



Entrega Final - Ciência e Visualização de Dados em Saúde

**A Intersecção entre as Vias de sinalização envolvidas na
Osteoporose e os Genes Alvos dos Medicamentos
Raloxifeno, Ácido Zoledrônico e Alendronato de Sódio**

Barbara da P. Perez Rodrigues - Instituto de Biologia

Sophia de Alcantara Rodrigues - Faculdade de Ciências Médicas

Pablo Alessandro Barbosa Viana - Instituto de Biologia

Felipe Araújo de Lima - Instituto de Computação

Thaynara Beatriz S. de Matos - Instituto de Computação



Introdução



200 milhões

de pessoas no mundo são atingidas pela doença

Redução da densidade óssea

Alterações na **microarquitetura óssea**



Maior fragilidade



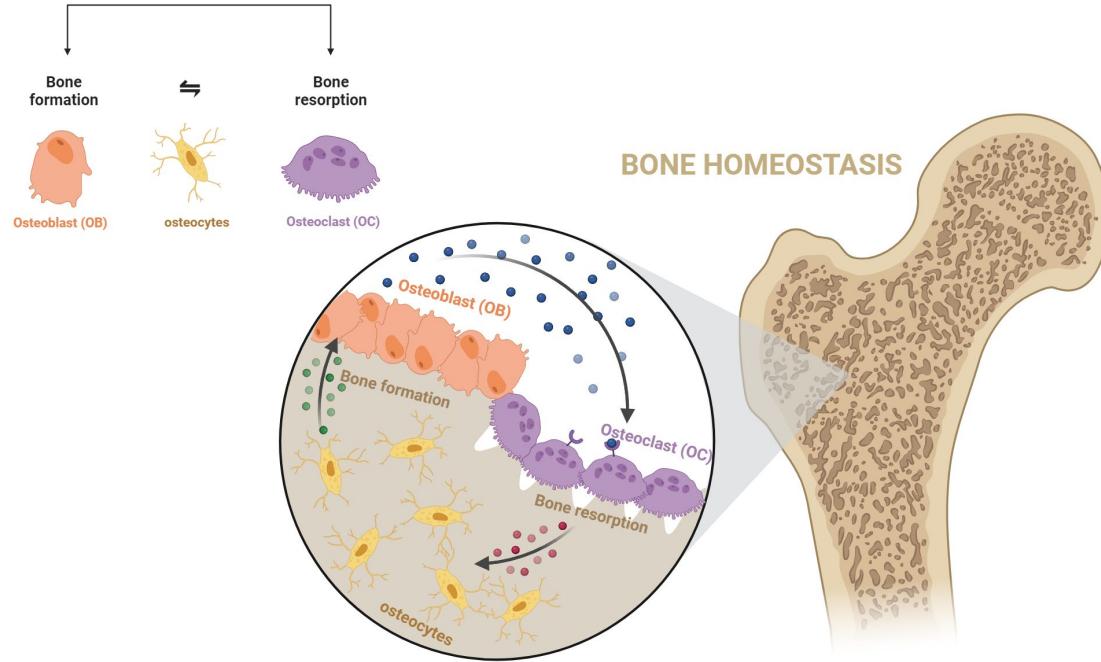
Osteoporosis

Common Symptoms



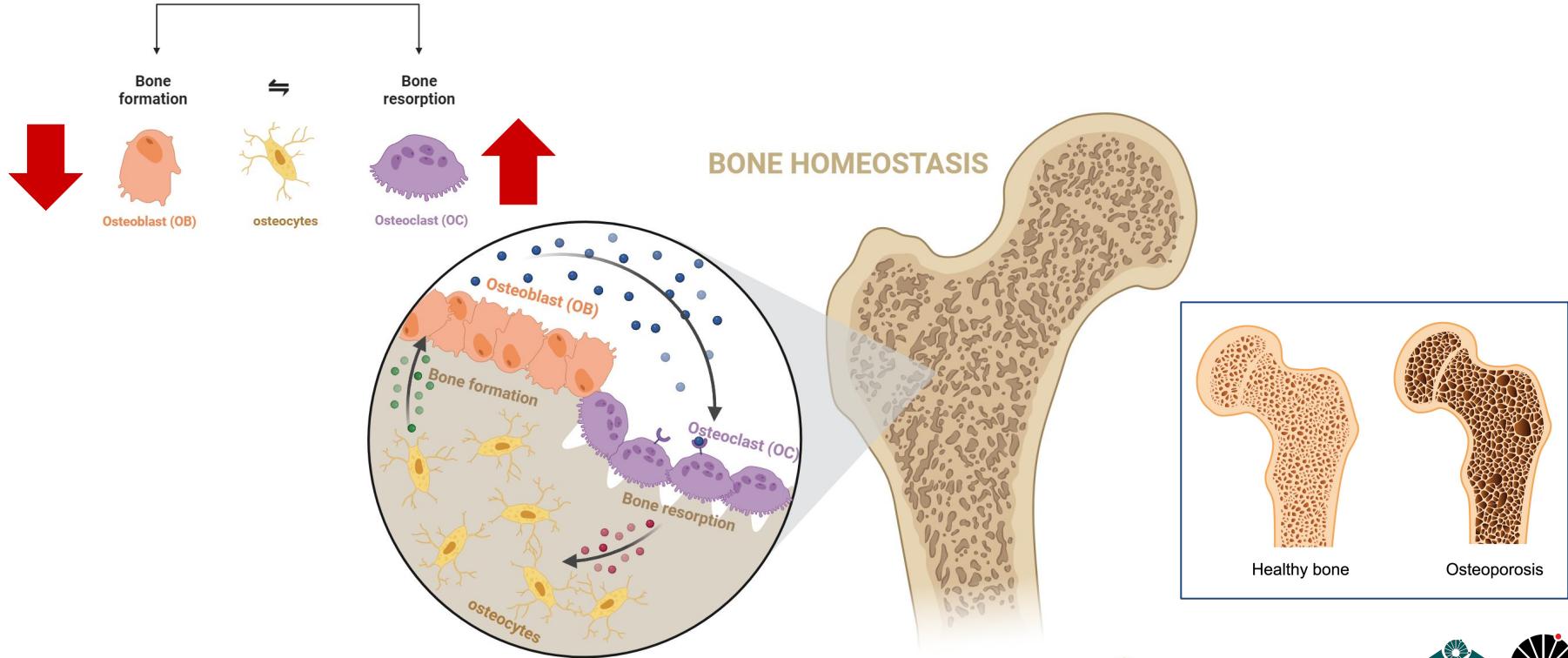


Introdução





Introdução





Medicamentos existentes



Medicamentos Antirreabsortivos

Inibem a ação dos osteoclastos



Diminuem o desequilíbrio reduzindo a reabsorção óssea



Medicamentos Anabólicos

Estimulam a ativação dos osteoblastos



Promoção da construção da matriz óssea, melhora da microarquitetura



Medicamentos alvo do estudo - Raloxifeno

Modulador Seletivo do receptor de Estrógeno

- Mimetiza o efeito protetor do estrógeno, inibindo a atividade dos osteoclastos
- Faz isso pela modulação da expressão de citocinas pró-reabsortivas favorecendo a expressão de osteoprotegerina pelos osteoblastos, a qual sequestra o ligante RANKL e impede a ativação e diferenciação dos osteoclastos





Medicamentos alvo do estudo - Aledronato de sódio e Ácido Zoledrônico

Bifosfonatos nitrogenados de terceira geração

- São internalizados pelos osteoclastos ativos na superfície óssea
- Dentro da célula inibem a enzima Farnesil Pirofosfato Sintase
- Impedem o surgimento de modificações pós traducionais em proteínas G que são essenciais para a sobrevivência, função e morfologia dos osteoclastos
- Resultado final: apoptose do osteoclasto





Pergunta a ser respondida

Como 3 dentre os medicamentos mais indicados para o tratamento da osteoporose agem nas **vias de sinalização** envolvidas na doença?



Relevância do estudo

↑ Prevalência e da incidência da osteoporose no Brasil



Estudo original por propor uma **abordagem comparativa e integrativa** para mapear as interações entre fármacos, proteínas e vias de sinalização relacionadas à doença

Importância clínica:
Contribuição para **Tratamento Personalizado**





Metodologia



Obter genes
diferencialmente
expressos



STRING

Identificar as relações
entre os genes

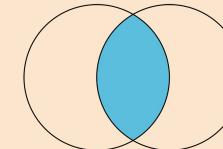


Encontrar genes com
maior centralidade



Bio-Chemoinformatics
Group (GBQ)

Obter genes targets de
cada medicamento



Comparar com os
principais genes
envolvidos na doença



Dados de input

Foram escolhidos conjuntos de dados usados no estudo de referência. Inclui:

- Expressão gênica de monócitos sanguíneos de mulheres

	GSE7158	GSE56815	GSE56814
Baixa densidade óssea	12	15	20
Alta densidade óssea	14	16	20



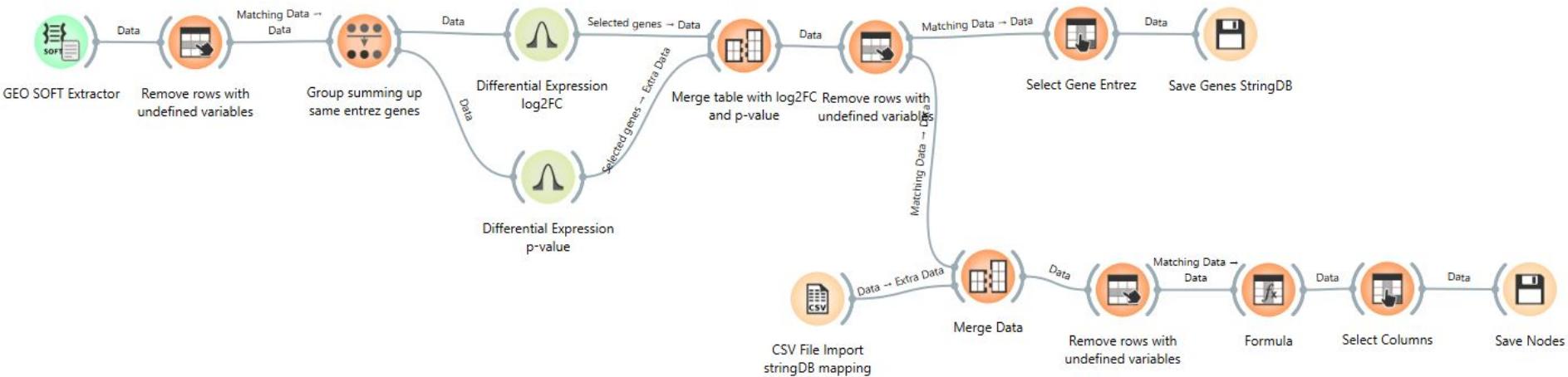
Metodologia Expressão Diferencial

Para cada conjunto de dados foram seguidos os seguintes passos:

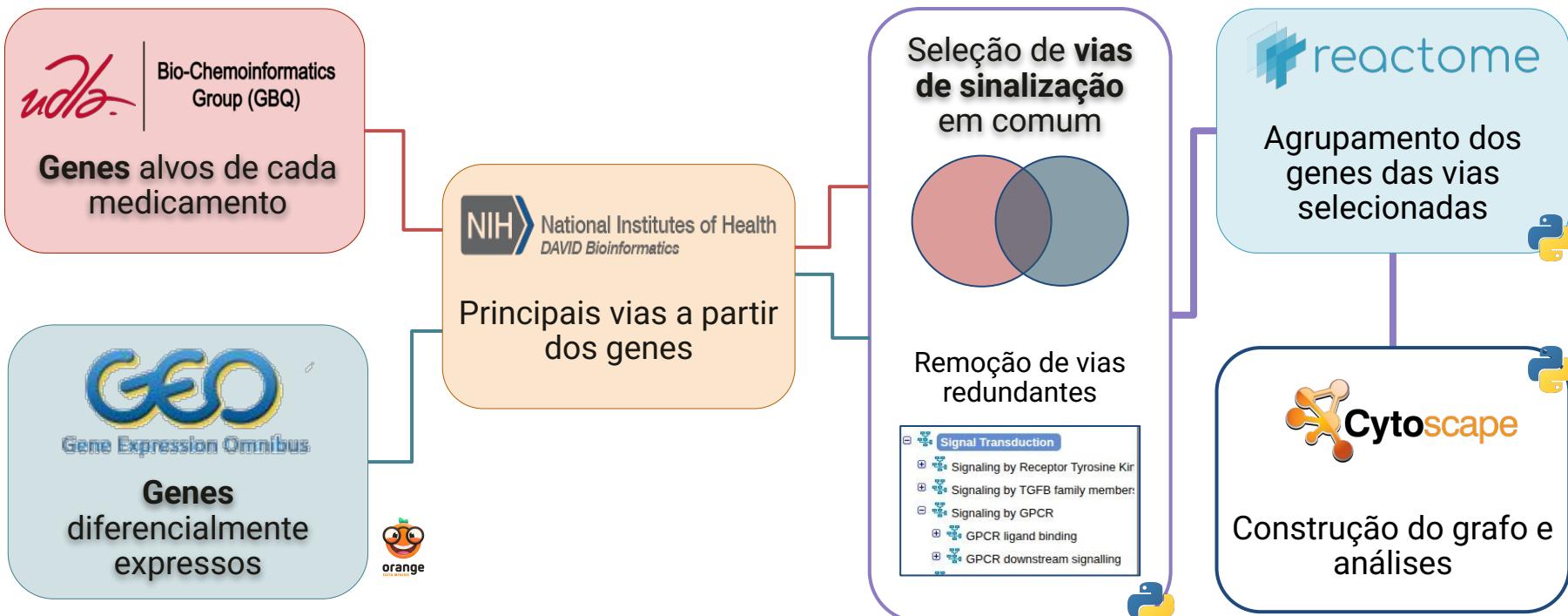
- Identificamos os genes expressos em alta densidade óssea (normal) e baixa densidade óssea (osteoporose);
- Calculamos a logFC e p-value da expressão diferencial;
- Cada conjunto de dados seguiu normalizações distintas, para equalizar os resultados utilizamos os 1000 genes com maior diferença de expressão e p-value < 0.05;
- Salvamos os EntrezID dos genes selecionados e colocamos no string-db para pegar a rede de interações;
- Salvamos os valores de expressão diferencial de cada gene para subir no cytoscape.



Fluxo de dados (Orange)



Metodologia





Resultados Aledronato de Sódio

SMILE do medicamento

C(CC(O)(P(=O)(O)O)P(=O)(O)[O-])CN.O.O.O.[Na+]

Target identification v1

The understanding of a chemical component's mechanism of action and side effects, as well as drug discovery and systems biology, depend on the prediction of compound-target interaction. So, this web tool publishes some newly developed target-centric models employing different types of molecular descriptions and machine learning algorithms. Additionally, a consensus strategy based on these models is also published as a potential advancement above individual forecasts.

FGP Descriptors

DSC Descriptors

FUS Descriptors

Consensus

Help

Smiles Input:

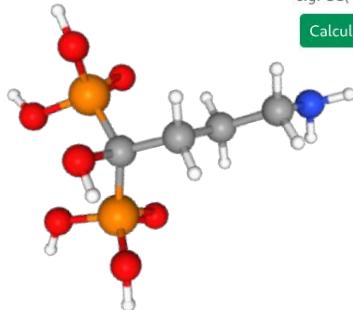
C(CC(O)(P(=O)(O)O)P(=O)(O)[O-])CN.O.O.O.[Na+]

e.g. CC(=O)O[C@H]1CC[C@J]2(C)[C@@H](CC[C@J]3(C)[C@@H]2CC=C4[C@@H]5CC(C)C[C@@]5(CC[C@@]34C)C(=O)OCc6cccc6[C@J]1(C)C=O

Calculate

Example

Clear



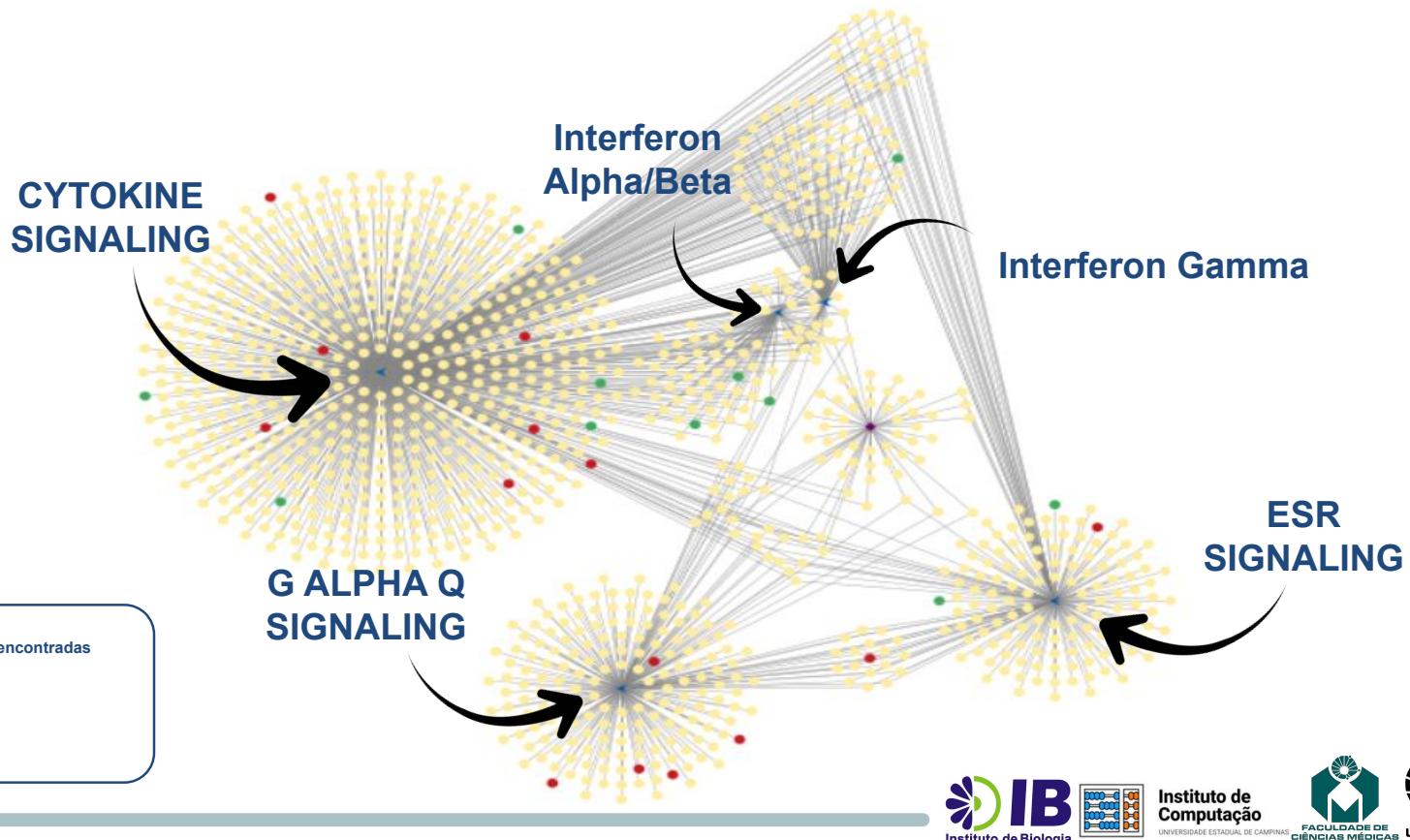
58 proteínas

com alta probabilidade de serem alvos do
medicamento Aledronato de sódio



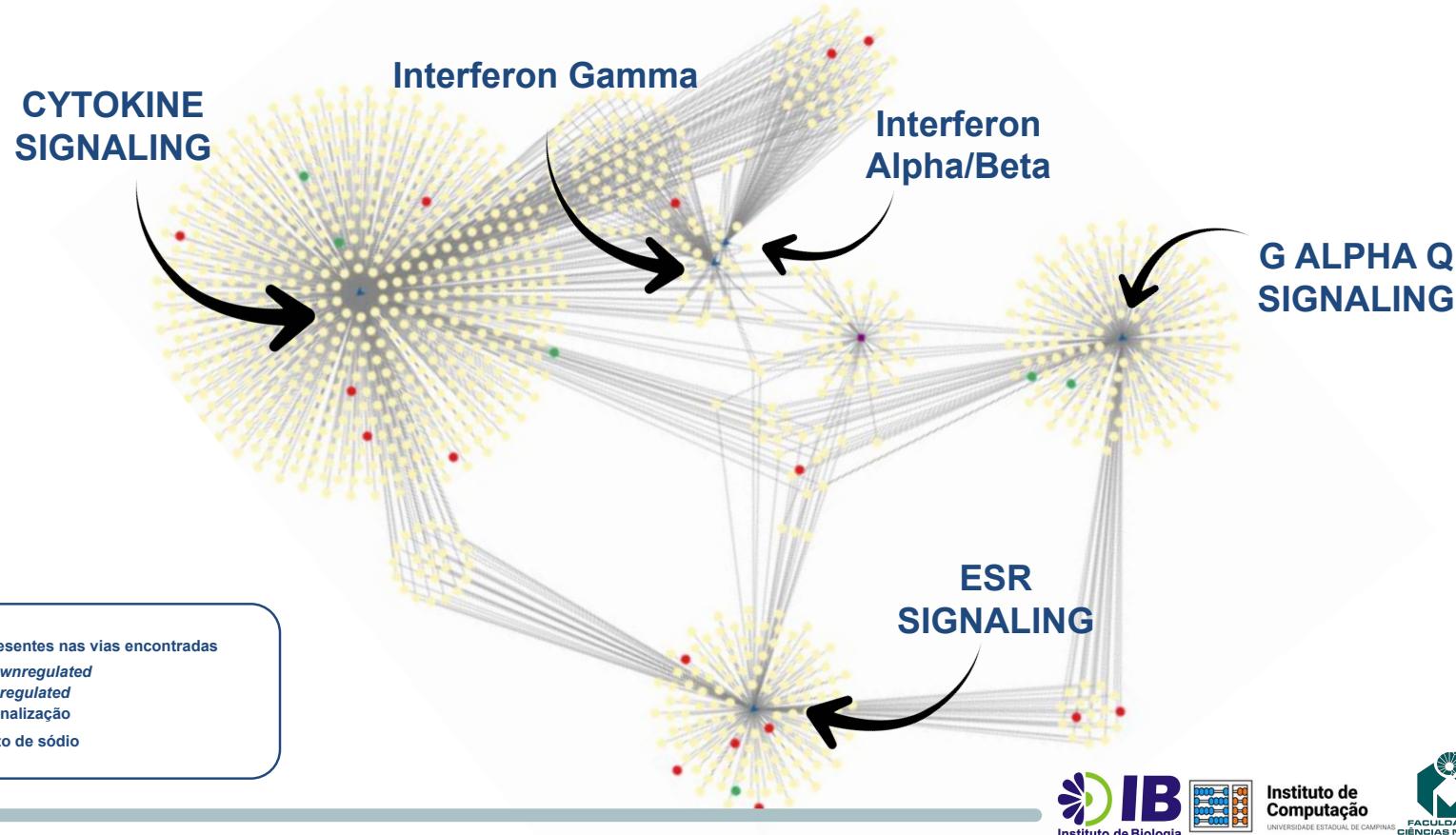


Resultados Aledronato de Sódio - GSE7158



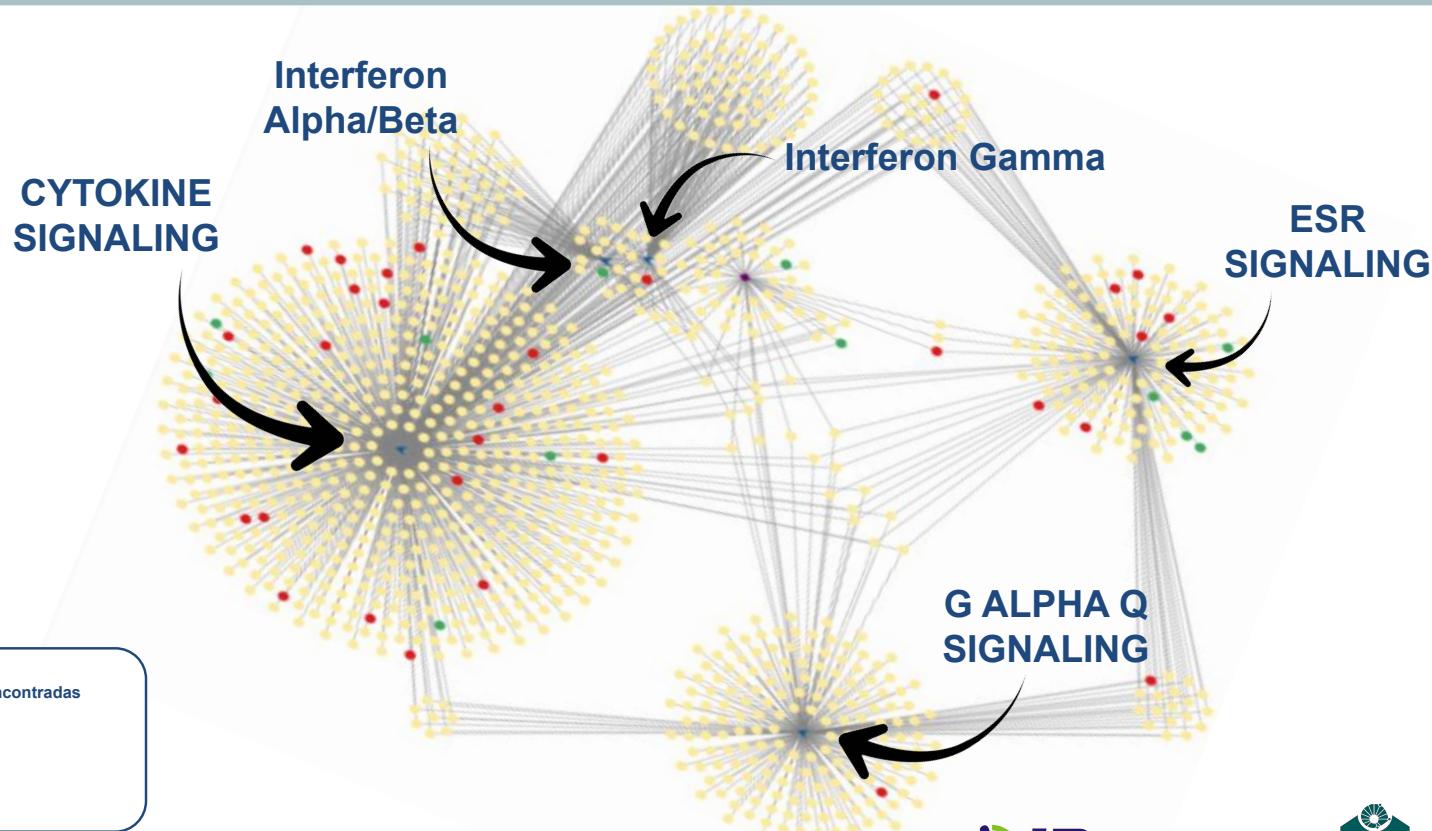


Resultados Aledronato de Sódio - GSE56814





Resultados Aledronato de Sódio - GSE56815





Discussão Alendronato

- 1) Cytokine Signaling: PIK3CD, CA1, FLT3, OPRM, PTGS2
 - Genes mais expressos desta via na osteoporose: TNFSF8, IFNL2, SERPINB
 - Genes menos expressos desta via na osteoporose: CXCL8, PIM1, NFKBIA, RELB, NFKB2, **IFNA1, IFNA2, SMAD7, MMP3**
- 2) Interferon Alpha / Beta: JAK1, TYK2, PTPN11
 - Genes menos expressos desta via na osteoporose: **IFNA1, IFNA2**
- 3) Interferon Gamma: PTPN11, JAK1
 - Genes menos expressos desta via na osteoporose: **SMAD7**
- 4) ESR Signaling: KDM1A, PTK2, CTSD, EGFR, AKT2, MAPK1,
 - Genes menos expressos desta via na osteoporose: H2BC17, FOSB, POLR2J, H2BC1, JUND, **GNG8, GNG13, MMP3**
- 5) G Alpha Q Signaling: EGFR, MGLL, GRK2, MAPK3, MAPK1
 - Genes mais expressos desta via na osteoporose: LPAR6, CYSLTR2
 - Genes menos expressos desta via na osteoporose: **GNG8, GNG13, MMP3**



Discussão Alendronato

1) Cytokine Signaling: PIK3CD, CA1, FLT3, OPRM, PTGS2

- Genes mais expressos desta via na osteoporose: TNFSF8, IFNL2, SERPINB
- Genes menos expressos desta via na osteoporose: CXCL8, PIM1, NFKBIA, RELB, NFKB2, **IFNA1, IFNA2, SMAD7, MMP3**

Na osteoporose: Aumento da inflamação e da reabsorção óssea.

TNFSF8 - Ativação inflamatória crônica e osteoclastica;
IFNL2 - Alteração da diferenciação osteoblástica;
SERPINB - Resposta protetora contra apoptose celular;

CXCL8- Menor recrutamento de células imunes;
PIM1- Aumento da apoptose de osteoblastos;
NFKBIA- Inibidor de NF-κB. Sua redução = Mais NF-κB = inflamação crônica e a reabsorção óssea;
RELB / NFKB2- Menor resposta anti-inflamatória;
IFNA1 / IFNA2- Controle anti-inflamatório;
SMAD7- Inibidor da via TGF-β/BMP. Sua redução = ativação de TGF-β = redução da formação óssea;
MMP3- Menor remodelação óssea = osso frágil.

Alendronato: Redução da inflamação e da reabsorção óssea.

Inibição de PI3K/AKT e NF-κB = redução da sobrevivência osteoclastica;

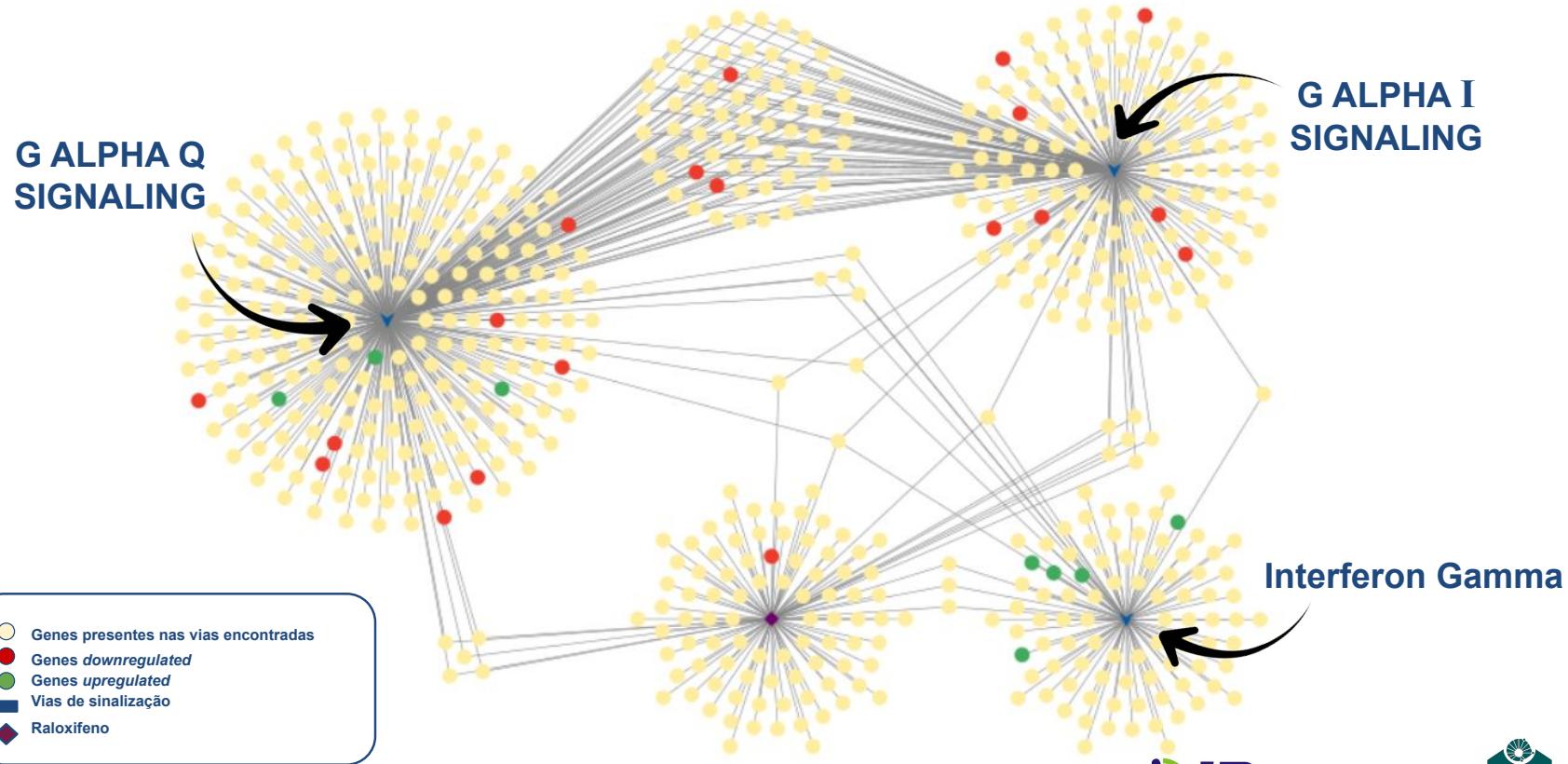
Supressão da COX-2 (PTGS2) = Redução da síntese de sinalizadores inflamatórios;

Inibe CA1 = Importante para acidificação durante a reabsorção óssea;

Inibe FLT3 = Redução do estímulo para proliferação de células hematopoiéticas e sinalização inflamatória.

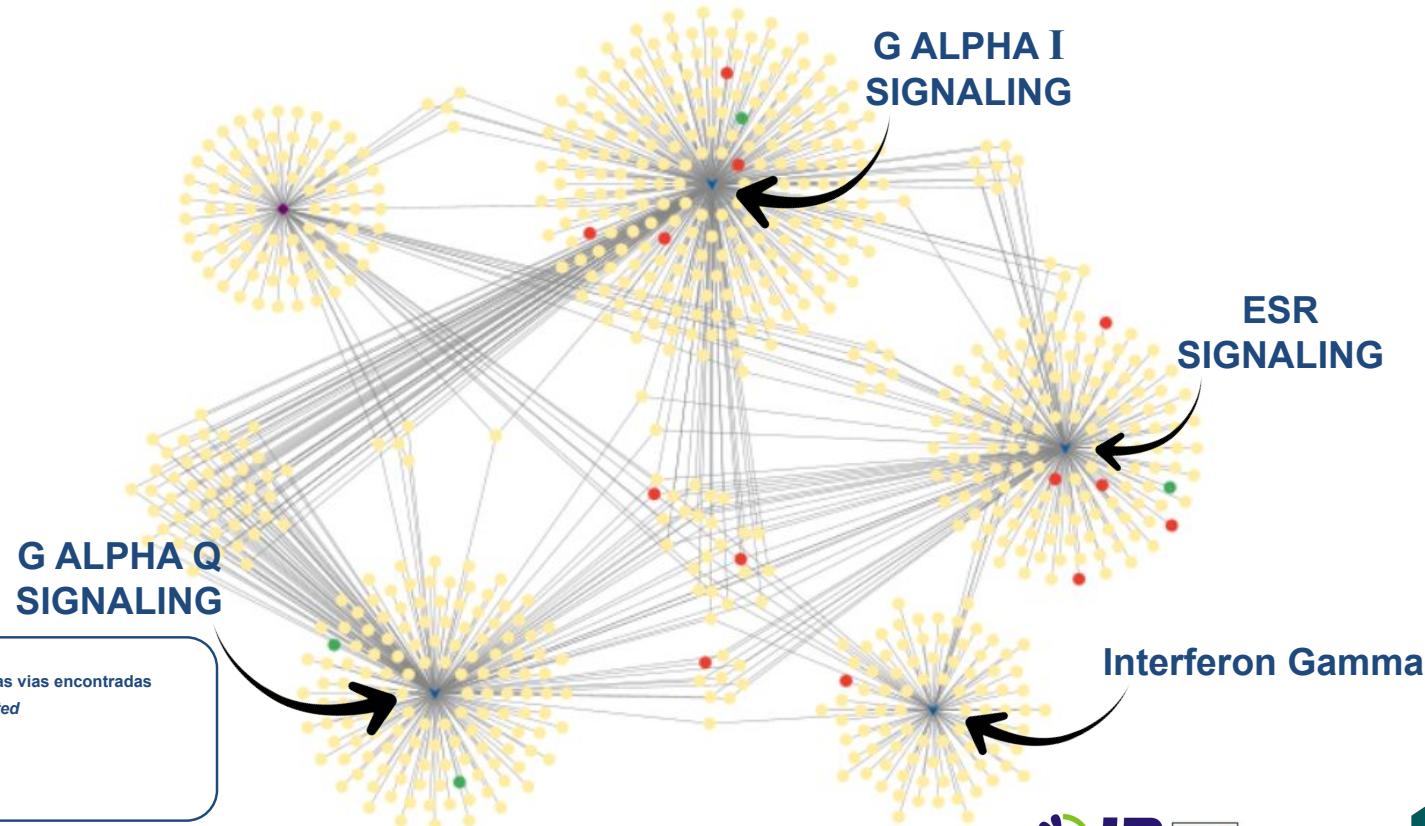


Resultados Raloxifeno - GSE7158



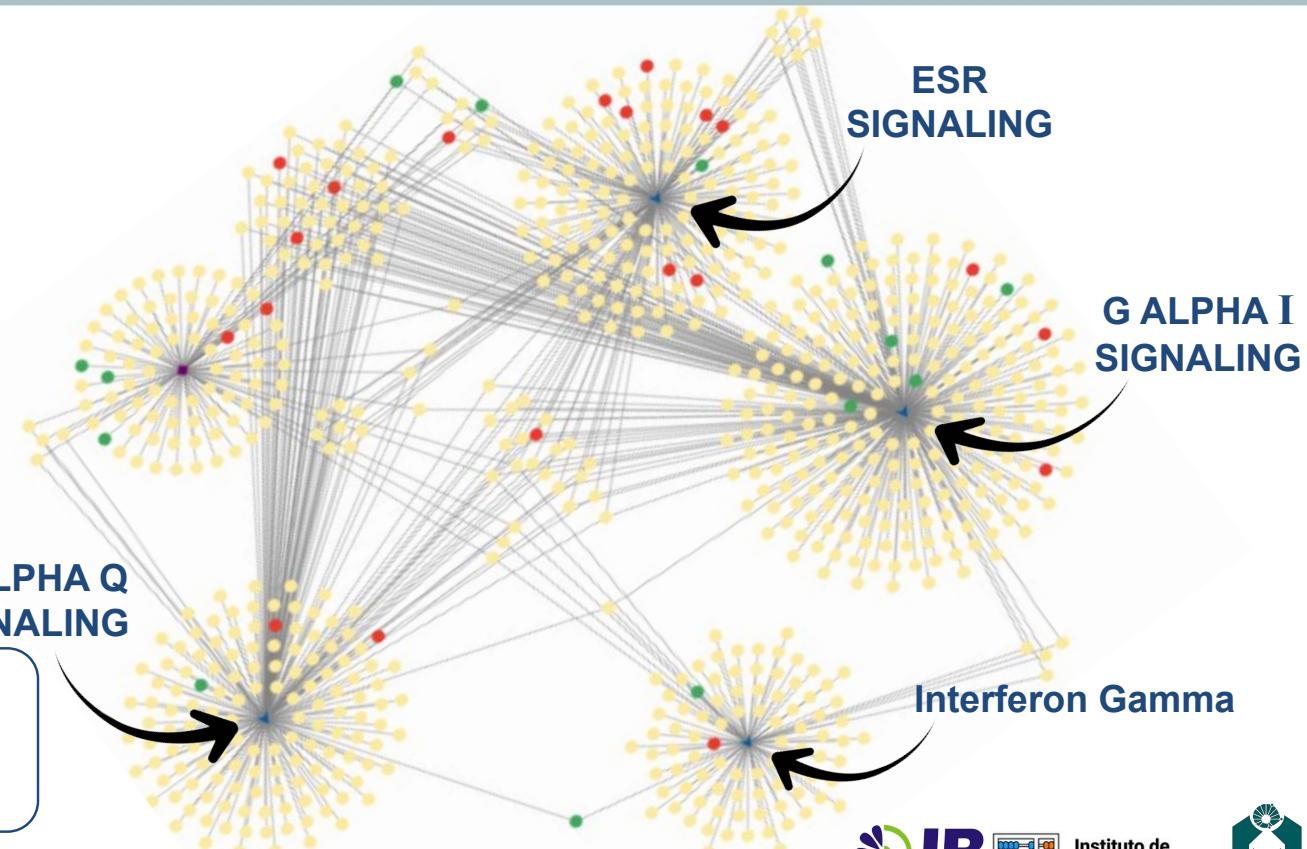


Resultados Raloxifeno - GSE56814





Resultados Raloxifeno - GSE56815





Discussão Raloxifeno



- 1) Interferon Alpha / Beta: **JAK1, JAK2, PTPN11, MAPK1, MAPK3**
 - Genes mais expressos desta via na osteoporose (verde): GBP4, OAS3, GBP1, STAT1, FCGR1A
- 2) G Alpha Q Signaling: **MAPK1, MAPK3, RPS6KA3, F2, MGLL, EGFR, BTK, PIK3CA**
 - Genes menos expressos desta via na osteoporose: HCRTR2, CCL23, GRP, NMUR1, GPR143, DGKB, LTB4R2, GPRC6A, CXR1, GNGT1
- 3) G Alpha (I) Signaling: **MAPK1, PRKCD, GRK2, SRC, OPRM1, CHRM2, PDE4D, PDE4B**
 - Genes mais expressos desta via na osteoporose (verde): CXCL10, C3, CXCL11
 - Genes menos expressos desta via na osteoporose: PRKACG, OPRK1, CCR5, CCL13, HTR5A, CCL23, GNGT1, NMUR1, GPR55, CCL1, CXCR3



Discussão Raloxifeno



1) Interferon Alpha / Beta: JAK1, JAK2, PTPN11, MAPK1, MAPK3

- Genes mais expressos desta via na osteoporose (verde): GBP4, OAS3, GBP1, STAT1, FCGR1A

Na osteoporose: inflamação crônica, estresse oxidativo e inibição da formação óssea.

STAT1 – Inibição da diferenciação osteoblástica e estímulo à reabsorção óssea.

GBP1 – Aumento da inflamação local e ativação osteoclastica mediada por macrófagos.

GBP4 – Intensificação da resposta inflamatória; favorece ambiente pró-reabsortivo.

OAS3 – Indução de estresse celular e apoptose em osteoblastos; redução da regeneração óssea.

FCGR1A – Ativação de macrófagos e osteoclastos; aumento da degradação da matriz óssea.

Raloxifeno: Imita o efeito do estrogênio nos ossos, reduzindo a inflamação, diminuindo a ativação de osteoclastos e aumentando a sobrevida de osteoblastos.

JAK1 / JAK2 – Diminuição da expressão de genes pró-inflamatórios e reduz a diferenciação de osteoclastos.

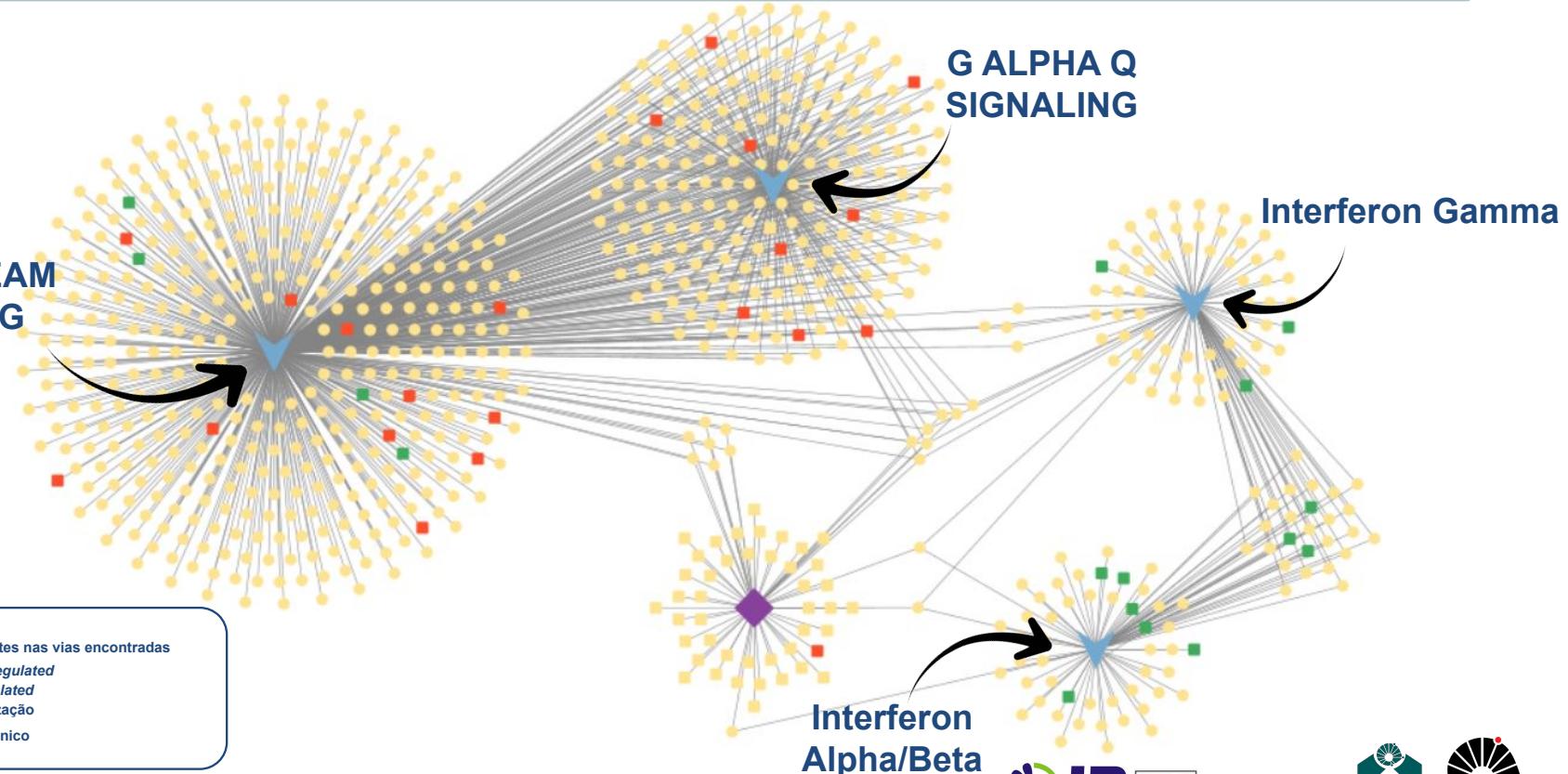
PTPN11 – Inibição da superativação de SHP2, equilibrando a sinalização de crescimento e sobrevivência celular.

MAPK1 / MAPK3 – modulação da ativação de ERK1/2, promovendo efeito anabólico nos osteoblastos e inibição da apoptose.



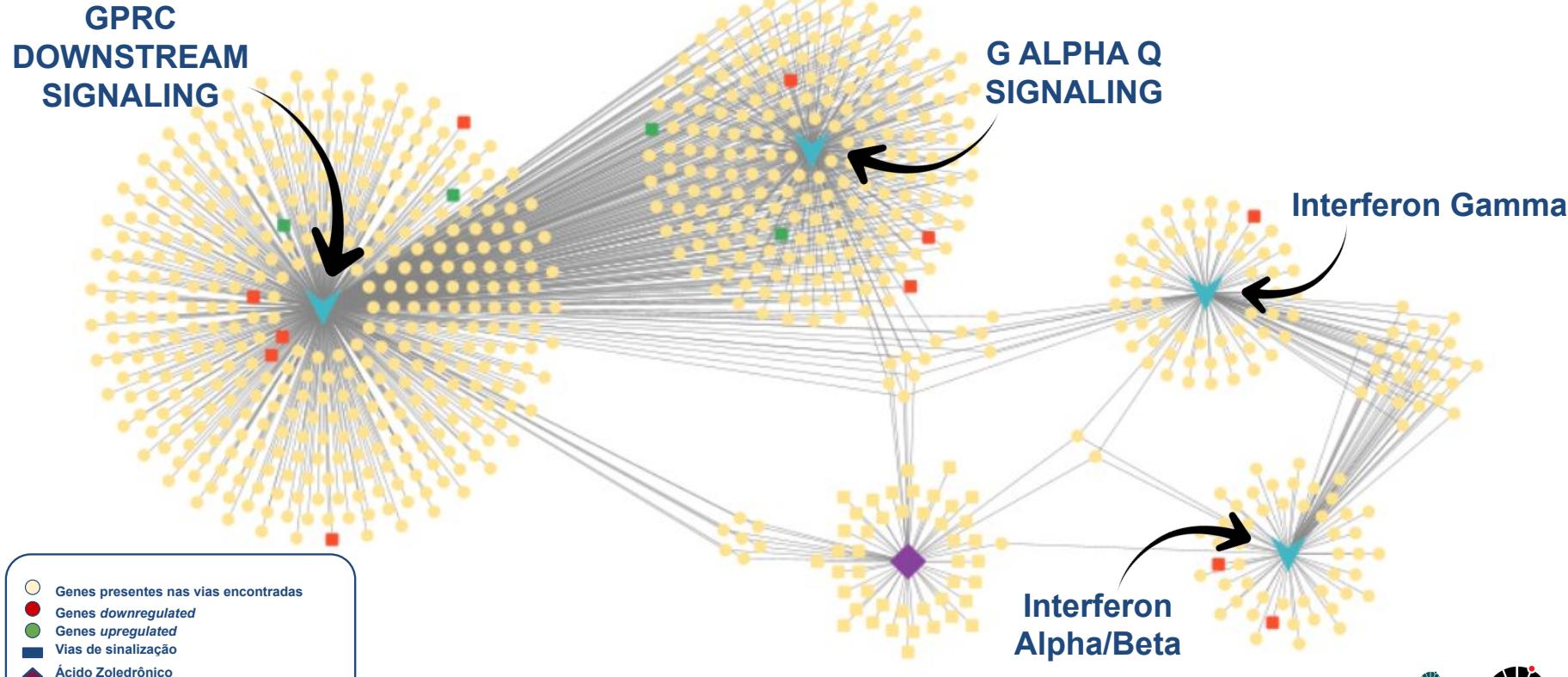
Resultados Ácido Zoledrônico - GSE7158

GPRC
DOWNSTREAM
SIGNALING



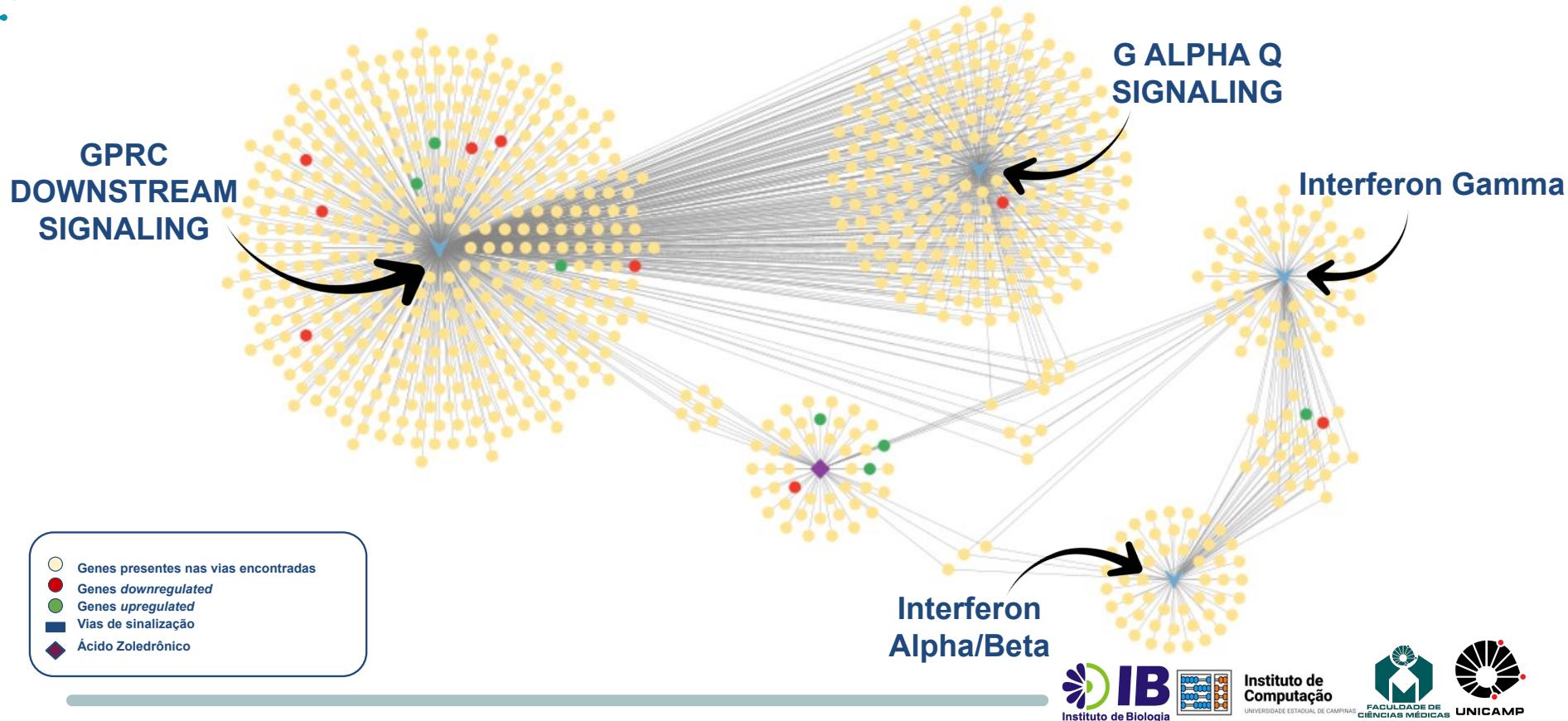


Resultados Ácido Zoledrônico - GSE56814





Resultados Ácido Zoledrônico - GSE56815





Discussão Ácido zoledrônico

- 1) GPCR Signaling: **OPRM1, PDE7A, PDE3A, PDE10A, PAK1, AKT2, PDE2A**
 - Genes mais expressos desta via na osteoporose: CXCL11, GPR84, C3, CXCL10
 - Genes menos expressos desta via na osteoporose: HCRTR2, CCL23, GRP, NMUR1, GPR143, DGKB, LTB4R2, GPRC6A, XCR1, CCL13, IAPP, PRKACG, GPR55, FSHR, MC4R, CCR5, HTR5A, RHOC, CXCR3, CCL1
- 2) Interferon Alpha / Beta: **JAK1, PTPN11, TYK2, MAPK1, MAPK3**
 - Genes mais expressos desta via na osteoporose (verde): IFI35, MX1, IFNA4, XAF1, RSAD2, IFNA7, STAT1, GBP2, OAS3
- 3) Interferon Gamma: **MAPK1, MAPK3, EGFR, RPS6KA3, MGLL**
 - Genes mais expressos desta via na osteoporose: STAT1, GBP2, OAS3, GBP1, GBP4, FCGR1A
- 4) G Alpha Q Signaling: **MAPK1, MAPK3, EGFR, RPS6KA3, MGLL**
 - Genes menos expressos desta via na osteoporose: HCRTR2, CCL23, GRP, NMUR1, GPR143, DGKB, LTB4R2, GPRC6A, XCR1



Discussão Ácido zoledrônico

1) GPCR Signaling: OPRM1, PDE7A, PDE3A, PDE10A, PAK1, AKT2, PDE2A

- Genes mais expressos desta via na osteoporose: CXCL11, GPR84, C3, CXCL10
- Genes menos expressos desta via na osteoporose: HCRTR2, CCL23, GRP, NMUR1, GPR143, DGKB, LTB4R2, GPRC6A, XCR1, CCL13, IAPP, PRKACG, GPR55, FSHR, MC4R, CCR5, HTR5A, RHOC, CXCR3, CCL1

Na osteoporose: Aumento da inflamação e da reabsorção óssea, pela modulação da resposta das células ósseas e imunes a hormônios e sinais inflamatórios.

CXCL11 – Recrutamento de células T; inflamação crônica

GPR84 – Ativação de macrófagos pró-inflamatórios

C3 – Intensificação da inflamação

XCL10 – Atração de linfócitos Th1; amplificação da resposta inflamatória e osteoclástica.

HCRTR2 – Redução de sinalização neuro-hormonal anabólica

CCL23 – Menor recrutamento de células regenerativas

GRP – Diminuição da atividade osteoblástica

NMUR1 – Menor regulação metabólica e estímulo à osteogênese

GPR143 – Redução da sinalização de diferenciação celular.

DGKB – Alteração no metabolismo energético das células ósseas.

GPRC6A – Redução da resposta anabólica ao cálcio e osteocalcina; menos formação óssea...

Ácido zoledrônico: redução da atividade osteoclastica, menor recrutamento via quimiocinas e alteração da inflamação local.

OPRM1 (receptor opioide μ)- controle da resposta inflamatória e sinalização de sobrevivência celular.

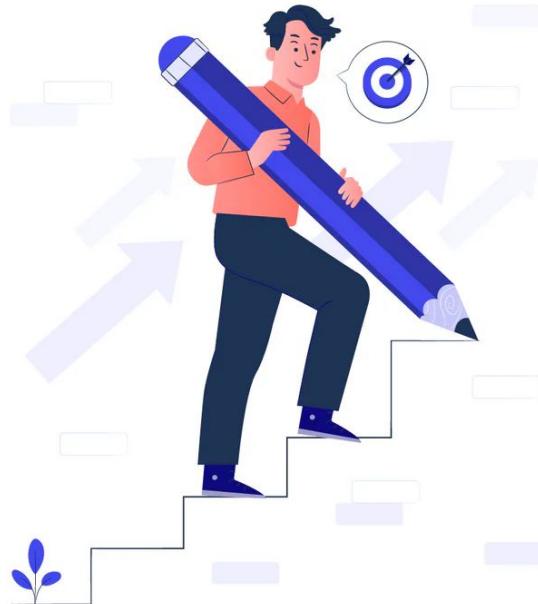
PDE7A / PDE3A / PDE10A / PDE2A (fosfodiesterases)- modulação da resposta inflamatória e atividade celular.

PAK- controle da remodelação do citoesqueleto e sobrevivência.

AKT2- Regulação da sobrevivência celular, metabolismo e resistência à apoptose.



Próximos passos



- 1) Realizar simulações de dinâmica molecular para avaliar afinidade e estabilidade das interações fármaco-proteína.
- 2) Correlacionar os alvos identificados com dados de expressão gênica e proteica em tecidos ósseos humanos.
- 3) Validar experimentalmente os principais alvos e vias envolvidas.
- 4) Avaliar o potencial translacional dos achados, sugerindo biomarcadores de resposta terapêutica e possíveis novas aplicações clínicas.



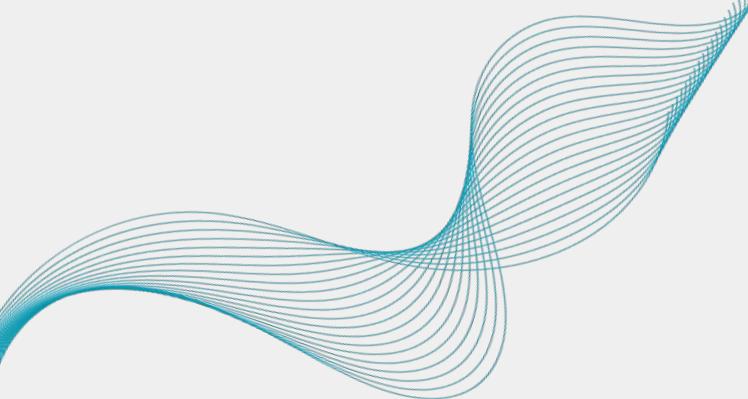
Referências Bibliográficas

1. Reszka, A.A., Rodan, G.A. Bisphosphonate mechanism of action. *Curr Rheumatol Rep* 5, 65–74 (2003).
2. Agabiti SS, Liang Y, Wiemer AJ. Molecular mechanisms linking geranylgeranyl diphosphate synthase to cell survival and proliferation. *Mol Membr Biol*. 2016 Mar;33(1-2):1-11.
3. Ma X, Xu Z, Ding S, Yi G, Wang Q. Alendronate promotes osteoblast differentiation and bone formation in ovariectomy-induced osteoporosis through interferon- β /signal transducer and activator of transcription 1 pathway. *Exp Ther Med*. 2018 Jan;15(1):182-190.
4. Black DM, Delmas PD, Eastell R, et al. HORIZON Pivotal Fracture Trial. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med*. 2007 May 3;356(18):1809-22.
5. Tai TW, Chen CY, Su FC, Tu YK, Tsai TT, Lin CF, Jou IM. Reactive oxygen species are required for zoledronic acid-induced apoptosis in osteoclast precursors and mature osteoclast-like cells. *Sci Rep*. 2017 Mar 10;7:44245.
6. Dhillon S. Zoledronic Acid (Reclast®, Aclasta®): A Review in Osteoporosis. *Drugs*. 2016 Nov;76(17):1683-1697.
7. Clemett D, Spencer CM. Raloxifene: a review of its use in postmenopausal osteoporosis. *Drugs*. 2000 Aug;60(2):379-411.
8. D'Amelio P, Isaia GC. The use of raloxifene in osteoporosis treatment. *Expert Opin Pharmacother*. 2013 May;14(7):949-56.
9. Lu HF, Chou PH, Lin GH, Chou WH, Wang ST, Adikusuma W, Mugiyanto E, Hung KS, Chang WC. Pharmacogenomics Study for Raloxifene in Postmenopausal Female with Osteoporosis. *Dis Markers*. 2020 Aug 31;2020:8855423.
10. Yang TL, Shen H, Liu A, Dong SS, Zhang L, Deng FY, Zhao Q, Deng HW. A road map for understanding molecular and genetic determinants of osteoporosis. *Nat Rev Endocrinol*. 2020 Feb;16(2):91-103.



Referências Bibliográficas

11. Munro Peacock, Charles H. Turner, Michael J. Econo, Tatiana Foroud, Genetics of Osteoporosis, *Endocrine Reviews*, Volume 23, Issue 3, 1 June 2002, Pages 303–326.
12. Long F Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 13, 27–38.
13. Elahmer NR, Wong SK, Mohamed N, Alias E, Chin KY, Muhammad N. Mechanistic Insights and Therapeutic Strategies in Osteoporosis: A Comprehensive Review. *Biomedicines*. 2024 Jul 23;12(8):1635.
14. Wojdasiewicz P, Turczyn P, Dobies-Krzesniak B, Frasunska J, Tarnacka B. Role of CX3CL1/CX3CR1 Signaling Axis Activity in Osteoporosis. *Mediators Inflamm*. 2019 Nov 12;2019:7570452. doi: 10.1155/2019/7570452. PMID: 31780870; PMCID: PMC6875359.
15. De Martinis M, Sirufo MM, Suppa M, Ginaldi L. IL-33/IL-31 Axis in Osteoporosis. *Int J Mol Sci*. 2020 Feb 13;21(4):1239.



Obrigado pela atenção!

Barbara da P. Perez Rodrigues - Instituto de Biologia

Sophia de Alcantara Rodrigues - Faculdade de Ciências Médicas

Pablo Alessandro Barbosa Viana - Instituto de Biologia

Felipe Araújo de Lima - Instituto de Computação

Thaynara Beatriz S. de Matos - Instituto de Computação

