada durante a padornização dos primers de *COL1A1* se tratam de dímeros ou de outra isoforma deste gene presente na linhagem SAOS-2, seriam necessárias abordagens adicionais, como por exemplo, a realização de eletroforese em gel de agarose e o sequenciamento genômico destes transcritos.

As etapas seguintes do presente estudo, consistiram na análise por qPCR dos cinco genes restantes. Novos obstáculos foram encontrados durante esse processo. Agora, em relação aos genes *OPN*, *OPG* e *RANKL* que não apresentaram boas amplificações nas amostras. Provavelmente, a explicação para este resultado deve-se ao pouco tempo em que as células ficaram em cultura, o que pode ter influenciado na baixa expressão destes genes.

Estudos apontam que genes como *OCN* e *OPG* tendem a se expressar de forma significativa após 72 a 96 horas de estimulação osteogênica (Pratap *et al.*, 2006; Komori, 2010; Kim *et al.*, 2009). Com a finalidade de demonstrar como ocorre o processo de diferenciação osteogênica em células tronco humanas pluripotentes, um grupo de pesquisadores submeteu essas células ao meio osteogênico por 35 dias. Utilizando diversas técnicas, como qPCR, imunofluorescência, coloração com vermelho de alizarina e citometria de fluxo, eles observaram as mudanças fenotípicas e moleculares nas células em cada semana. Baseado nessas mudanças eles construíram um mapa dinâmico. Este mapa demonstrava cada etapa de expressão de marcadores gênicos e proteínas durante a diferenciação osteogênica. Estes autores observaram que no terceiro e sétimo dias de cultura os níveis de expressão de *RUNX2*, *COL1A1* e *RUNX2* encontravam-se ainda baixos. Já os níveis de *ALP* apresentavam-se aumentados (Zhou *et al.*, 2021).

Um outro estudo teve por objetivo avaliar as interações ósseas com material de implantes ortopédicos e demonstrou que a expressão de *OPN* em SAOS-2 era induzida por meio osteogênico (Wakelin *et al.*, 2018). Estes autores avaliaram os marcadores ósseos em células SAOS-2 cultivadas em meio osteogênico e meio não-osteogênico. Eles verificaram que o marcador *OPN* apresentava-se hiperexpresso em meio osteogênico, devido à presença da dexametazona e de altas concentrações de cálcio neste meio (Wakelin *et al.*, 2018). Baseado nestes dados, uma hipótese para a baixa expressão de *OPN* encontrada neste presente estudo provavelmente estaria relacionada à utilização do meio DMEN para o cultivo de SAOS-2. O meio DMEN é um meio desprovido suplementos. A substituição por

meio osteogênico ou a suplementação de DMEN poderia talvez provocar a indução na expressão de *OPN* e de outros marcadores ósseos nessa linhagem.

Outros estudos também relataram expressão tardia de marcadores do metabolismo ósseo. Com o objetivo de avaliar a sinalização da osteoclastogênese na sutura palatina mediana após expansão rápida da maxila em ratos, animais foram eutanaziados 3,7 e 10 dias após a expansão da sutura mediana palatina. O osso recém-formado entre os ossos palatinos foi removido e o RNA total extraído. Análises por qPCR demonstraram que o pico de expressão do gene *Tnfrsf11a* (que codifica o receptor de *RANK* - *RANKR*) e do gene *Tnfsf11* (que codifica *RANKL*) foi observado somente 7 dias após a expansão da sutura mediana palatina. Nesse mesmo estudo, *OPG* apresentou um pico de expressão aumentado somente 10 dias após a expansão dos ossos palatinos (Arnez *et al.*, 2017). Um outro estudo avaliou a expressão de mRNA de *RANK*, *RANKL*, *OPG*, *TLR2* e *MyD88* na progressão da periodontite apical em camundongos. *RANKL* e *OPG* apresentaram um aumento de expressão somente após 7 dias de indução de periodontite apical (Barreiros *et al.*, 2018).

Um outro estudo avaliou se imatinib e nilotinib seriam capazes de afetar a função das células ósseas, portanto, os autores trataram SAOS-2 com estes quimioterápicos e avaliou os efeitos na capacidade de mineralização, bem como a expressão de mRNA de *RANKL* e *OPG*, duas citocinas importantes que regulam a osteoclastogênese (Kroschwald *et al.*, 2019). As células SAOS2 foram cultivadas por 25 dias e verificou-se que estes quimioterápicos aumentavam a expressão de *RANKL* em 160% na SAOS-2, mas não alteravam a expressão de *OPG*. Um dado importante a se mencionar, é que nesse estudo, as amostras SAOS-2 controle (sem tratamento) após 25 dias de cultura, apresentavam um aumento na expressão de *RANKL* em torno de 15x, porém, a expressão de *OPG* nesse período de cultura praticamente não alterou e apresentou-se bastante reduzido ($FC < 1,0$) (Kroschwald *et al.*, 2019). Esse resultado parece indicar que este *OPG* mesmo após cultivo prolongado de SAOS-2 é pouco expresso nessa linhagem, o que pode ter dificultado as análises neste presente estudo.

Importante mencionar que a expressão de *OPG* neste estudo foi induzida em cultura, e em duas amostras distintas, sendo SAOS-2 transfectadas com 25ng de mímico e SAOS-2 que receberam 50 ng de inibidor de miR-21. Foi constatado que a expressão induzida pelo inibidor de miR-21 foi quase 18x maior do que a do

mímico (FC=17,75) ($p=0,007$). Estes dados estão de acordo com a literatura como podemos verificar no estudo publicado por Pitari *et al.* (2015). Com o intuito de identificar se a produção de *OPG* era dependente de miR-21, pesquisadores transfectaram células de medula óssea normal com mímicos de miR-21 e avaliaram a expressão de *OPG* por qPCR e ELISA. Estes autores verificaram que a expressão de *OPG* reduziu em 55% após 48 horas e em 82% após 72h. Para confirmar se *OPG* continha-se como alvo direto de miR-21 os autores realizaram um ensaio com luciferase e contruíram um vetor contendo a sequência 3'UTR de *OPG* e um vetor repórter contendo a 3'UTR sem o sítio de ligação miR-21. Eles verificaram uma redução importante na atividade da luciferase (75%, $p < 0,0001$) nas células transfectadas que receberam o vetor luciferase repórter junto com mímicos de miR-21, enquanto nenhuma diferença foi observada naqueles vetores que não apresentaram o sítio de ligação de miR-21, indicando que miR-21 interage diretamente com a região 3'UTR de *OPG*. Para avaliar os efeitos de inibição de miR-21 na expressão de *OPG* estes mesmos autores realizaram nova transfecção utilizando inibidores de miR-21 e verificaram por qPCR um aumento significativo ($p < 0.05$) na produção de mRNA de *OPG* (Pitari *et al.*, 2015). Portanto, o aumento observado neste estudo na expressão de *OPG*, provavelmente deve-se à suspensão da ação inibitória de miR-21 sobre seu alvo *OPG*.

Posteriormente foram avaliados os genes *ALP* e *RUNX2*. Os resultados obtidos neste presente estudo demonstram que o miR-21 exógeno (mímico), especialmente na concentração de 50 ng e após 48 horas de incubação, promoveu um aumento significativo na expressão destes genes. Esse padrão de expressão sugere uma ação pró-osteogênica do miR-21 na linhagem celular SAOS-2, o que corrobora achados prévios da literatura que apontam o miR-21 como regulador positivo da diferenciação osteoblástica (OKA *et al.*, 2021).

As análises com *RUNX2* neste presente estudo, demonstraram que a transfecção das células SAOS-2 com o mímico e com o inibidor de miR-21, e cultivadas posteriormente à transfecção por 24 horas, não provocou nenhuma influência na expressão deste gene, independente da concentração de mímico/inibidor utilizada, mesmo havendo diferença significativa entre os valores de FC dos grupos analisados ($p=0,036$). No entanto, quando o tempo de cultura aumentou para 48 horas, observamos que miR-21 conseguiu provocar um aumento na expressão de *RUNX*, principalmente em presença de uma maior concentração

do mímico. Por outro lado, não foi observada nenhuma alteração na expressão deste gene quando utilizamos diferentes concentrações de inibidor de miR-21.

RUNX2 é um dos principais fatores de transcrição que regula a diferenciação de osteoblastos e é essencial para a formação óssea. O aumento na expressão de *RUNX2* induzido pelo mímico do miR-21 observado neste presente estudo, reforça que miR-21 é um regulador positivo da diferenciação osteoblástica (OKA *et al.*, 2021). *RUNX2* é responsável pela indução na expressão de vários genes associados à osteogênese como *ALP*, *OCN* e *Col1A1*, e está intimamente envolvido na regulação da formação de matriz óssea (Komori, 2010).

Além disso, a ativação da via Wnt/ β -catenina tem sido associada à indução de *RUNX2* (Wang *et al.*, 2013), que sugerem que miR-21 pode regular a expressão de *RUNX2*, favorecendo a osteogênese. Este aumento de *RUNX2* observado neste presente estudo, pode ser devido à ativação da via Wnt/ β -catenina, o que sugere que miR-21 tem um papel importante na modulação dessa via durante a osteogênese (Wang *et al.*, 2015 e Subramaniam *et al.*, 2023). Estudos levantam a hipótese de que a sinalização Wnt canônica e *RUNX2/CBFA1/AML3* são componentes funcionalmente ligados de uma via necessária para o início da diferenciação osteoblástica. A ativação da via canônica Wnt leva ao acúmulo nuclear de β -catenina, que ativa a transcrição de *RUNX2* (Gaur *et al.*, 2010).

Um outra hipótese para a indução de *RUNX2* por miR-21, foi sugerida por um estudo que avaliou o processo de osteogênese em uma linhagem de células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (Li *et al.*, 2017). Os autores verificaram que miR-21 foi capaz de regular o processo de osteogênese pela via Smad7/ Smad1/5/8- *RUNX2*. A região 3'-UTR de Smad7 é alvo de miR-21, o que torna Smad7 um alvo direto desse miRNA. Entretanto, Smad7 regula a expressão de *RUNX2*. Os dados gerados nesse estudo demonstraram que quando miR-21 é silenciado, a expressão de Smad7 aumenta, levando à inibição da fosforilação do complexo Smad/1/5/8. Esse complexo quando fosforilado combina-se com Smad4 para ajustar os níveis de expressão de *RUNX2*. Portanto, o excesso de Smad7 leva à uma redução na expressão de *RUNX2* e conseqüentemente, à uma deficiência na formação óssea. Nesse mesmo estudo, eles transfectaram essas mesmas células com mímico de miR-21 e verificaram um aumento na expressão de *ALP* e *RUNX2*. Também observaram que a superexpressão de miR-21 foi capaz de aumentar a capacidade de formação de nódulos mineralizados demonstrados pela

coloração com vermelho de alizarina. Segundo esses autores miR-21 é indispensável na regulação da diferenciação osteoblástica e representa um novo mecanismo pelo qual miR-21 promove a formação óssea em células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (Li *et al.*, 2017).

Neste presente estudo, as análises de expressão do gene *ALP* demonstraram que este gene apresentou-se hipereexpresso (3,5x) após transfecção com 50ng mímico de miR-21 durante 24 horas de cultivo. Após 48 horas de cultura, este aumento (quase 11x) foi significativo quando em comparamos com o aumento observado nas 24h nessa mesma concentração ($p < 0,0001$). Em contrapartida, a inibição de miR-21 nas 24 horas não influenciou na expressão de *ALP*, porém, após 48h uma hipoexpressão em torno de 3x foi observada nas células foram expostas a uma menor concentração de mímicos de miR-21 (25ng).

Esses dados corroboram com estudos anteriores que associaram o miR-21 à diferenciação osteoblástica, atuando positivamente na expressão de marcadores como *ALP* (Oka *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2015). A *ALP* é uma enzima crucial na mineralização óssea, catalisando a liberação de fosfato inorgânico a partir de precursores orgânicos, processo essencial para a formação da matriz óssea mineralizada (Dai *et al.*, 2020). A ativação de *ALP* durante a diferenciação osteoblástica é um marcador importante do processo de osteogênese e tem sido utilizado como um indicador da atividade osteoblástica (Mizuno *et al.*, 2014).

De acordo com Zhang *et al.* (2015), a sinalização da via Wnt, especialmente a ativação canônica de Wnt/ β -catenina, pode aumentar a expressão de *ALP*, favorecendo a diferenciação de osteoblastos. A sua relação com miRNAs também é amplamente documentada, como no estudo de Li *et al.* (2013), que demonstraram que miR-21 tem um papel regulador na ativação de genes osteogênicos, incluindo *ALP*, ao inibir fatores inibidores de osteogênese. Este achado sugere que o miR-21 pode promover a diferenciação osteoblástica, favorecendo a formação óssea.

Um outra hipótese sobre a influência de miR-21 na expressão de *ALP* foi demonstrada por um estudo anteriormente citado neste trabalho, que foi desenvolvido por Li e colaboradores que demonstraram a regulação da osteogênese por miR-21 por meio da via Smad1/5/8/RUNX2 (Li *et al.*, 2017). Como já mencionado, Smad7 é um alvo de miR-21 e na ausência de miR-21, Smad7 encontra-se aumentada. Sendo assim, os autores avaliaram células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea provenientes de camundongos *Knock-*

out para miR-21 comparadas com células derivadas de camundongos selvagens. Eles verificaram que após transfectarem as células *knock-out* para miR-21 com um siRNA para Smad7, os resultados de qPCR e de *western blot* demonstraram um aumento na expressão de Smad1/5/8, *RUNX2* e de *ALP* (Li *et al.*, 2017). Nossos resultados demonstrando correlação positiva moderada entre a expressão de *ALP* e *RUNX2* após 48 horas de cultura também estão de acordo com os dados gerados no estudo de Li e colaboradores (2017).

ALP é um dos marcadores iniciais mais relevantes da maturação osteoblástica, estando associada à mineralização da matriz óssea (Millán, 2013), enquanto *RUNX2* desempenha papel essencial na indução da diferenciação de precursores mesenquimais em osteoblastos (Long, 2012; Komori, 1997). A expressão aumentada desses genes em resposta ao miR-21 reforça a hipótese de que esse miRNA pode atuar na modulação positiva de vias osteogênicas.

Apesar dos resultados favoráveis que demonstram que miR-21 possui papel importante na regulação da expressão dos marcadores osteogênicos *ALP* e *RUNX2*, as análises de expressão gênica de *COL1A1*, *OPG*, *OPN*, *RANKL* não demonstraram resultados conclusivos. Como já mencionado, a expressão de genes como *OPG* e *RANKL*, integrantes da via RANK/RANKL/OPG, tende a ocorrer em estágios mais avançados da diferenciação osteoblástica, geralmente após 72 horas de cultivo ou mais (Liu *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2020). Da mesma forma, a síntese de *OPN* está relacionada à maturação da matriz extracelular, processo que demanda tempo e condições específicas de microambiente (Bosetti *et al.*, 2010). Assim, a ausência de amplificação destes transcritos pode refletir uma limitação temporal, uma vez que os ensaios foram conduzidos em até 48 horas, além da natureza tumoral da linhagem SAOS-2, que, embora amplamente utilizada para estudos de osteogênese, não expressa todos os marcadores de forma equivalente às células-tronco mesenquimais primárias (Komori, 2010). Deste modo, recomendamos que novas pesquisas sejam realizadas utilizando novas sequências de *primers* para *COL1A1* e a utilização de outro tipo de linhagem celular, além de um período de cultura mais prolongado para podermos investigar o real potencial de indução osteogênica de miR-21.

7. CONCLUSÃO

- Em virtude do aparecimento de uma estrutura secundária durante as análises da Curva de Melting de *COL1A1*, este gene precisou ser excluído deste estudo. Recomenda-se experimentos como eletroforese em gel de agarose seguida de sequenciamento genômico para a verificação da possibilidade de dímeros ou isoforma deste gene;
- Para *OPG*, *OPN*, *RANKL* os resultados da avaliação de expressão foram inconclusivos e podem ser explicados por alguns fatores como a incubação e cultura de até 48h, meio de cultura utilizado e às características da linhagem celular da SAOS-2;
- Verificamos que miR-21 foi capaz de induzir a expressão de *ALP* e de *RUNX2* e essa indução parece ser dependente da concentração do mímico e do tempo de exposição à esta molécula;
- A redução na expressão após a utilização de inibidores de miR-21 só foi observada para o gene *ALP* após 48 horas de cultura com 25 ng do mímico. Talvez a concentração do inibidor e o tempo de cultura possa ter influenciado nessa resposta. Provavelmente o mecanismo de inibição deste miRNA exija menores quantidades de inibidor e um maior tempo de incubação, o que só poderá ser comprovado com pesquisas adicionais.
- Houve uma correlação moderada entre a expressão de *RUNX2* e *ALP* após transfecção com mímicos e inibidores de miR-21 após 48 horas, evidenciando a ação importante de miR-21 na regulação da osteogênese.

8. REFERÊNCIAS

ABDULJABBAR T, KELLESARIAN SV, VOHRA F, ET AL. Effect of Growth Hormone Supplementation on Osseointegration: A Systematic Review and Meta-analyses. *Implant Dent.* 2017;26(4):613-620. doi:10.1097/ID.0000000000000616

AMIRRAH IN, LOKANATHAN Y, ZULKIFLEE I, WEE MFMR, MOTTA A, FAUZI MB. A Comprehensive Review on Collagen Type I Development of Biomaterials for Tissue Engineering: From Biosynthesis to Bioscaffold. *Biomedicines.* 2022 Sep 16;10(9):2307. doi: 10.3390/biomedicines10092307. PMID: 36140407; PMCID: PMC9496548.

ARNEZ MFM, RIBEIRO LSN, BARRETTO GD, MONTEIRO PM, ERVOLINO E, STUANI MBS. RANK/RANKL/OPG Expression in Rapid Maxillary Expansion. *Braz Dent J.* 2017;28(3):296-300. doi:10.1590/0103-6440201601116

BARREIROS D, PUCINELLI CM, OLIVEIRA KMH, ET AL. Immunohistochemical and mRNA expression of RANK, RANKL, OPG, TLR2 and MyD88 during apical periodontitis progression in mice. *J Appl Oral Sci.* 2018;26:e20170512. Published 2018 Jul 10. doi:10.1590/1678-7757-2017-0512

BARTEL DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-297.

BHASKARAN, M.; MOHAN, M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet Pathol.*, v. 51, n. 4, p. 759-774, jul. 2014. DOI: 10.1177/0300985813502820. Epub 2013 set. 17. PMID: 24045890; PMCID: PMC4013251.

BLACKWELL KA, RAISZ LG, PILBEAM CC. Prostaglandins in bone: bad cop, good cop? *Trends Endocrinol Metab.* 2010 May;21(5):294-301. doi: 10.1016/j.tem.2009.12.004. Epub 2010 Jan 14. PMID: 20079660; PMCID: PMC2862787.

BLAHNA MT, HATA A. Smad-mediated regulation of microRNA biosynthesis. *FEBS Lett.* 2012 Jul 4;586(14):1906-12. doi: 10.1016/j.febslet.2012.01.041. Epub 2012

CAMACHO LONDOÑO J, PHILIPP SE. A reliable method for quantification of splice variants using RT-qPCR. *BMC Mol Biol.* 2016;17:8.

CAVA C., BERTOLI G., CASTIGLIONI I. Retrato de Redes de Coexpressão Específicas de Tecidos de RNAs Não Codificadores (miRNA e lncRNA) e mRNAs em Tecidos Normais. *Comput. Matemática. Métodos Med.* 2019;2019:9029351. doi: 10.1155/2019/9029351.

CHEN D, ZHAO M, MUNDY GR . Proteínas morfogenéticas ósseas. *Fatores de crescimento* 2004; 22 (4): 233–241.

CROMBRUGGHE, B. De. (2003). Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends in genetics: TIG*, 19(8), 458–466.

DAVIDSON BL, MCCRAY PB JR. Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat Rev Genet.* 2011;12(5):329-340.

DENG, D., LIU, X., HUANG, W. ET AL. Os osteoclastos controlam a ossificação endocondral por meio da regulação da disponibilidade de acetil-CoA. *Bone Res* 12 , 49 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41413-024-00360-6>

DIMITRIOU R, JONES E, MCGONAGLE D ET AL . Regeneração óssea: conceitos atuais e direções futuras. *BMC Med* 2011; 31 (9): 66.

DO TA, LE HS, SHEN YW, HUANG HL, FUH LJ. Risk Factors related to Late Failure of Dental Implant-A Systematic Review of Recent Studies. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(11):3931. Published 2020 Jun 2. doi:10.3390/ijerph17113931

EBERT MS, SHARP PA. MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA.* 2010;16(11):2043-2050.

FENG, X.; McDONALD, J. M. Disorders of bone remodeling. *Annual Review of Pathology*, v. 6, p. 121–145, 2011. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130203.

FLORENCIO-SILVA R, SASSO GR, SASSO-CERRI E, SIMÕES MJ, CERRI PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015:421746. doi: 10.1155/2015/421746. Epub 2015 Jul 13. PMID: 26247020; PMCID: PMC4515490.

GANGARAJU VK, LIN H. MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(2):116-125. doi:10.1038/nrm2621

GAUR V, DOSHI AG, PALKA L. Zygomatic approach with single-piece implants: A technical note. *National Journal of Maxillofacial Surgery.* 2022 Jan- Apr;13(1):153-161. DOI: 10.4103/njms.njms_274_20. PMID: 35911801; PMCID: PMC9326188.

GAUR, Tripti; LENGNER, Christopher J.; HOVHANNISYAN, Hayk; et al. Sinalização canônica WNT promove a osteogênese estimulando diretamente a expressão do gene Runx2. *Journal of Bone and Mineral Research*, [S.l.], v. 25, n. 1, p. 144-154, 2010. DOI: 10.1002/jbmr.44. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4505850/>.

GENG Z, YU Y, LI Z, ET AL. miR-21 promotes osseointegration and mineralization through enhancing both osteogenic and osteoclastic expression. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2020;111:110785. doi:10.1016/j.msec.2020.110785

GOMES AQ, NOLASCO S, SOARES H. Non-coding RNAs: multi-tasking molecules in the cell. *Int J Mol Sci.* 2013 Jul 31;14(8):16010-39. doi: 10.3390/ijms140816010. PMID: 23912238; PMCID: PMC3759897.

GOVINDAN R, EL-SHERBINY M, IBRAHEEM KMM, ET AL. Thyroid-Stimulating Hormone Favors Runx2-Mediated Matrix Mineralization in HOS and SaOS2 Cells: An In Vitro and In Silico Approach. *Molecules.* 2022;27(3):613. Published 2022 Jan 18.

HAO CP, CAO NJ, ZHU YH, ET AL. Osseointegration and stability of dental implants with different surface treatments in animal models: a network meta-analysis. *Sci*

Rep. 2021;11:13849. doi:10.1038/s41598-021-93307-4

HATA AN, BREYER RM. Farmacologia e sinalização dos receptores de prostaglandina: múltiplos papéis na inflamação e na modulação imunológica. *Pharmacol Ther.* 2004;103(2):147–166. doi: 10.1016/j.pharmthera.2004.06.003.

HU H, HILTON MJ, TU X ET AL . Funções sequenciais da sinalização Hedgehog e Wnt no desenvolvimento dos osteoblastos. *Desenvolvimento* 2005; 132 (1): 49–60.

HU R, LIU W, LI H, ET AL. A Runx2/miR-3960/miR-2861 regulatory feedback loop during mouse osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2011;286(14):12328- 12339.

HU, C. H.; SUI, B. D.; DU, F. Y.; ET AL. A deficiência de miR-21 inibe a função dos osteoclastos e previne a perda óssea em camundongos. *Sci Rep.*, v. 7, p. 43191, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep43191>.

HUO L, LIU K, PEI J, ET AL. Fluoride promotes viability and differentiation of osteoblast-like Saos-2 cells via BMP/Smads signaling pathway. *Biol Trace Elem Res.* 2013;155(1):142-149.

ITO, S.; NAGATA, K. Controle de Qualidade do Procolágeno em Células. *Annu. Rev. Biochem.* 2021 , 90 , 631–658.

JAYESH RS, DHAKAR SAMY V. Osseointegration. *J Pharm Bioallied Sci.* 2015;7(Suppl 1):S226-S229. doi:10.4103/0975-7406.155917

JUNKER R, DIMAKIS A, THONEICK M, JANSEN JA. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20 Suppl 4:185-206. doi:10.1111/j.1600-0501.2009.01777.x

KALSOTRA A, COOPER TA. Functional consequences of developmentally regulated alternative splicing. *Nat Rev Genet.* 2011;12(10):715-729.

KATO RB, ROY B, DE OLIVEIRA FS, ET AL. Nanotopography directs mesenchymal stem cells to osteoblast lineage through regulation of microRNA-SMAD-BMP-2 circuit. *J Cell Physiol.* 2014;229(11):1690-1696.

KIM EJ, KANG IH, LEE JW, JANG WG, KOH JT. MiR-433 mediates ERR γ -suppressed osteoblast differentiation via direct targeting to Runx2 mRNA in C3H10T1/2 cells. *Life Sci.* 2013 Mar 21;92(10):562-8. doi: 10.1016/j.lfs.2013.01.015. Epub 2013 Jan

KIM EJ, KANG IH, LEE JW, JANG WG, KOH JT. MiR-433 mediates ERR γ -suppressed osteoblast differentiation via direct targeting to Runx2 mRNA in C3H10T1/2 cells. *Life Sci.* 2013 Mar 21;92(10):562-8. doi: 10.1016/j.lfs.2013.01.015. Epub 2013 Jan 23. PMID: 23353875.

KIM, S. H. ET AL. Cell-specific expression and activation of Runx2 regulates osteoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 41, p. 28379–28389, 2009. DOI: 10.1074/jbc.M109.033001

KO NY, CHEN LR, CHEN KH. The Role of MicroRNA and Long-Non-Coding RNA in Osteoporosis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(14):4886. doi:10.3390/ijms21144886

KOMORI, T. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Advances in*

Experimental Medicine and Biology, v. 658, p. 43–49, 2010. DOI: 10.1007/978-1-4419-1050-9_5.

KRISHNAN V, BRYANT HU, MACDOUGALD OA. Regulação do osso massa por sinalização Wnt. *J Clin Invest* 2006; 116: 1202-1209

KRISHNAN LM, TAUER JT, KROSCHWALD SI, ET AL. Imatinib mesylate and nilotinib decrease synthesis of bone matrix in vitro. *Oncol Lett.* 2019;18(2):2102-2108. doi:10.3892/ol.2019.10518

LEE, Y., JEON, K., LEE, JT, KIM, S. & KIM, VN Maturação de microRNA: processamento passo a passo e localização subcelular. *EMBO J.* 21 , 4663–4670 (2002)

LEI, R. Wnt/ β -catenina induz diferenciação osteoblástica de BMCS por meio da via de sinalização Notch por osteócitos. *Chin. J. Osteoporos.* 2018 , 24 , 600–605

LI X, GUO L, LIU Y, ET AL. MicroRNA-21 promotes osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells via the Smad7-Smad1/5/8-Runx2 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;493(2):928-933. doi:10.1016/j.bbrc.2017.09.119

LI X, LI K, YU G, YU C, LIU C. miR-342-5p inhibits expression of Bmp7 to regulate proliferation, differentiation and migration of osteoblasts. *Mol Immunol.* 2019 Oct;114:251-259. doi: 10.1016/j.molimm.2019.07.027. Epub 2019 Aug 6. PMID: 31398664.

LI X, LI K, YU G, YU C, LIU C. miR-342-5p inhibits expression of Bmp7 to regulate proliferation, differentiation and migration of osteoblasts. *Mol Immunol.* 2019 Oct;114:251-259. doi: 10.1016/j.molimm.2019.07.027. Epub 2019 Aug 6. PMID: 31398664.

LI Z, HASSAN MQ, JAFFERJI M, ET AL. Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2009;284(23):15676-15684.

LI H, XIE H, LIU W, HU R, HUANG B, TAN YF, XU K, SHENG ZF, ZHOU HD, WU XP, LUO XH. A novel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans. *J Clin Invest.* 2009 Dec;119(12):3666-77. doi: 10.1172/JCI39832. Epub 2009 Nov 16. Erratum in: *J Clin Invest.* 2010 Jan;120(1):395. Liao, Er-Yuan [removed]. PMID: 19920351; PMCID: PMC2786801.

LI, Y.; FAN, L.; LIU, S.; ET AL. Promotion of bone regeneration through the upregulation of angiogenic-osteogenic coupling using microRNA-26a. *Biomaterials*, v. 34, n. 21, p. 5048-5058, 2013.

LIN Z, XIONG Y, SUN Y, ZENG R, XUE H, HU Y, CHEN L, LIU G, PANAYI AC, ZHOU W, CAO F, GAO F, MI B, LIU G. Circulating MiRNA-21-enriched extracellular vesicles promote bone remodeling in traumatic brain injury patients. *Exp Mol Med.* 2023 Mar;55(3):587-596. doi: 10.1038/s12276-023-00956-8. Epub 2023 Mar 3. PMID: 36869070; PMCID: PMC10073188.

LISOWSKA B, KOSSON D, DOMARACKA K. Lights and shadows of NSAIDs in bone healing: the role of prostaglandins in bone metabolism. *Drug Des Devel Ther.*

2018 Jun 18;12:1753-1758. doi: 10.2147/DDDT.S164562. PMID: 29950809; PMCID: PMC6014392.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.

LUO Z, SHANG X, ZHANG H, WANG G, MASSEY PA, BARTON SR, KEVIL CG, DONG Y. NOTCH Signaling in Osteogenesis, Osteoclastogenesis, and Angiogenesis. *Am J Pathol*. 2019 Aug;189(8):1495-1500. doi: 10.1016/j.ajpath.2019.05.005. PMID: 31345466; PMCID: PMC6699068.

LU H, KRAUT D, GERSTENFELD LC, GRAVES DT. Diabetes interferes with bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 2003;144(1):346-352

MAYFIELD, C. K., AYAD, M., LECHTHOLZ-ZEY, E., CHEN, Y., & LIEBERMAN, J. R. (2022). 3D-Printing for Critical Sized Bone Defects: Current Concepts and Future Directions. *Bioengineering*, 9(11), <https://doi.org/10.3390/bioengineering9110680>

MENDES, V. C.; Davies, E. J. A new perspective on the biology of osseointegration. *Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas*, v. 70, n. 2, 2020. ISSN 0004-5276. microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans. *The Journal of clinical investigation*, 119(12), 3666-3677.

MISHRA SK, CHOWDHARY R. Evolution of dental implants through the work of per- ingvar branemark: A systematic review. *Indian J Dent Res*. 2020;31(6):930-956. doi:10.4103/ijdr.IJDR_587_18

MIZUNO, Y.; YAGI, K.; TOKUZAWA, Y.; YATSUKA, Y. K.; SUDA, T.; KATAGIRI, T.; ET AL. miR- 125b inibe a diferenciação osteoblástica pela regulação negativa da proliferação celular. *Bioquímica. Biofísica. Res. Comum.*, v. 368, p. 267-272, 2008.

MUNSH, PARK PSU, Park-Min KH. The M-CSF receptor in osteoclasts and beyond. *Exp Mol Med*. 2020 Aug;52(8):1239-1254. doi: 10.1038/s12276-020-0484-z. Epub 2020 Aug 17. PMID: 32801364; PMCID: PMC8080670.

MURATA K, ITO H, YOSHITOMI H, ET AL. Inhibition of miR-92a enhances fracture healing via promoting angiogenesis in a model of stabilized fracture in young mice. *J Bone Miner Res*. 2014;29(2):316-326.n. 13, p. 6651, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22136651>

NAKASA T, YOSHIZUKA M, ANDRY USMAN M, ELBADRY MAHMOUD E, OCHI M. MicroRNAs and Bone Regeneration. *Curr Genomics*. 2015;16(6):441-452.

NAKASHIMA K, CROMBRUGGHE BD. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends in Genetics*. 2003;19(8):458-466.

NANCI A, WUEST JD, PERU L, BRUNET P, SHARMA V, ZALZAL S, MCKEE MD. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *J Biomed Mater Res*. 1998;40(2):324-335.

NARAYANAN A, SRI NAATH N, ROHINI M, SELVA MURUGAN N. Regulation of Runx2 by MicroRNAs in osteoblast differentiation. *Life Sci.* 2019;232:116676. doi:10.1016/j.lfs.2019.116676

OKA S, LI X, ZHANG F, TEWARI N, MA R, ZHONG L, MAKISHIMA M, LIU Y, BHAWAL UK. MicroRNA-21 facilitates osteoblast activity. *Biochem Biophys Rep.* 2020 Dec 31;25:100894. doi: 10.1016/j.bbrep.2020.100894. PMID: 33426313; PMCID: PMC7782325.

OKA, SHUNICHI ET AL. MicroRNA-21 facilitates osteoblast activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, [S.l.], v. 516, n. 2, p. 513–520, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.06.070>.

ORYAN A, KAMALI A, MOSHIRI A, BAGHABAN ESLAMINEJAD M. Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine: What Is the Evidence? *Cells Tissues Organs.* 2017;204(2):59-83. doi: 10.1159/000469704. Epub 2017 Jun 24. PMID: 28647733.

PALAZ F, KALKAN AK, TOZLUYURT A, OZSOZ M. CRISPR-based tools: Alternative methods for the diagnosis of COVID-19. *Clin Biochem.* 2021;89:1-13. doi:10.1016/j.clinbiochem.2020.12.011

PEREIRA, ANDREIA; VAZ, PAULA; ROCHA, GERMANO; FELINO, ANTÓNIO; TAVARES, Purificação. Engenharia genética em implantologia – o RANKL. *Genetic engineering in implantology - the RANKL*. [S.l.]: [s.n.], [20--]. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rboe.2021.100086>.

PITARI MR, ROSSI M, AMODIO N, ET AL. Inhibition of miR-21 restores RANKL/OPG ratio in multiple myeloma-derived bone marrow stromal cells and impairs the resorbing activity of mature osteoclasts. *Oncotarget.* 2015;6(29):27343-27358. doi:10.18632/oncotarget.439

PFEIFFENBERGER M, DAMERAU A, LANG A, BUTTGEREIT F, HOFF P, GABER T. Fracture Healing Research-Shift towards In Vitro Modeling? *Biomedicines.* 2021 Jun 28;9(7):748. doi: 10.3390/biomedicines9070748. PMID: 34203470; PMCID: PMC8301383.

PONZETTI, M.; RUCCI, N. Osteoblast differentiation and signaling: established concepts and emerging topics. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22,

PRATAP, J. ET AL. Runx2 transcriptional activation of Indian hedgehog and a downstream bone metastatic pathway in breast cancer cells. *Cancer Research*, v. 66, n. 13, p. 6231–6237, 2006. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3769.

QIU Z, DAILY. Roadmap of miR-122-related clinical application from bench to bedside. *Expert Opin Investig Drugs.* 2014;23:347-355.

RUGGIERI INC, CÍCERO AM, ISSA JPM, FELDMAN S. Cicatrização de fraturas ósseas: Perspectivas segundo bases moleculares. *J. Bone Miner. Metab.* 2021;39:311–331. doi: 10.1007/s00774-020-01168-0.

S. MIYAKI , T. SATO , A. INOUE , S. OTSUKI , Y. ITO , S. YOKOYAMA..MicroRNA-140 desempenha papéis duplos no desenvolvimento da cartilagem e na homeostase, *Genes Dev.* , 24 (2010) , pp. 1173 - 1185.

S. VIMALRAJ, B. ARUMUGAM, P.J. MIRANDA, N. SELVAMURUGAN. Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 78, 2015, Pages 202-208.

SANDHU AK, YANG Y, LI WW. In Vivo Antibacterial Efficacy of Antimicrobial Peptides Modified Metallic Implants—Systematic Review and Meta-Analysis. *ACS Biomater Sci Eng*. 2022 May 9;8(5):1749-1762.

SCHULZE F, LANG A, SCHOON J, WASSILEW GI, REICHERT J. Scaffold Guided Bone Regeneration for the Treatment of Large Segmental Defects in Long Bones. *Biomedicines*. 2023 Jan 24;11(2):325. doi: 10.3390/biomedicines11020325. PMID: 36830862; PMCID: PMC9953456.

SEYEDMAJIDI S, SEYEDMAJIDI M, ZABIHI E, HAJIAN-TILAKI K. A comparative study on cytotoxicity and genotoxicity of the hydroxyapatite-bioactive glass and fluorapatite-bioactive glass nanocomposite foams as tissue scaffold for bone repair. *J Biomed Mater Res A*. 2018;106(10):2605-2612.

SHENG J, LIANG WD, XUN CH, XU T, ZHANG J, SHENG WB. Downregulation of miR-21 promotes tibial fracture healing in rabbits through activating ERK pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019 Dec;23(23):10204-10210. doi: 10.26355/eurrev_201912_19655. PMID: 31841173.

SCHULZE F, LANG A, SCHOON J, WASSILEW GI, REICHERT J. Scaffold Guided Bone Regeneration for the Treatment of Large Segmental Defects in Long Bones. *Biomedicines*. 2023 Jan 24;11(2):325. doi: 10.3390/biomedicines11020325. PMID: 36830862; PMCID: PMC9953456

SHI Z, NEOH KG, KANG ET, POH C, WANG W. Titanium with surface-grafted dextran and immobilized bone morphogenetic protein-2 for inhibition of bacterial adhesion and enhancement of osteoblast functions. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(2):417-426.

SIM J, LIU D, XIAO J. LncRNA MALAT1 sponges miR-30 to promote the differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by promoting Runx2 expression. *Cell Tissue Res*. 2019;376(1):113-121.

SONG W, YANG C, SVEND LE DQ, ZHANG Y, KJEMS J. Calcium-MicroRNA complex- functionalized nanotubular implant surface for highly efficient transfection and enhanced osteogenesis of mesenchymal stem cells. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10:7756-7764.

SRIRAM M., SAINITYA R., KALYANARAMAN V., DHIVYA S., SELVAMURUGAN N. Entrega de microRNA mediada por biomateriais para engenharia de tecido ósseo. *Internacional J. Biol. Macromol*. 2015;74:404–412. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.12.034.

SUBRAMANIAM R, VIJAKUMARAN U, SHANMUGANANTHA L, LAW JX, ALIAS E, NG MH. The Role and Mechanism of MicroRNA 21 in Osteogenesis: An Update. *Int J Mol Sci*. 2023 Jul 11;24(14):11330. doi: 10.3390/ijms241411330. PMID: 37511090; PMCID: PMC10379984.

TUCKERMANN J, ADAMS RH. The endothelium-bone axis in development, homeostasis and bone and joint disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2021 Oct;17(10):608-620. doi: 10.1038/s41584-021-00682-3. Epub 2021 Sep 3. PMID: 34480164; PMCID: PMC7612477.

UENO T, TAKEUCHI M, HORI N, IWASA F, MINAMIKAWA H, IGARASHI Y, ANPO M, OGAWAVAN STEENBERGHE D., JACOBS R., DESNYDER M., MAFFEI G., & QUIRYNEN M. (2002). The relative impact of local and endogenous patient-related factors on implant failure up to the abutment stage. *Clinical Oral Implants Research*, 13(6), 617-622.

VAN WIJNEN, AJ, VAN DE PEPPEL J, VAN LEEUWEN JP, ET AL. MicroRNA functions in osteogenesis and dysfunctions in osteoporosis. *Curr Osteoporos, Rep*. 2013;11(2):72-82.

WAKELIN EA, YEO GC, MCKENZIE DR, BILEK MMM, WEISS AS. Plasma ion implantation enabled bio-functionalization of PEEK improves osteoblastic activity. *APL Bioeng*. 2018;2(2):026109. Published 2018 Jun 5. doi:10.1063/1.5010346

WANG ET, SANDBERG R, LUO S, ET AL. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*. 2008;456(7221):470-476.

WANG, J.; LIU, S.; LI, J.; ZHAO, S.; YI, Z. Roles for miRNAs in osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 10, n. 1, p. 197, 2019. DOI: 10.1186/s13287-019-1309-7.

WANG, L.; GAO, Z.; LIU, C.; LI, J. Potential biomarkers of abnormal osseointegration of implants in type II diabetes mellitus. *BMC Oral Health*, v. 21, n. 1, p. 583, 2021.

WANG, Z.; WU, G.; FENG, Z.; BAI, S.; DONG, Y.; WU, G.; ZHAO, Y. Microarc-oxidized titanium surfaces functionalized with microRNA-21-loaded chitosan/hyaluronic acid nanoparticles promote the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *International Journal of Nanomedicine*, v. 10, p. 6675-6687, 2015.

XI, Y.; NAKAJIMA, G.; GAVIN, E.; MORRIS, C. G.; KUDO, K.; HAYASHI, K.; JU, J. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA*, v. 13, n. 10, p. 1668-1674, 2007.

XIONG Y, CAO F, HU L, YAN C, CHEN L, PANAYI AC, SUN Y, ZHOU W, ZHANG P, WU Q, XUE H, LIU M, LIU Y, LIU J, ABUDUDILIBAIER A, MI B, LIU G. miRNA-26a-5p Accelerates Healing via Downregulation of PTEN in Fracture Patients with Traumatic Brain Injury. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019 Sep 6;17:223-234. doi: 10.1016/j.omtn.2019.06.001. Epub 2019 Jun 12. PMID: 31272072; PMCID: PMC6610686.

YAMASHITA Y, HAYASHI M, LIU A, SASAKI F, TSUCHIYA Y, TAKAYANAGI H, SAITO M, NAKASHIMA T. Fam102a translocates Runx2 and Rbpjl to facilitate Osterix expression and bone formation. *Nat Commun*. 2025 Jan 2;16(1):9. doi: 10.1038/s41467-024-55451-z. PMID: 39747056; PMCID: PMC11695619.

YANG, J.; SHUAI, J.; SIOW, L.; ET AL. Nanoesferas de silicato de magnésio carregadas com MicroRNA-146a promovem a regeneração óssea em um microambiente inflamatório. *Osso Res*, v. 12, p. 2, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41413-023-00299-0>.

YAO, JILONG; XIN, RUIWEN; ZHAO, CHAO; YU, CHUNFU. MicroRNAs in osteoblast differentiation and fracture healing: From pathogenesis to therapeutic implication. *Injury*, [S.l.], v. 55, n. 4, p. 111410, abr. 2024. DOI: 10.1016/j.injury.2024.111410. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.injury.2024.111410>.

YONEKURA Y., MIYAMOTO H., SHIMAZAKI T., ANDO Y., NODA I., & MAWATARI M., ET AL. (2011). Osteoconductivity of thermal-sprayed silver-containing hydroxyapatite coating in the rat tibia. *Journal of Bone and Joint Surgery British Volume*, 93(5), 644-649.

YUAN G, LIN X, LIU Y, GREENBLATT MB, XU R. Skeletal stem cells in bone development, homeostasis, and disease. *Protein Cell*. 2024 Jul 20;15(8):559-574. doi: 10.1093/procel/pwae008. PMID: 38442300; PMCID: PMC11259547.

ZHANG T, WANG XF, WANG ZC, LOU D, FANG QQ, HU YY, ZHAO WY, ZHANG LY, WU LH, TAN WQ. Current potential therapeutic strategies targeting the TGF- β /Smad signaling pathway to attenuate keloid and hypertrophic scar formation. *Biomed Pharmacother*. 2020 Sep;129:110287. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110287. Epub 2020 Jun 12. PMID: 32540643.

ZHAO X, XU D, LI Y, ZHANG J, LIU T, JI Y, WANG J, ZHOU G, XIE X. MicroRNAs regulate bone metabolism. *J Bone Miner Metab*. 2014 May;32(3):221-31. doi: 10.1007/s00774-013-0537-7. Epub 2013 Dec 6. PMID: 24311309.

ZHAO, D., HUA, R., RIQUELME, M.A. ET AL. Osteocytes regulate bone anabolic response to mechanical loading in male mice via activation of integrin α 5. *Bone Res* 10, 49 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41413-022-00222>

ZHOU P, SHI JM, SONG JE, ET AL. Establishing a deeper understanding of the osteogenic differentiation of monolayer cultured human pluripotent stem cells using novel and detailed analyses. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):41. Published 2021 Jan 7. doi:10.1186/s13287-020-02085-9

ZINGER O., ZHAO G., SCHWARTZ Z., SIMPSON J., WIELAND M., & LANDOLT D., ET AL.(2005). Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. *Biomaterials*, 26(14), 1837-1847.

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional
Mestrado e Doutorado



CERTIFICADO

Certifica-se que o **Prof. Dr. Marcos Fábio Henriques dos Santos** participou da Banca Examinadora da Dissertação intitulada "Influência da presença de mímicos e antagonistas de MIR-21 na osteogênese", de autoria de Angélica Santana, aluna do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – BIOTRANS, sob orientação da Professora Claudia Maria Pereira, realizada no dia 16 de maio de 2025.

Rio de Janeiro, 19 de fevereiro de 2026.

Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional - BIOTRANS



BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional
Mestrado e Doutorado



CERTIFICADO

Certifica-se que a **Profa. Dra. Carolina Kaminski Sanz** participou da Banca Examinadora da Dissertação intitulada "Influência da presença de mímicos e antagonistas de MIR-21 na osteogênese", de autoria de Angélica Santana, aluna do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – BIOTRANS, sob orientação da Professora Claudia Maria Pereira, realizada no dia 16 de maio de 2025.

Rio de Janeiro, 19 de fevereiro de 2026.

Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional - BIOTRANS



BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional
Mestrado e Doutorado



CERTIFICADO

Certifica-se que a **Profa. Dra. Tamara Silva** participou da Banca Examinadora da Dissertação intitulada "Influência da presença de mímicos e antagonistas de MIR-21 na osteogênese", de autoria de Angélica Santana, aluna do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – BIOTRANS, sob orientação da Professora Claudia Maria Pereira, realizada no dia 16 de maio de 2025.

Rio de Janeiro, 19 de fevereiro de 2026.

Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional - BIOTRANS



BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional
Mestrado e Doutorado



CERTIFICADO

Certifica-se que a **Professora Dra. Claudia Maria Pereira** orientou a Dissertação intitulada "Influência da presença de mímicos e antagonistas de MIR-21 na osteogênese", de autoria de Angélica Santana, aluna do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional – BIOTRANS, realizada no dia 16 de maio de 2025.

Rio de Janeiro, 19 de fevereiro de 2026.

Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional - BIOTRANS

Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional - BIOTRANS

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional


Mestrado e Doutorado



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO


Às 14:00 horas, do dia 16 de maio de 2025, o Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, realizou sessão de Defesa da Dissertação versando sobre o projeto intitulado "INFLUÊNCIA DA PRESENÇA DE MÍMICOS E ANTAGONISTAS DE MIR-21 NA OSTEOGÊNESE", de autoria de Angélica Santana, aluna do Mestrado Acadêmico, sob orientação da Professora Cláudia Maria Pereira. A sessão foi aberta pelo Profa. Tamara Silva, presidente da Comissão, que nos termos regimentais convocou os demais Membros da Comissão Examinadora: Profa. Carolina Kaminski Sanz e Prof. Marcos Fábio Henriques dos Santos. Em seguida, passou à palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Após a apresentação, a candidata foi arguida pelos examinadores e suas respostas foram consideradas **SATISFATÓRIAS**.

A presidente declarou a mestranda Angélica Santana **APROVADA**, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, de acordo como o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional do convênio tripartite entre UNIGRANRIO, INMETRO e UERJ. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão, em que foi lavrada a presente ata, que será assinada pelos Membros da Comissão Examinadora.


Documento assinado digitalmente
 TAMARA SILVA
Data: 16/05/2025 16:16:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Duque de Caxias, 16 de maio de 2025.

Prof. Dr. Tamara Silva
Universidade do Grande Rio - UNIGRANRIO

Documento assinado digitalmente
 CAROLINA KAMINSKI SANZ
Data: 11/11/2025 12:17:48-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Carolina Kaminski Sanz
Universidade do Grande Rio - UNIGRANRIO

Documento assinado digitalmente
 MARCOS FABIO HENRIQUES DOS SANTOS
Data: 11/11/2025 12:32:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Marcos Fábio Henriques dos Santos
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo
Coordenador Geral

Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional - BIOTRANS

Prof. Dr. Sergian Vianna Cardozo
Coordenador do PPG em Biomedicina
Translacional - BIOTRANS
UNIVERSIDADE
UNIGRANRIO

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



<i>(i) Aprovado com Ressalvas e Modificações</i>	
Comentários:	
<i>Não se aplica</i>	
Presidente:	