

NÍVEIS DE EXPRESSÃO GÊNICA DAS SEMAFORINAS 3A e 4D NO REPARO ÓSSEO ALVEOLAR DE RATOS NORMO E HIPERGLICEMICOS.

¹Gabriela Maria Redondo, ²Fernando Souza Malta, ³Vanessa Sousa da Silva, ⁴Marta Ferreira Bastos

RESUMO

O diabetes mellitus é uma desordem metabólica de múltipla etiologia caracterizada pela hiperglicemia crônica com distúrbios no metabolismo que podem afetar de modo negativo a cicatrização e o reparo tecidual. Diversas vias de sinalização desempenham um papel essencial na manutenção da integridade do esqueleto pela regulação positiva ou negativa das células ósseas. As semaforinas constituem uma família de proteínas ligadas a superfície celular ou secretadas que são capazes de regular a interação, morfologia e função de diferentes tipos de células. A Semaforina 3A (Sem3A) tem sido envolvida em atividades de remodelamento ósseo, e também são encontrados relatos sobre a atividade da Semaforina 4D (Sem4D) durante a reabsorção óssea realizada pelos osteoclastos. O objetivo do presente estudo foi avaliar o nível de expressão das Semaforinas 3A e 4D do tecido ósseo alveolar neoformado de ratos normo e hiperglicêmicos. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: Não Hiperglicêmicos (NH, n=10) e hiperglicêmicos (H, n=10). A hiperglicemia foi induzida nos animais pela administração de água com 10% de frutose e estreptozotocina no 14º dia após. No 76º dia após indução da hiperglicemia, todos os animais foram anestesiados e submetidos a uma exodontia para remoção dos molares inferiores. No 84º dia aconteceu à eutanásia, em seguida foi realizada uma curetagem do tecido ósseo neoformado que foi armazenado em RNA later® para extração do RNA total, tratamento com DNase e preparo do cDNA e análise da expressão gênica de Sem3A e Sem4D. Os resultados foram submetidos a teste de normalidade e foram selecionados teste não paramétrico com nível de significância estabelecido em 5% ($p < 0,05$). Os resultados do presente estudo sugerem que no modelo experimental utilizado, os níveis de expressão gênica de Sema 3A e 4D não estão associados ao impacto negativo da hiperglicemia sobre o reparo ósseo.

PALAVRAS-CHAVE: hiperglicemia; semaforinas; expressão gênica; ratos.

¹ Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade São Judas Tadeu, São Paulo (Brasil).

² Graduação em Odontologia, Mestrado em Periodontia pela Universidade Guarulhos, São Paulo (Brasil).

³ Graduação em Ciências Biológicas pela Universidade São Judas Tadeu, São Paulo (Brasil).

⁴ Professor Adjunto Programa de Pós Graduação em Ciências do Envelhecimento, Universidade São Judas Tadeu, São Paulo (Brasil).

LEVELS OF GENE EXPRESSION OF SEMAPHORINS 3A AND 4D IN ALVEOLAR BONE REPAIR OF NORMAL AND HYPERGLYCEMIC RATS.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia with disturbances in the metabolism that can negatively affect healing and tissue repair. Several signaling pathways play an essential role in maintaining skeletal integrity through positive or negative bone cell regulation. Semaphorins are a family of proteins bound to the cell surface or secreted that can regulate the interaction, morphology, and function of different types of cells. Semaphorin 3A (Sem3A) has been involved in bone remodeling activities, and reports on Semaphorin 4D (Sem4D) activity during bone resorption performed by osteoclasts are also found. The present study aimed to evaluate the level of expression of Semaphorins 3A and 4D in the newly formed alveolar bone tissue of normal and hyperglycemic rats. The animals were divided into the following groups: Non-hyperglycemic (NH, n = 10) and hyperglycemic (H, n = 10). Hyperglycemia was induced in animals by water added 10% fructose and streptozotocin on the 14th day after. On the 76th day after hyperglycemia induction, all animals were anesthetized to remove the lower molars. On the 84th day, euthanasia took place, followed by curettage of the newly formed bone tissue was stored in RNA later® for extraction of total RNA, treatment with DNase and preparation of the cDNA, and analysis of the gene expression of Sem3A and Sem4D. The results were subjected to a normality test, and a non-parametric test was selected with a significance level set at 5% ($p < 0.05$). The present study results suggest that in the experimental model used, the levels of gene expression of Sem 3A and 4D are not associated with the negative impact of hyperglycemia on bone repair.

KEYWORDS: hyperglycemia; semaphorins; gene expression; rats.

NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA DE SEMAPORINAS 3A y 4D EN LA REPARACIÓN DEL HUESO ALVEOLAR DE RATAS NORMALES E HIPERGLICÉMICAS

RESUMEM

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico de etiología múltiple caracterizado por hiperglucemia crónica con alteraciones en el metabolismo que pueden afectar negativamente a la cicatrización y reparación tisular. varias vías de señalización juegan un papel esencial en el mantenimiento de la integridad esquelética mediante la regulación positiva o negativa de las células óseas. Las semaforinas son una familia de proteínas unidas a la superficie celular o secretadas que son capaces de regular la interacción, morfología y función de diferentes tipos de células. La Semaforina 3a (Sem3a) ha estado involucrada en actividades de remodelado óseo, y también se encuentran informes sobre la actividad de la Semaforina 4d (Sem4d) durante la resorción ósea realizada por los osteoclastos. El objetivo del presente estudio fue evaluar el nivel de expresión de las Semaforinas 3a y 4d en el tejido óseo alveolar recién formado de ratas normales e hiperglicémicas. Los animales se dividieron en los siguientes grupos: no hiperglicémicos (NH, n = 10) e Hiperglicémicos (H, n = 10). se indujo hiperglucemia en animales mediante la administración de agua con fructosa al 10% y estreptozotocina el día 14 después. En el día 76 después de la inducción de la hiperglucemia, todos los animales fueron anestesiados y sometidos a extracción para extraer los molares inferiores. el día 84 se llevó a cabo la eutanasia, seguida de un legrado del tejido óseo recién formado que se almacenó en RNA later® para extracción de RNA total, tratamiento con DNAsa y preparación del cDNAy análisis de la expresión génica de Sem3A y Sem4D. los resultados se sometieron a una prueba de normalidad y se seleccionó una prueba no paramétrica con un nivel de significancia establecido en 5% ($p < 0.05$). Los resultados del presente estudio sugieren que, en el modelo experimental utilizado, los niveles de expresión génica de Sem 3A y 4D no están asociados con el impacto negativo de la hiperglucemia en la reparación ósea.

PALABRAS- CLAVE: hiperglucemia; semaforinas; expresion genica; ratas.

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é uma desordem metabólica de múltipla etiologia caracterizada pela hiperglicemia crônica com distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, ocasionados por defeitos na secreção e/ou na ação da insulina (Organização Mundial de Saúde, 1999).

O diabetes tipo 2, o tipo mais comum de diabetes acometendo cerca de 90%, é caracterizada pela progressiva diminuição da ação da insulina seguida pela disfunção das células β do pâncreas devido ao uso ineficiente da insulina pelo organismo. Pode ser observada o desenvolvimento da resistência à insulina que promove a diminuição da capacidade de músculos, tecido adiposo e fígado responderem à insulina (Tartaranni e Bogardus, 2001, American Association of Diabetes, 2012). A hiperglicemia característica da diabetes promove diversos efeitos celulares e moleculares que resultam em stress oxidativo, exacerbação da resposta infamatória e alterações vasculares. A geração dos produtos finais avançados de glicosilação (AGEs) e a consequente interação destes com seus receptores (RAGEs) promovem a produção das espécies reativas do oxigênio e de mediadores pró-inflamatórios como Interleucina (IL)-1 β , Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), IL-6 e metaloproteinases de matriz (MMPs) (Yan et al., 2008, 2009)(Engin et al., 2008; Irie et al., 2009; Leah, 2011; Claudino et al, 2012).

O paciente com diabetes apresenta uma deficiência na atividade imunológica e inflamatória aumentando as chances de desenvolver infecções, isso afeta de um modo negativo a cicatrização e a formação de um tecido novo que substituiria ou repararia um lesionado (Padula et al., 2003). A insulina tem um papel importante na formação e reparo do osso, estimulando a síntese da matriz osteoblástica e aumentando o número de osteoclastos regulando assim sua função, porém, a alta concentração de insulina no sangue age de forma negativa na diferenciação dos osteoblastos e altera o funcionamento dos hormônios da paratireoides produzindo um efeito prejudicial à matriz óssea (Costa et al., 2015).

Diversas vias de sinalização desempenham um papel essencial na

manutenção da integridade do esqueleto pela regulação positiva ou negativa das células ósseas. Durante os últimos anos, avanços significativos foram obtidos no sentido de um melhor entendimento das vias de sinalização, que regulam processo de diferenciação e sobrevivência das células ósseas. Dentre elas, podem ser citados o sistema OPG/RANK e RANKL e a via Wnt (Goëb & Trouvin Anne-Priscille, 2010; Keller & Kneissel, 2005; Marie, 2012; Boyle et al., 2003; Bellido et al., 2003; Keller; Kneissel, 2005) Mais recentemente, alguns estudos têm demonstrado que as semaforinas são novas moléculas-alvo envolvidas na comunicação celular entre osteoblastos e osteoclastos (Engin et al., 2008; Erlandsson et al., 2013; Fukuda et al., 2013; Hayashi et al., 2012; Leah, 2011; Zhao et al., 2006; Irie et al., 2009; Negishi-Koga et al., 2011).

As semaforinas constituem uma família de proteínas ligadas a superfície celular ou secretadas que são capazes de regular a interação, morfologia e função de diferentes tipos de células (Kruger et al., 2005). A Sem3A (semaforina 3A) foi a primeira semaforina a ser descrita, e sua atividade característica está relacionada à inibição na formação de axônios e na migração celular (Tran et al., 2007). Este processo é fundamental para a formação correta do córtex cerebral, sistema olfatório e axônios de neurônios do gânglio dorsal (Taniguchi et al., 1997). Porém, mais recentemente, a Sem3A tem sido envolvida em outras atividades como imunorregulação, angiogênese, carcinogênese e remodelamento ósseo (Gjerdrum et al., 2010; Roth et al., 2009; Goltzman, 2008; Chabbi-Achengli et al., 2012).

Dentre as semaforinas envolvidas com tecido ósseo também são encontrados relatos sobre a atividade da Semaforina 4D (Sem4D), também denominada CD100. É expressa em diferentes tecidos humanos, sejam eles embrionários ou adultos como cérebro, rins e coração (Delaire et al., 1998; Hall et al., 1996). Embora, os estudos iniciais tenham associado esta molécula a atividade do sistema imune (Delaire et al., 1998; Hall et al., 1996; Kumanogoh et al., 2002; Bougeret et al., 1992), durante a reabsorção óssea realizada pelos osteoclastos, a diferenciação dos osteoblastos fica suprimida. Estudos utilizando animais *knockout* têm demonstrado o envolvimento da Sem4D produzida por osteoclastos como um regulador específico da formação óssea via atuação no receptor Plexina-B1 expressa em osteoblastos (Negishi-Koga et al., 2011). Os mesmos autores demonstraram que animais que

apresentavam baixa expressão de Sem4D não exibiam alteração na atividade de osteoclastos, porém o número de osteoblastos e a capacidade de mineralização destes apresentavam-se aumentada (Negishi- Koga et al., 2011).

Embora os estudos clínicos sejam capazes de apontar os efeitos da hiperglicemia sobre o tecido ósseo, existem muitos fatores de confundimento que dificultam determinar os reais mecanismos imuno-inflamatórios associados. Desta forma, o desenvolvimento de modelos animais se torna essencial para um melhor entendimento da relação tecido ósseo e hiperglicemia. Diferentes modelos experimentais têm sido desenvolvidos para uma melhor compreensão da patogênese do diabetes tipo 2, incluindo primatas não humanos, grandes mamíferos (porcos, cachorros, gatos) e pequenos animais (coelhos, ratos e camundongos). Os roedores têm sido a primeira escolha entre os animais de pequeno porte devido a facilidade na manipulação e custos reduzidos para acondicionamento e dieta. Os modelos que utilizam roedores são divididos em duas principais categorias:

modelos genéticos ou os experimentalmente induzidos. Em diabetes tipo 2, os modelos genéticos mimetizam a patogênese da doença e são utilizados para estudos em diversas áreas como: nefropatia, retinopatia, cardiomiopatia, entre outros. Porém, estes animais apresentam custo elevado, são difíceis de manter no ambiente de biotério e normalmente difíceis de serem encontrados (Islam e Loots, 2009). Modelos experimentais não genéticos são mais baratos e fáceis de serem desenvolvidos (Muruganandan et al., 2005; Reuter et al., 2013). Os modelos utilizando nicotinamida em associação com estreptozotocina e animais inoculados com estreptozotocina e dieta rica em gordura têm sido considerados os melhores modelos para diabetes tipo 2 (Masiello et al., 1998; Muruganandan et al., 2005; Reuter et al., 2013; Islam e Wilson, 2012). Recentemente Wilson e Islam (2012) sugeriram um novo modelo experimental de diabetes tipo 2 induzida por frutose, no qual ratos com 45 dias de idade recebiam água acrescida de 10% de frutose durante as duas primeiras semanas do período experimental e em seguida foram inoculados com estreptozotocina (40 mg/kg de peso corpóreo) via intraperitoneal. Os autores demonstraram que o modelo experimental proposto apresentou uma condição diabética estável durante as 11 semanas do período experimental e que pode ser utilizado como um novo e alternativo método para o estudo do

diabetes tipo 2 e para screening de novas drogas antidiabéticas. O presente estudo teve como objetivo avaliar o nível de expressão do mRNA codificante para as semaforinas 3A (Sem3A) e 4D (Sem4D) por PCR em Tempo Real, em modelo experimental de ratos com hiperglicemia induzida por frutose e estreptozocina.

2. MÉTODO

2.1. Animais

Foram utilizados 20 ratos machos da linhagem Wistar, com idade de 45 dias e pesando aproximadamente 200g. Esses animais foram adquiridos junto ao Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP). No período de 5 dias foram colocados no biotério da Universidade de Guarulhos (UNG) para passar por um processo de aclimatização e adaptação ao novo ambiente. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em gaiolas individuais para melhora controle da ingestão de frutose, sob as mesmas condições ambientais e receberam água e ração *ad libitum*. Todos os grupos que permaneceram em período alternado de luz e escuridão (12/12 horas). O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais de Experimentação da Universidade Guarulhos (CEUA-UNG) e foi realizado na Universidade de Guarulhos (UNG).

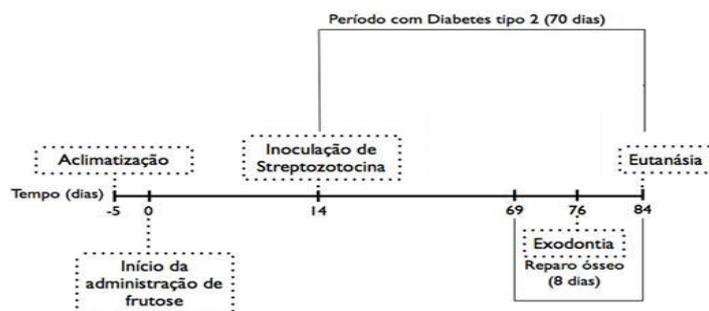
2.2. Grupos experimentais e delineamento do estudo

No início do estudo, os animais foram divididos em um dos seguintes grupos experimentais:

- Não hiperglicêmicos (NH, n=10): ratos que receberam água sem frutose e foram inoculados com o tampão citrato.
- Hiperglicêmico (H, n=10): ratos que receberam água com frutose e durante as duas primeiras semanas do período experimental, inoculados com estreptozotocina. O período experimental foi de 84 dias, nos quais os animais receberam somente água (NH) ou água com adição de frutose (H) a partir do dia zero. Os animais pertencentes ao grupo H foram inoculados com estreptozotocina no 14º dia do período experimental, enquanto os animais pertencentes ao grupo NH foram inoculados com tampão citrato (veículo) no mesmo

dia. Semanalmente, os grupos foram acompanhados para análise dos níveis sanguíneos de glicose por meio de coleta de veia caudal. No 76º dia todos os animais foram submetidos a uma exodontia que ocorreu oito dias antes do final do período experimental, que se sucedeu no 84º dia, conforme ilustrado na figura 1.

Figura 1: Delineamento do estudo.



2.3. Indução de Hiperglicemia

Para induzir a hiperglicemia, os animais receberam água suplementada com 10% de frutose *ad libitum* durante as duas primeiras semanas do período experimental, que corresponderá a um total de 14 dias. Em seguida, todos os animais que consumiram a água suplementada com 10% de frutose (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo) foram inoculados por via intraperitoneal com estreptozotocina (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo) (STZ, 40 mg/ Kg de peso corpóreo) em Tampão Citrato (Sigma-Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, pH 4,4) (Masiello et al., 1998; Muruganandan et al., 2005; Reuter et al., 2013). Os animais pertencentes ao grupo não hiperglicêmicos foram inoculados somente com o veículo (Tampão Citrato).

Uma semana após a inoculação de STZ os níveis de glicose sanguínea foram mensurados com auxílio de um medidor de glicose sanguínea portátil (OneTouch®, Johnson & Johnson, Brasil Indústria e Comércio de Produtos para Saúde Ltda, São Paulo) por meio de coletas semanais, via veia caudal. Os animais pertencentes ao grupo H em situação de não jejum que apresentaram

níveis > 300mg/ dL foram considerados hiperglicêmicos e permaneceram no estudo, enquanto aqueles que apresentaram níveis inferiores ao estabelecido foram retirados do estudo e aproveitados em outros estudos na Instituição (Muruganandan et al., 2005).

2.4. Exodontia

Oito dias antes da morte dos animais (76° dias do período experimental, figura 1), todos os animais foram pesados e anestesiados por via intraperitoneal com uma solução de 10mg/Kg de cloridrato de quetamina (Francotar®; Virbac do Brasil Indústria e Comércio LTDA, Roseira, SP, Brasil) e 0,1mL de cloridrato de xilazina (Virbaxil®; Virbac do Brasil Indústria e Comércio LTDA, Roseira SP, Brasil). Com auxílio de um micro-cinzel, os primeiros molares maxilares foram extraídos. Os alvéolos recém extraídos serão utilizados para análises de expressão gênica das semaforinas 3A e 4D. Durante o período pós-operatório, os animais receberam antibiótico (Pentabiótico, Wyeth-Whitehall Ltda) dose-única via intramuscular (1ml/kg) e analgésico cloridrato de Tramadol na concentração de 10 mg/kg, de 12 em 12 horas por um período de 48 horas (Sousa et al., 2008; W. N. Wu et al., 2006).

2.5. Análise da expressão gênica

2.5.1. Extração do RNA

Oito dias após a exodontias todos os animais foram sacrificados, o alvéolo foi curetado, e o tecido de granulação removido e acondicionado em solução de RNAlater® (Ambion Inc.), para evitar a degradação do RNA. As amostras permaneceram incubadas a 4°C durante por 24 horas e em seguida foram armazenadas a -80°C até o momento da extração. A extração foi realizada utilizando reagente TRIZOL (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA foram subsequentemente resuspensas em aproximadamente 30 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e armazenadas a -70°C. A qualidade do RNA total foi avaliada por meio de eletroforese em gel

de agarose 1%.

2.5.2. *Tratamento com DNase e Transcrição reversa*

As amostras de RNA total foram tratadas para a eliminação de qualquer resíduo de DNA com DNase (DNA-free™, Ambion Inc.), conforme recomendação do fabricante. O RNA total foi quantificado por meio de um espectrofotômetro e cerca de 2 µg da amostra de RNA total livre de DNA foi utilizado para a síntese do cDNA. Para isto foi utilizado o kit *First-strand cDNA synthesis* (Roche DiagnosticCo.), seguindo as recomendações do fabricante. Inicialmente, as amostras foram incubadas por 10 minutos a 25°C e, em seguida, por 60 minutos a 42°C. Concluída a segunda etapa de incubação, as amostras foram incubadas por 5 minutos a 95°C e então por 5 minutos a 4°C para resfriamento. Os reagentes utilizados e suas respectivas concentrações foram: solução tampão (1x), MgCl₂ (5mM), desoxirribonucleotídeos (1mM), *primers* randomizados (3,2µg), inibidor de RNase (50U), e transcriptase reversa AMV (20U).

2.5.3. *Análise da expressão gênica por Real-time PCR (RT-PCR)*

2.5.4. *Desenho dos Primers*

Os *primers* para GAPDH (gene de referência), Sem3A e Sem4D foram desenhados com o auxílio de um programa desenvolvido especificamente para elaboração de *primers* para o *LightCycler* (Roche DiagnosticsGmbH.). Todos os *primers* foram verificados quanto a sua especificidade por meio da verificação da curva de *Melting* utilizando-se controles positivos e negativos.

Quadro 1: Sequência dos *primers*, perfil de amplificação e tamanho dos produtos das reações de PCR em Tempo Real.

Gene	Sequência (5' to 3')	Perfil de Amplificação [Temperatura [°C/segundos(s)]	Amplicon (pb)
SEM3A-F	CAGTGCCCATCTCATCC	95/10; 56/10; 72/05	160
SEM3A-R	CACAGAGCAAATCAGGCG		
SEM4D-F	CACCTGAGCCCTTTGTGTC	95/10; 56/10; 72/05	175
SEM4D-R	CATCAACACAGTAGGAGCGC		

2.5.3.2. Reações de RT-PCR

As reações de RT-PCR foram realizadas com o sistema *LightCycler* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), utilizando o kit *FastStart DNA Master SYBR Green I* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). O perfil das reações foi determinado seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante do equipamento. Para cada uma das análises, água foi utilizada como controle negativo, e o produto das reações foi quantificado utilizando-se o programa do próprio fabricante (*LightCycler Relative Quantification Software - Roche Diagnostics, GmbH*). Os níveis de expressão do gene GAPDH foram utilizados como referência para a normalização dos valores.

2.6. Análise Estatística

Os valores obtidos para cada animal oriundo das análises moleculares foram utilizados para cálculo das médias, obtendo-se um resultado final para cada grupo independente. As análises foram realizadas pelo software *GraphPad Prism®* versão 6.0 (San Diego, CA, EUA). Todos os resultados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro Wilk e consequentemente foi escolhido o teste não-paramétrico de Mann-Whitney para análise da hipótese de que a hiperglicemia afeta a expressão gênica de Sem3A e Sem4D com nível de significância estabelecido em 5%.

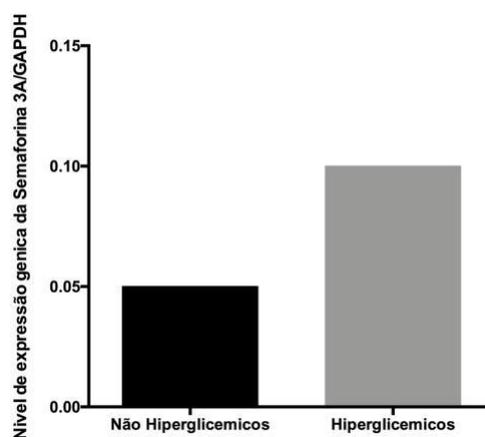
3. RESULTADOS

Foi possível observar que todos os animais ganharam peso durante o estudo ($p < 0,05$) e não foi observada diferença significativa para o peso inicial dos animais pertencentes ao grupo Não Hiperglicêmico (NH) e ao grupo Hiperglicêmico (H). Porém ao final do período experimental e consequentemente após indução do diabetes, foi possível observar que os animais do grupo NH apresentavam peso significativamente maior que os animais do grupo H.

Os níveis glicêmicos em situação de não jejum dos animais pertencentes ao grupo NH e H foram monitorados semanalmente e não foi observada

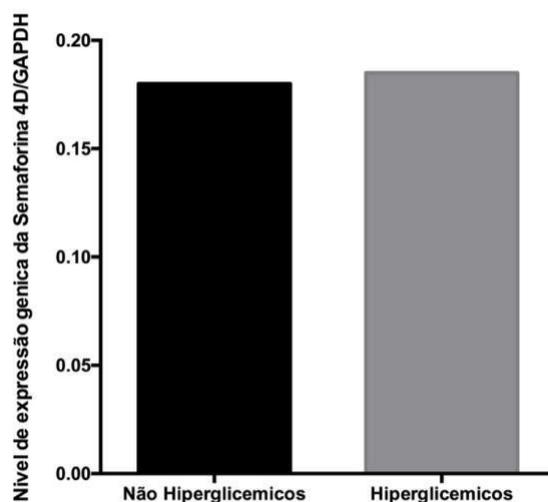
diferença significativa para este parâmetro entre os animais do grupo Não Hiperglicêmico e Hiperglicêmico no início do período experimental ($p > 0,05$). A média e desvio padrão para o grupo NH foi de 102 ± 12 mg/dL e para o grupo H foi de 98 ± 11 mg/dL. Após 14 dias de ingestão de frutose, os animais do grupo H receberam STZ por via intraperitoneal enquanto os animais do grupo NH receberam apenas o tempão citrato (veículo) pela mesma via. Os níveis glicêmicos foram novamente mensurados 72 horas após esta etapa do experimento e foi observado um aumento significativo da glicemia para os animais do grupo H em comparação ao grupo NH ($p < 0,05$). A média e desvio padrão dos níveis glicêmicos para o grupo NH foi de 100 ± 12 mg/dL e para o grupo H foi de 350 ± 29 mg/dL. Em relação a Semaforina 3A, não foram detectadas diferenças nos níveis de expressão genica entre animais dos grupos NH e H, conforme ilustrado na figura 2.

Figura 2: Níveis de expressão gênica da Semaforina 3A/GAPDH, para ratos Normoglicêmicos e Hiperglicêmicos. Dados avaliados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney ($p \geq 0,05$).



Resultados similares foram detectados em relação a Semaforina 4D, ou seja, os níveis de expressão gênica entre os grupos não apresentaram diferença significativa, e assim a hiperglicemia não afetou a expressão para Sema4D (Figura 3).

Figura 3: Níveis de expressão gênica da Semaforina 4D/GAPDH, para ratos Normoglicêmicos e Hiperglicêmicos. Dados avaliados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney ($p \geq 0,05$).



4. DISCUSSÃO

O diabetes de mellitus faz parte de um grupo de doenças metabólicas e é caracterizada pela hiperglicemia, que resulta em falha na secreção ou da ação da insulina. A hiperglicemia crônica do diabetes tem sido associada a danos em longo prazo, como a falha de diferentes órgãos e alteração no mecanismo de formação de novos ossos, que pode causar principalmente atraso no reparo ósseo e redução do osso alveolar (Padula et al., 2003). A insulina tem um papel importante na formação e reparo do osso, estimulando a síntese da matriz osteoblástica e aumentando o número de osteoclastos regulando assim sua função, porém, a alta concentração de insulina no sangue age de forma negativa na diferenciação dos osteoblastos e altera o funcionamento dos hormônios da paratireóide produzindo um efeito prejudicial à matriz óssea (Costa et al., 2015). O presente estudo teve como objetivo avaliar o nível de expressão do mRNA codificante para as Sema 3^a e 4D (Sema 4D), em ratos normo e hiperglicêmicos, obtendo como resultado que as taxas de açúcar na circulação sanguínea não causam alterações significativas nos níveis de expressão gênica tanto em Sema 3A, quanto em Sema 4D.

Os pacientes com diabetes de mellitus apresentam uma deficiência na atividade imunológica e inflamatória, aumentando as chances de desenvolver infecções, isso afeta de um modo negativo a cicatrização e a formação de um tecido novo que substituiria ou repararia um lesionado (Meier et al., 2016; Padula et al., 2003). A hiperglicemia pode afetar o metabolismo de cálcio e

vitamina D, resultando na metabolização mineral óssea, também, pode resultar na deposição de produtos finais de glicação avançada no colágeno ósseo e contribuindo para um comprometimento na qualidade óssea (Meier et al., 2016).

De acordo com Magri et al., (2015), o diabetes de mellitus leva a uma diminuição da atividade proliferativa dos osteoblastos e um aumento na proliferação de osteoclastos, o que resulta em uma menor densidade mineral óssea e aumenta o risco de fraturas, além disso, todo o processo de cicatrização óssea é prejudicado e atrasado, o que resulta em fraturas não consolidadas, o osso não retorna ao local correto sozinho. A cicatrização óssea alveolar em pacientes com diabetes continua sendo um grande problema e pode até mesmo impedir a implantação de tratamentos de doenças bucais, como a extração dentária ou cirurgias de implantes dentários (Li et al., 2019). A Sema 3A possui efeito na remodelação óssea direta e indireta, exerce um efeito osteoprotetor através da diminuição da reabsorção óssea de osteoclastos e aumenta a formação óssea de osteoblastos, ou seja, quando ligada ao receptor de membrana Nrp1 induz a diferenciação dos osteoclastos, a ligação com Nrp1 também estimula osteoblastos. O efeito osteoestimulativo da Sema 3A, podem ser utilizados para promover a reparação de defeitos ósseos e melhorar a regeneração óssea em cirurgias (Kenan et al., 2019). A regeneração óssea é prejudicada em pacientes diabéticos, a Sema 3A mostra um grande potencial para promover essa regeneração, entretanto a estimulação dessa, molécula aumenta a expressão de genes osteogênicos, podendo assim, reparar a capacidade osteogênica em indivíduos diabéticos.

De acordo com Wu et al. (2018), a Sema 3A associada com a mTOR tem um efeito quimio- repulsivo nas fibras nervosas, que podem ter um efeito negativo na progressão de diabetes. A sinalização de mTOR regula a expressão de mRNA codificante para Sem3A em células semelhantes a osteoblastos, porém, novos estudos são necessários para criar um relato mais plausível sobre a influência da hiperglicemia em expressão gênica de Sema 3A.

Outro grupo importante de semaforinas envolvidos com tecidos ósseo é a Sema 4D, quando expressa pelos osteoclastos, atua como um mediador da interação osteoclastos-osteoblastos, que inibe a formação óssea osteoblástica (Terpos et al., 2018). Também, possui a capacidade de regular a formação

óssea mediada por osteoblastos, ou reduzir o espaçamento entre osteoblastos, propondo que os osteoclastos também repelem os osteoblastos. A Sema 4D, inibe a formação óssea através de seu receptor plexin-B1, altamente expresso durante a diferenciação dos osteoblastos, e essa semaforina tem elevados níveis de expressão por osteoclastos (Deb Roy et al., 2017).

Um estudo realizado por Chen et al., (2018), mostrou que a adição de Sema 4D inibe a formação de nódulos ósseos e a expressão de genes osteoblásticos, contudo a adição dessa molécula ainda suprime ligeiramente o osso. Não foram encontrados estudos na literatura que tenham avaliado a expressão gênica de Sema 4D em animais hiperglicêmicos, ou que estabeleça uma relação entre essa molécula, nível de açúcar no sangue e o reparo ósseo alveolar. Porém, Willner et al., (2018) realizou um estudo que mostrou o nível da expressão de Sema 4D em pacientes diabéticos e com insuficiência cardíaca, e observou que o diabetes de mellitus, não influenciou os níveis de expressão de Sema 4D, corroborando com os resultados do presente estudo

Os resultados do presente estudo sugerem que no modelo experimental utilizado, os níveis de expressão gênica de Sema 3A e 4D não estão associados ao impacto negativo da hiperglicemia sobre o reparo ósseo. Novos estudos são necessários para avaliar os mecanismos envolvidos na diminuição do reparo ósseo causado pela hiperglicemia.

REFERÊNCIAS

American Psychiatric Association. (1988). DSM-III-R, Diagnostic and statistical manual of mental disorder (3rd ed. rev.). Washington, DC: Author.

Bellido, T., Ali, A. A., Plotkin, L. I., Fu, Q., Gubrij, I., Roberson, P. K., ... & Jilka, R. L. (2003). Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced anti-apoptotic signaling in osteoblasts A putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 50259-50272.

Bougeret, C., Mansur, I. G., Dastot, H., Schmid, M., Mahouy, G., Bensussan, A., & Boumsell, L. (1992). Increased surface expression of a newly identified 150-kDa dimer early after human T lymphocyte activation. *The Journal of Immunology*, 148(2), 318-323.

Boyle, W. J., Simonet, W. S., & Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), 337-342.

Chabbi-Achengli, Y., Coudert, A. E., Callebert, J., Geoffroy, V., Côté, F., Collet, C., & de Vernejoul, M. C. (2012). Decreased osteoclastogenesis in serotonin-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(7), 2567-2572.

Chen, X., Wang, Z., Duan, N., Zhu, G., Schwarz, E. M., & Xie, C. (2018). Osteoblast–osteoclast interactions. *Connective Tissue Research*, 59(2), 99–107. <https://doi.org/10.1080/03008207.2017.1290085>

Claudino, M., Gennaro, G., Cestari, T. M., Spadella, C. T., Garlet, G. P., & Assis, G. F. (2012). Spontaneous periodontitis development in diabetic rats involves an unrestricted expression of inflammatory cytokines and tissue destructive factors in the absence of major changes in commensal oral microbiota. *Experimental diabetes research*, 2012.

Costa, I. S., de Lima Rodrigues, I., da Silva, K. G., de Oliveira, T. S., Ribeiro, R. A., Rodrigues, R. A., ... & de Souza, J. N. L. (2015). A INFLUÊNCIA DA DIABETES MELLITUS NA IMPLANTODONTIA: UMA REVISÃO DE LITERATURA. *Revista Saúde & Ciência Online*, 4(3), 84-97.

Deb Roy, A., Yin, T., Choudhary, S., Rodionov, V., Pilbeam, C. C., & Wu, Y. I. (2017). Optogenetic activation of Plexin-B1 reveals contact repulsion between osteoclasts and osteoblasts. *Nature Communications*, 8(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms15831>

Delaire, S., Elhabazi, A., Bensussan, A., & Boumsell, L. (1998). CD100 is a leukocyte semaphorin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54(11), 1265–1276. <https://doi.org/10.1007/s000180050252>

Engin, F., Yao, Z., Yang, T., Zhou, G., Bertin, T., Jiang, M. M., Chen, Y., Wang, L., Zheng, H., Sutton, R. E., Boyce, B. F., & Lee, B. (2008). Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis. *Nature Medicine*, 14(3), 299–305. <https://doi.org/10.1038/nm1712>

Erlandsson, M. C., Svensson, M. D., Jonsson, I. M., Bian, L., Ambartsumian, N., Andersson, S., Peng, Z. Q., Vääräniemi, J., Ohlsson, C., Andersson, K. M. E., & Bokarewa, M. I. (2013). Expression of metastasin S100A4 is essential for bone resorption and regulates osteoclast function. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1833(12), 2653–2663. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.020>

Fukuda, T., Takeda, S., Xu, R., Ochi, H., Sunamura, S., Sato, T., Shibata, S., Yoshida, Y., Gu, Z., Kimura, A., Ma, C., Xu, C., Bando, W., Fujita, K., Shinomiya, K., Hirai, T., Asou, Y., Enomoto, M., Okano, H., ... Itoh, H. (2013). Sema3A regulates bone-mass accrual through sensory innervations. *Nature*, 497(7450), 490–493. <https://doi.org/10.1038/nature12115>

Gjerdrum, C., Tiron, C., Høiby, T., Stefansson, I., Haugen, H., Sandal, T., Collett, K., Li, S., McCormack, E., Gjertsen, B. T., Micklem, D. R., Akslen, L. A., Glackin, C., & Lorens, J. B. (2010). Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(3), 1124–1129. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909333107>

- Goëb, V., & Trouvin Anne-Priscille. (2010). Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clinical Interventions in Aging*, 345. <https://doi.org/10.2147/cia.s10153>
- Hall, K. T., Boumsell, L., Schultze, J. L., Boussiotis, V. A., Dorfman, D. M., Cardoso, A. A., Bensussan, A., Nadler, L. M., & Freeman, G. J. (1996). Human CD100, a novel leukocyte semaphorin that promotes B-cell aggregation and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(21), 11780–11785. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11780>
- Hayashi, M., Nakashima, T., Taniguchi, M., Kodama, T., Kumanogoh, A., & Takayanagi, H. (2012). Osteoprotection by semaphorin 3A. *Nature*, 485(7396), 69–74. <https://doi.org/10.1038/nature11000>
- Irie, K., Ekuni, D., Yamamoto, T., Morita, M., Yaegaki, K., Ii, H., & Imai, T. (2009). A single application of hydrogen sulphide induces a transient osteoclast differentiation with RANKL expression in the rat model. *Archives of Oral Biology*, 54(8), 723–729. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.05.006>
- Islam, M. S., & Loots, D. T. (2009). Experimental rodent models of type 2 diabetes: a review. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, 31(4), 249.
- Islam, M. S., & Wilson, R. D. (2012). Experimentally induced rodent models of type 2 diabetes. In *Animal models in diabetes research* (pp. 161-174). Humana Press, Totowa, NJ.
- Keller, H., & Kneissel, M. (2005). SOST is a target gene for PTH in bone. *Bone*, 37(2), 148–158. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.03.018>
- Kenan, S., Onur, Ö. D., Solakoğlu, S., Kotil, T., Ramazanoğlu, M., Çelik, H. H., Ocak, M., Uzuner, B., & Fıratlı, E. (2019). Investigation of the effects of semaphorin 3A on new bone formation in a rat calvarial defect model. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 47(3), 473–483. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2018.12.010>
- Kruger, R. P., Aurandt, J., & Guan, K. L. (2005). Semaphorins command cells to move. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(10), 789–800. <https://doi.org/10.1038/nrm1740>
- Kumanogoh, A., Marukawa, S., Suzuki, K., Takegahara, N., Watanabe, C., Ch'ng, E. S., Ishida, I., Fujimura, H., Sakoda, S., Yoshida, K., & Kikutani, H. (2002). Class iv semaphorin sema4a enhances t-cell activation and interacts with tim-2. *Nature*, 419(6907), 629–633. <https://doi.org/10.1038/nature01037>
- Leah, E. (2011). Bone: Finding that osteoclasts repel osteoblast activity through Sema4D reveals novel target for bone-boosting therapies. *Nature Reviews Rheumatology*, 7(12), 681. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.175>
- Liu, L., Zhang, C., Hu, Y., & Peng, B. (2012). Protective effect of metformin on periapical lesions in rats by decreasing the ratio of receptor activator of nuclear factor

kappa B ligand/osteoprotegerin. *Journal of endodontics*, 38(7), 943-947.

Magri, A. M. P., Fernandes, K. R., Assis, L., Mendes, N. A., da Silva Santos, A. L. Y., de Oliveira Dantas, E., & Rennó, A. C. (2015). Photobiomodulation and bone healing in diabetic rats: evaluation of bone response using a tibial defect experimental model. *Lasers in Medical Science*, 30(7), 1949–1957. <https://doi.org/10.1007/s10103-015-1789-3>

Marie, P. J. (2012). Signaling pathways affecting skeletal health. *Current Osteoporosis Reports*, 10(3), 190–198. <https://doi.org/10.1007/s11914-012-0109-0>

Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-Buys, D., Novelli, M., & Ribes, G. (1998). Experimental NIDDM Development of a New Model in Adult Rats Administered Streptozotocin and Nicotinamide From the Istituto di Patologia Generate (P. Diabetes, 47(February), 224–229.

Meier, C., Schwartz, A. V., Egger, A., & Lecka-Czernik, B. (2016). Effects of diabetes drugs on the skeleton. *Bone*, 82, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.04.026>

Muruganandan, S., Srinivasan, K., Gupta, S., Gupta, P. K., & Lal, J. (2005). Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(3), 497–501. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.12.010>

Negishi-Koga, T., Shinohara, M., Komatsu, N., Bito, H., Kodama, T., Friedel, R. H., & Takayanagi, H. (2011). Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nature medicine*, 17(11), 1473-1480.

Padula, E. de O., Andrade, M. L., Giordano, V., & Ramalho, M. V. (2003). Aspectos morfológicos do processo de consolidação de fratura em ratos diabéticos. *Rev. Bras. Ortop*, 38(3), 127–136.

Reuter, C. P., Burgos, L. T., Camargo, M. D., Possuelo, L. G., Reckziege, M. B., Reuter, É. M., Meinhardt, F. P., & Burgos, M. S. (2013). Prevalência de obesidade e risco cardiovascular em crianças e adolescentes do município de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul. *Sao Paulo Medical Journal*, 131(5), 323–330. <https://doi.org/10.1590/1516-3180.2013.1315518>

Roth, L., Koncina, E., Satkauskas, S., Crémel, G., Aunis, D., & Bagnard, D. (2009). The many faces of semaphorins: From development to pathology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(4), 649–666. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8518-z>

Sousa, A. M., Franco, P. A. B., Ashmawi, H. A., & Posso, I. de P. (2008). Efeito analgésico local do tramadol em modelo de dor provocada por formalina em ratos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 58(4), 371–379. <https://doi.org/10.1590/s0034-70942008000400006>

Taniguchi, M., Yuasa, S., Fujisawa, H., Naruse, I., Saga, S., Mishina, M., & Yagi, T. (1997). Disruption of semaphorin III/D gene causes severe abnormality in peripheral nerve projection. *Neuron*, 19(3), 519–530. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80368-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80368-2)

Tashjian Jr, A. H., & Goltzman, D. (2008). On the interpretation of rat carcinogenicity studies for human PTH (1-34) and human PTH (1-84). *Journal of Bone and Mineral Research*, 23(6), 803-811.

Terpos, E., Ntanasis-Stathopoulos, I., Christoulas, D., Bagratuni, T., Bakogeorgos, M., Gavriatopoulou, M., Eleutherakis-Papaiakovou, E., Kanellias, N., Kastritis, E., & Dimopoulos, M. A. (2018). Semaphorin 4D correlates with increased bone resorption, hypercalcemia, and disease stage in newly diagnosed patients with multiple myeloma. *Blood Cancer Journal*, 8(5). <https://doi.org/10.1038/s41408-018-0075-6>

Tran, T. S., Kolodkin, A. L., & Bharadwaj, R. (2007). Semaphorin regulation of cellular morphology. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23, 263–292. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010605.093554>

Weyer, C., Tataranni, P. A., Bogardus, C., & Pratley, R. E. (2001). Insulin resistance and insulin secretory dysfunction are independent predictors of worsening of glucose tolerance during each stage of type 2 diabetes development. *Diabetes care*, 24(1), 89-94.

Willner, N., Goldberg, Y., Schiff, E., & Vadasz, Z. (2018). Semaphorin 4D levels in heart failure patients: A potential novel biomarker of acute heart failure? *ESC Heart Failure*, 5(4), 603–609. <https://doi.org/10.1002/ehf2.12275>

World Health Organization. (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Part 1, Diagnosis and classification of diabetes mellitus (No. WHO/NCD/NCS/99.2). World Health Organization.

Wu, L. yan, Li, M., Qu, M. L., Li, X., Pi, L. H., Chen, Z., Zhou, S. L., Yi, X. Q., Shi, X. J., Wu, J., & Wang, S. (2018). High glucose up-regulates Semaphorin 3A expression via the mTOR signaling pathway in keratinocytes: A potential mechanism and therapeutic target for diabetic small fiber neuropathy. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 472(2018), 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.11.025>

Wu, W. N., Mckown, L. A., Codd, E. E., & Raffa, R. B. (2006). Metabolism of two analgesic agents, tramadol-n-oxide and tramadol, in specific pathogen-free and axenic mice. *Xenobiotica*, 36(6), 551–565. <https://doi.org/10.1080/00498250600653372>

Yan, S. F., Ramasamy, R., & Schmidt, A. M. (2008). Mechanisms of Disease: Advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism*, 4(5), 285–293. <https://doi.org/10.1038/ncpendmet0786>

Yan, S. F., Ramasamy, R., & Schmidt, A. M. (2009). Receptor for AGE (RAGE) and its ligands-cast into leading roles in diabetes and the inflammatory response. *Journal of Molecular Medicine*, 87(3), 235–247. <https://doi.org/10.1007/s00109-009-0439-2>

Zhao, C., Irie, N., Takada, Y., Shimoda, K., Miyamoto, T., Nishiwaki, T., Suda, T., & Matsuo, K. (2006). Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis. *Cell Metabolism*, 4(2), 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.012>