

## **Análise *in silico* do polimorfismo *rs1803909* do gene *ANXA2* expresso em monócitos de sangue periférico e a sua relação com a osteoporose humana**

*In silico* analysis of the *rs1803909* polymorphism of the *ANXA2* gene expressed in peripheral blood monocytes and its association with human osteoporosis

Rezende R.B.<sup>1</sup>

### ARTIGO ORIGINAL | ORIGINAL ARTICLE

#### RESUMO

A osteoporose é considerada a doença óssea mais comum no mundo e é caracterizada por baixa massa óssea, conseqüente degradação da microestrutura do seu tecido e diminuição de sua resistência. Dessa forma, objetivou-se avaliar as possíveis alterações morfofuncionais e da estabilidade proteica decorrentes das alterações dos aminoácidos Tirosina por uma Histidina na posição 269, bem como, correlacionar com a função fisiológica da proteína e a sua provável ligação com a osteoporose humana. Por meio de uma análise *in silico* com base nas informações disponíveis nos bancos de dados NCBI dbSNP (mudança de aminoácidos e posição) e UNIPROT (sequência na proteína). Os impactos da modificação Y269H foram analisados a partir das ferramentas SIFT, *Align* GVDG, SNAP e PROVEAN (função e estrutura) e PolyPhen-2 (natureza da alteração). Além disso, utilizou-se a ferramenta MuPRO (alteração de estabilidade na proteína). A partir da análise *in silico* do polimorfismo *rs1803909* foi demonstrado alteração funcional (ferramenta SIFT, Score= 0). Bem como, estima-se que as trocas de aminoácidos podem estar relacionadas com as alterações danosas (PolyPhen-2, Score= 0,993) e associadas a modificações na função da proteína (PROVEAN, Score= -4.015). Além disso, foram observados impactos estruturais (*Align* GVDG, Score= 83,33, Classe C65) e funcionais (SNAP, Score= 57). De forma complementar, observou-se diminuição da estabilidade proteica decorrente da alteração Y269H pela ferramenta MuPRO,  $\Delta\Delta G = -1.6731749$ . Contudo, as alterações morfofuncionais podem estar ligadas a processos danosos e a elevação e/ou diminuição de estabilidade da proteína, dificultando assim a sua ação. Além disso, a compreensão das alterações morfofuncionais e de estabilidade do *rs1803909* podem auxiliar na busca por marcadores genéticos e moleculares de diagnóstico precoce para a osteoporose em humanos.

**Palavras-chave:** cálcio, circulação sanguínea, osteoporose, polimorfismo de nucleotídeo único, sangue.

#### ABSTRACT

Osteoporosis is considered the most common bone disease in the world, and is characterized by low bone mass, consequent degradation of the microstructure of its tissue and reduction of its resistance. Thus, this study aimed to evaluate the possible morphofunctional and protein stability changes due to Tyrosine amino acid changes by a Histidine at position 269, as well as to correlate with the physiological function of the protein and its probable link to human osteoporosis. Through an *in silico* analysis based on information available in the NCBI dbSNP (amino acid change and position) and UNIPROT (sequence in the protein) databases. The impacts of the Y269H modification were analyzed from the SIFT, *Align* GVDG, SNAP and PROVEAN tools (function and structure), and PolyPhen-2 (nature of the change). In addition, the MuPRO tool (stability change in the protein) was also used. From the *in silico* analysis of the *rs1803909* polymorphism, functional alteration was demonstrated (SIFT tool, Score= 0). As well as, it was estimated that amino acid exchanges may be related to harmful alterations (PolyPhen-2, Score= 0.993) and associated to modifications in protein function (PROVEAN, Score= -4.015). In addition, structural (*Align* GVDG, Score= 83.33, Class C65) and functional (SNAP, Score= 57) impacts were observed. Complementarily, decreased protein stability resulting from the Y269H alteration was observed by the MuPRO tool,  $\Delta\Delta G = -1.6731749$ . However, morphofunctional alterations may be linked to damaging processes and the elevation and/or decrease of protein stability, thus hindering its action. Furthermore, understanding the morphofunctional and stability changes of *rs1803909* may aid in the search for early diagnostic genetic and molecular markers for osteoporosis in humans.

**Keywords:** blood, blood circulation, calcium, osteoporosis, polymorphism, single nucleotide.

<sup>1</sup> Departamento de Biociências. Universidade Federal de São Paulo. Baixada Santista, São Paulo, Brasil.

**Autor para correspondência:** Rubens Barbosa Rezende; rubensrezende425@gmail.com. R. Silva Jardim, nº 136 - Vila Mathias, 11015-020, Santos, Brasil.

Submetido/Submitted: 11 novembro 2021 | Aceite/Accepted: 10 janeiro 2022

## INTRODUÇÃO

A osteoporose é considerada a doença óssea mais comum no mundo e é caracterizada por baixa massa óssea, consequente degradação da microestrutura do seu tecido e diminuição da sua resistência. A massa óssea adulta é derivada do pico atingido durante a adolescência e mantida até que o ciclo de remodelação óssea - geralmente um processo fortemente acoplado - que ocorre e altere o equilíbrio entre os osteoblastos e os osteoclastos de reabsorção<sup>1,2</sup>. As estimativas indicaram que 50% do sexo feminino e 20% do masculino acima dos 50 anos, sofreram fraturas relacionadas com a osteoporose<sup>3</sup>.

O gene *ANXA2* é constituído por 17 éxons distribuídos ao longo de 40Kb de DNA genómico no cromossomo 15 (15q22.2) que codifica a proteína Anexina A2 (*ANX2*), possui 339 aminoácidos e 38,6 kDa<sup>4</sup>, está localizado numa variedade de tipos de células, incluindo as endoteliais, trofoblásticas, epiteliais e tumorais, bem como células imunes inatas, como macrófagos, monócitos e dendríticas. O gene *ANXA2* é capaz de existir na forma monomérica ou heterotetramérica<sup>5,6</sup>. E o polimorfismo *rs1803909* está localizado na região chr15:60351225 (GRCh38.p13) do gene *ANXA2* e corresponde a uma troca A>G promovendo a alteração de aminoácidos de uma Tirosina por uma Histidina na posição 269.

Este trabalho justifica-se pela importância de se compreender o impacto do polimorfismo *rs1803909* no gene *ANXA2* e a sua relação com a possível gênese da osteoporose humana, uma vez que já se tem listado na literatura a associação de polimorfismos deste gene à osteopo-

rose. Dessa forma, objetivou-se avaliar as possíveis alterações morfofuncionais e de estabilidade proteica decorrentes das alterações dos aminoácidos Tirosina por uma Histidina na posição 269, bem como, correlacionar com a função fisiológica da proteína e a sua provável ligação com a osteoporose humana.

## MÉTODOS

Realizou-se uma análise *in silico* com base nas informações disponíveis nos bancos de dados NCBI dbSNP (mudança de aminoácidos e posição) e UNIPROT (sequência na proteína). Os impactos da modificação Y269H foram analisados a partir das ferramentas SIFT, *Align* GVGD, SNAP e PROVEAN (função e estrutura) e PolyPhen-2 (natureza da alteração). Além disso, utilizou-se a ferramenta MuPRO (alterações de estabilidade na proteína).

Bem como, a correlação entre as alterações de estabilidade e morfofuncionais identificadas na análise *in silico* com o comportamento fisiopatológico da proteína foram executadas a partir da busca de artigos científicos na base de dados Pubmed, através dos descritores: “Osteoporosis”, “Polymorphism, Single Nucleotide” e “Blood Circulation”, cadastrados no DeCS/MeSH e utilizando os operadores booleanos AND e OR. Como também, foi feita uma busca manual, utilizando os descritores: “Peripheral blood monocyte” e “ANXA2 gene”.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise *in silico* do polimorfismo *rs1803909* demonstrou alteração funcional (ferramenta SIFT, Score= 0). Bem

como, estima-se que a troca de amino-ácidos pode estar relacionada com alterações danosas (PolyPhen-2, Score= 0,993) e relacionada com alterações na função da proteína (PROVEAN, Score= -4.015). Além disso, foram observados impactos estruturais (*Align GVGD*, Score= 83,33, Classe C65) e funcionais (SNAP, Score= 57).

O grau de impacto funcional pode variar, portanto, a classificação da classe não indica o tamanho do impacto funcional do polimorfismo, pelo contrário, apenas indica a extensão em que o impacto é investigado. Além disso, a categoria de polimorfismo não significa a sua importância numa determinada população; o polimorfismo pode ter um grande impacto na sua função corporal<sup>7,8</sup>.

De forma complementar, observou-se diminuição da estabilidade proteica decorrente da alteração Y269H pela ferramenta MuPRO,  $\Delta\Delta G = -1.6731749$ .

Contudo, as proteínas são as principais responsáveis pelas funções dos genes em organismos biológicos e as alterações nas suas condições fisiológicas geralmente se refletem em mudanças na expressão e/ou metabolismo<sup>9-11</sup>.

Para começar a vincular associações SNP com efeitos funcionais potenciais, é proposto um sistema de classificação que designa o grau em que um determinado SNP demonstrou ter um papel funcional, mais notavelmente nos comportamentos que causam doenças. No entanto, a classificação proposta não determina o grau de impacto funcional do polimorfismo, portanto, é impossível prever a probabilidade de um SNP específico associado à uma doença, por exemplo<sup>12,13</sup>.

Para entender a base mecanicista dos

polimorfismos relacionados com fenótipos específicos ou resultados comportamentais, é necessário entender se eles são funcionais (isto é, se altera a função de um gene ou de um grupo de genes). Na maioria dos casos, a função do polimorfismo relevante não é definida e deve ser assumida ou inferida como o efeito no gene que contém o polimorfismo. Em casos raros, o polimorfismo pode ser uma variação não sinônima na região codificadora, que altera a estrutura do gene da proteína do produto<sup>12</sup>.

Os polimorfismos mais comuns são os reguladores potenciais, localizados em regiões não codificantes, incluindo regiões promotoras/de montante, de jusante e intron, que podem afetar a transcrição<sup>12</sup>, no íntron e regiões não traduzidas transcritas como o RNA, podem afetar a transcrição, emenda de RNA, estabilidade ou tradução<sup>13</sup>; ou em regiões intergênicas com funções desconhecidas<sup>14</sup>. Um único SNP é capaz de ter um impacto funcional mínimo, mas pode estar relacionado com um desequilíbrio num conjunto de polimorfismos que formam haplótipos ligado ao resultado funcional da expressão ou função do gene<sup>15,16</sup>.

A osteoporose é causada por perda óssea excessiva, que se deve principalmente à elevação da reabsorção óssea pelos osteoclastos e/ou minimização da formação pelos osteoblastos. Estudos funcionais baseados em especial nos modelos de camundongos ou culturas de células *in vitro*, têm sido largamente utilizados para determinar a correlação de genes novos ou bem conhecidos com a osteoclastogênese, osteoblastogênese e fenótipos ósseos<sup>17</sup>.

A osteoporose pode ser primária (idio-

pática) ou secundária, sendo a primária dividida em tipo I e II. No tipo I, também conhecida como pós-menopausa, tem-se a perda óssea rápida e ocorre em mulheres que entraram recentemente neste período. Afeta principalmente o osso trabecular e está relacionada com fraturas das vértebras e do rádio distal. Já o tipo II, está relacionada com o envelhecimento e ocorre devido à deficiência crônica de cálcio, aumento da atividade do hormônio da paratireoide e diminuição da formação óssea<sup>1</sup>. E a osteoporose secundária é causada por processos inflamatórios, como artrite reumatoide; alterações endócrinas (hipertireoidismo e doença adrenal); mieloma múltiplo; e por uso de drogas como corticoides, uma vez que eles inibem a absorção intestinal do cálcio e elevam a sua excreção na urina, minimizando a formação osteoblástica e elevando a reabsorção osteoclástica<sup>2</sup>.

Os osteoclastos de reabsorção óssea possuem gênese hematopoiética e são oriundos de células da linhagem monócito-macrófago<sup>18</sup>. Ramalho e colaboradores (2000)<sup>19</sup> demonstram que há discordância no que diz respeito ao estágio onde a via de diferenciação de monócitos-macrófagos se separam daquela dos osteoclastos. Os autores trouxeram três teorias: 1. Os osteoclastos são derivados de um progenitor específico, o CFU-O (Unidades formadoras de colônias de osteoclastos), gerado de CFU-S (Unidades formadoras de colônias de haste); 2. Os osteoclastos são derivados de CFU-GM (Unidades formadoras de Colônia de granulócitos e macrófagos), um precursor comum de osteoclastos, bem como de granulócitos e macrófagos; 3. Os osteoclastos serão derivados de macrófagos teciduais e

monócitos circulantes.

A primeira teoria é improvável, uma vez que nenhum precursor de osteoclastos específico foi comprovado até o momento. A segunda teoria é mais provável porque a capacidade do precursor CFU-GM de se diferenciar em osteoclastos quanto em monócitos circulantes ou macrófagos teciduais foi confirmada. Alguns autores comprovaram a terceira teoria, na qual os osteoclastos podem ser formados não apenas por células imaturas da linhagem monócito-macrófago, mas também por monócitos circulantes e macrófagos teciduais quando o ambiente fornecido é suficiente. Portanto, as duas últimas teorias constituem caminhos possíveis para o recrutamento de osteoclastos (fisiológica e patologicamente)<sup>19</sup>.

Em ossos periféricos adultos, como os ossos do quadril, a medula local não é uma fonte importante de produção de osteoclastos, na verdade, todos os osteoclastos que atuam nessas áreas vêm principalmente de monócitos que migram para o osso através da circulação periférica<sup>20,21</sup>. A osteoclastogênese está ligada à diferenciação de monócitos em osteoclastos e em ossos periféricos adultos, como o osso do quadril, a osteoclastogênese ocorre somente após os Monócitos do Sangue Periférico (MSP) migrarem através da superfície endotelial do sangue para o osso<sup>18</sup>.

Depois de migrar do sangue periférico para o osso, os monócitos se diferenciam e se fundem em osteoclastos imaturos multinucleados, que são então ativados para se tornarem osteoclastos maduros no local da reabsorção óssea. É muito difícil coletar um grande número de osteoclastos de humanos para experi-

mentos; no entanto, é relativamente fácil coletar grandes quantidades de MSP, que são precursores dos osteoclastos<sup>18</sup>. Estudos constataram várias citocinas sintetizadas pelos MSP (como por exemplo, as interleucinas 1 e 6, bem como o fator de necrose tumoral alfa), que são importantes para a diferenciação, ativação e apoptose dos osteoclastos<sup>22-24</sup>. A expressão diferencial de genes em MSP estão relacionadas com as variações na Baixa Densidade Mineral Óssea (BDMO)<sup>25-27</sup>.

E de acordo com os resultados de Deng e colaboradores (2011)<sup>28</sup> foi exposto que são necessárias a utilização de MSP como um tipo de célula modelo para pesquisar a função de genes relacionados com o risco de osteoporose humana. Uma vez que dissecar mudanças nos níveis de expressão de proteínas em precursores de osteoclastos primários humanos, como por exemplo os MSP, em condições normais *versus* doença é uma tática potencialmente eficaz que pode ser usada para identificar genes funcionalmente relacionados com a osteoclastogênese *in vivo* em humanos.

As anexinas são proteínas reguladas pelo  $Ca^{2+}$ , fosfolipídicas e ligadas à membrana. Recebem o nome da palavra grega “anexar”, devido à sua habilidade de ligar a sua membrana em estruturas ou em outras membranas<sup>29</sup>. Entre os 12 membros da família anexina (A1-A11 e A13) identificados em vertebrados, todos, exceto um (A6) têm um domínio central altamente homólogo (~30-35 quilodaltons), que contém quatro repetições de hélice alfa múltiplas com ligação potencial de  $Ca^{2+}$  e um domínio N-terminal (~3 quilodaltons), específico para cada membro da família<sup>30,31</sup>.

A anexina é onipresente em toda a árvore filogenética e é evolutivamente antiga. A ANXA2 é um dos membros da superfamília da anexina mais amplamente estudados<sup>30</sup>. O gene *ANXA2* é produzido por uma variedade de tipos de células, incluindo as endoteliais, trofoblásticas, epiteliais e tumorais, bem como células imunes inatas, como macrófagos, monócitos e dendríticas. Este gene *ANXA2* é capaz de existir na forma monomérica ou heterotetramérica<sup>5,6</sup>.

O heterotetrâmero (A2 • S100A10) 2 consiste em duas cópias cada de *ANXA2* e da proteína S100A10, também conhecida como p11. O gene *ANXA2* está localizado no citoplasma e na superfície celular, e o seu papel é amplo e específico neste local. Na superfície das células endoteliais, o complexo (A2 • S100A10) 2 combina componentes do sistema fibrinolítico, plasminogénio e ativador do Plasminogénio Tecidual (tPA) para acelerar a ativação da serina protease plasmina<sup>5,6</sup>. Como protease fibrinolítica primária, a plasmina permite a degradação da fibrina e a angiogénese<sup>32,33</sup>. Na célula, este gene parece ter muitas funções, incluindo a organização de microdomínios de membrana especializados, a promoção de brotamento de vesículas e a regulação de outros eventos dinâmicos de membrana, como fusão, endocitose, biogénese endossômica e reparo de membrana<sup>28</sup>.

A regulação positiva do *ANXA2*, em ambos os níveis de expressão de mRNA e proteína, de MSP em indivíduos com BDMO baixa *versus* alta, apoia-se fortemente a relevância funcional do gene para a regulação da BDMO *in vivo* em humanos. Para explorar ainda mais a importância do gene *ANXA2* para os

fenótipos ósseos, foram avaliadas a ligação entre a osteoporose no nível do DNA o gene *ANXA2*. Em amostras de caso controle e população, foram identificados SNPs no gene *ANXA2* associados à BDMO do osso branco do quadril. E deixando evidências de que o *ANXA2* é um gene de suscetibilidade à osteoporose em humanos<sup>28</sup>.

Ainda Deng e colaboradores (2011)<sup>28</sup>, na sua pesquisa, avaliou os SNPs do gene *ANXA2* e associou à variação da BDMO numa população caucasiana, foram identificados um total de 15 SNPs localizados dentro do gene *ANXA2* e cobertos pela matriz Affymetrix, destes, três SNPs (*rs7163836*, *rs11633657* e *rs11633619*) estavam ligados a BDMO do quadril, bem como a BDMO do colo femoral. Tendo o *rs11633619*, associado à BDMO do quadril e do colo do fêmur. Deng e colaboradores (2011)<sup>28</sup> simularam a migração transendotelial, ou seja, a barreira endotelial entre o sangue e o osso, uma vez que os MSP devem migrar através dos capilares para os locais de reabsorção na superfície óssea antes que possam se diferenciar e formar osteoclastos de reabsorção óssea. Visto que o gene *ANXA2* é secretado por MSP humano, com isso, é essencial ter o discernimento do papel da proteína *ANXA2* exógena na migração transendotelial de monócitos. E na sua investigação, foi sugerido que, a *ANXA2* extracelular existente no sangue humano é capaz de induzir os monócitos a migrarem para a superfície de reabsorção óssea através do endotélio.

Como também, o gene *ANXA2* extracelular, presente no local de reabsorção óssea do corpo humano, é capaz de promover a migração de monócitos

da circulação através do endotélio e atraí-los para o osso para se diferenciarem em osteoclastos. Essas duas atividades podem funcionar sinergicamente para acelerar ainda mais o recrutamento de MSP para o osso. Apoiando o importante papel da proteína *ANXA2* na regulação da migração transendotelial de monócitos<sup>28,34,35</sup>.

Além do papel de *ANXA2* na migração transendotelial de monócitos, evidências de estudos *in vitro* indicam que *ANXA2* também é importante para a formação de osteoclastos e reabsorção óssea. Especificamente, em culturas de medula óssea humana, *ANXA2* promove a proliferação e diferenciação de precursores de osteoclastos e aumenta a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea<sup>36-39</sup>. O gene *ANXA2* pode interagir com o antígeno CD44 na quimiotaxia de células semelhantes aos neutrófilos em resposta ao fator complementar 5a *in vitro* e o anti-*ANXA2* parece bloquear essa atividade em neutrófilos humanos<sup>40</sup>.

Ao mesmo tempo, em comparação com outros leucócitos circulantes, o nível de expressão de *ANXA2* em neutrófilos humanos recém-isolados parece ser menor, especialmente em monócitos humanos e macrófagos derivados de monócitos, onde o seu nível de expressão é muito alto. Na verdade, o anti-*ANXA2* IgG impede a migração de monócitos induzida por citocinas através da matriz extracelular<sup>35</sup>.

E esta atividade de migração também requer a ativação de plasminogênio dependente de tPA como a serina protease plasmina. Além disso, experimentos de cicatrização de feridas *in vitro* demonstraram que a perda da expressão de *ANXA2* em células epiteliais intesti-

nais leva ao aumento da adesão à matriz celular por meio da integrina  $\beta$  e à redução da migração celular, mas não está claro se esse mecanismo é aplicável as células inflamatórias. No entanto, a extensão total das ações do *ANXA2* no recrutamento de células inflamatórias *in vivo* ainda não foi bem elucidada<sup>41</sup>.

## CONCLUSÃO

Contudo, as alterações morfofuncionais podem estar ligadas a processos danosos e a elevação e/ou diminuição de estabilidade da proteína, dificultando assim a sua ação. Além disso, a compreensão das alterações morfofuncionais e de estabilidade do *rs1803909* podem auxiliar na busca por marcadores genéticos e moleculares de diagnóstico precoce para a osteoporose em humanos.

Como também, proporciona a compressão dos possíveis processos de alterações estruturais, funcionais e de estabilidade acometendo assim vias fisiológicas. E mais pesquisas funcionais são necessárias para elucidar a função do gene *ANXA2* e o impacto *in vivo* do *rs1803909* na gênese da osteoporose humana.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Riggs BL & Melton LJ. Evidence for two distinct syndromes of involuntional osteoporosis. *Am J Med.* 1983; 75, 899-901.
2. Lane JM & Nydick M. Osteoporosis: Current modes of prevention and treatment. *J Am Acad Ortho Surg.* 1999; 7, 19-31.
3. Coughlan T & Dockery F. Osteoporosis and fracture risk in older people. *Clinical medicine.* 2014; 14, 187-191.

4. Hedhli NDJ, et al. The annexin A2/S100A10 system in health and disease: emerging paradigms. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 4062-73.
5. Cesarman GM, Guevara CA, Hajjar KA. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator (t-PA). II. Annexin II-mediated enhancement of t-PA-dependent plasminogen activation. *J Biol Chem.* 1994; 269, 21198-21203.
6. Hajjar KA, Jacovina AT, Chacko J. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J Biol Chem.* 1994; 269, 21191-21197.
7. Blakely RD. Overview: a rare opportunity or just one less reason to be depressed. *Neuron.* 2005; 48, 701-2.
8. Zhang X, et al. Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression. *Neuron.* 2005; 45, 11-16.
9. Kesisis G, et al. Biological markers in breast cancer prognosis and treatment. *J Buon.* 2010; 15, 447-454.
10. De Jong MC, et al. CD44 Expression Predicts Local Recurrence After Radiotherapy In Larynx Cancer. *Clin Cancer Res.* 2010; 16, 5329-5338.
11. Chorley BN, et al. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: current and developing technologies. *Mutat Res.* 2008; 659, 147-57.
12. Kuo YB, et al. Identification of Phospholipid Scramblase 1 as a biomarker and it's prognostic value for Colorectal Cancer. *Mol Med.* 2011; 17, 41-47.
13. Sadee W, et al. Pharmacogenomics of the RNA world: structural RNA polymorphisms in drug therapy. *Clin Phar-*

macol Ther. 2011; 89, 355-65.

14. Liao P-Y & Lee KH. From SNPs to functional polymorphism: the in sight into biotechnology applications. *Biochem Eng J.* 2010; 49, 149-58.

15. Drysdale CM, et al. Complex promoter and coding region beta 2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness. *Proc Natl Acad Sci.* 2000; 97, 10483-8.

16. Rezende RB & Teodoro L. Impacto do polimorfismo rs121913578 do gene mrt associado ao câncer de tireoide. *Archives of Health, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 1101-1104, 2021.*

17. Xu XH, et al. Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: the 2009 update. *Endocr Rev.* 2010; 31, 447-505.

18. Roodman GD. Regulation of osteoclast differentiation. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1068, 100-109.

19. Ramalho ACR, et al. Por Que Estrógeno e Raloxifeno Melhoram a Densidade Mineral Óssea? Mecanismo de Ação do Estrógeno e de Um Modulador Seletivo do Receptor de Estrógeno (SERM) no Osso. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2000; 44(6), 471-482.

20. Parfitt AM, et al. A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates. *J Bone Miner Res.* 1996; 11, 150-159.

21. Parfitt AM. Skeletal heterogeneity and the purposes of bone remodelling: implications for the understanding of osteoporosis. In: Marcus R. Zfeldman D. Kelsey J. *Osteoporosis.* Academic Press. 2001; 433-444.

22. Cohen-Solal ME, et al. Periphe-

ral monocyte culture supernatants of menopausal women can induce bone resorption: involvement of cytokines. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 77, 1648-1653.

23. Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1996; 11, 1043-1051.

24. Cohen-Solal ME, et al. Increased bone resorbing activity of peripheral monocyte culture supernatants in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83, 1687-1690.

25. Liu YZ, et al. A novel pathophysiological mechanism for osteoporosis suggested by an in vivo gene expression study of circulating monocytes. *J Biol Chem.* 2005; 280, 29011-29016.

26. Deng FY, et al. Proteomic analysis of circulating monocytes in Chinese premenopausal females with extremely discordant bone mineral density. *Proteomics.* 2008; 8, 4259-4272.

27. Farber CR. Identification of a gene module associated with BMD through the integration of network analysis and genome-wide association data. *J Bone Miner Res.* 2010; 25, 2359-2367.

28. Deng FY, et al. Peripheral blood monocyte-expressed ANXA2 gene is involved in pathogenesis of osteoporosis in humans. *Molecular & cellular proteomics: MCP,* 2011; 10, M111.011700.

29. Gerke V, Creutz, CE, Moss, SE. Annexins: Linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6, 449-461.

30. Rescher U & Gerke V. Annexins unique membrane binding proteins with diverse functions. *J Cell Sci.* 2004; 117, 2631-2639.

31. Hajjar KA. The Biology of Annexin A2: From Vascular Fibrinolysis to Innate Immunity. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2015; 126, 144–155.
32. Hajjar KA & Acharya SS. Annexin II and Regulation of Cell Surface Fibrinolysis. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 902, 265–271.
33. Dassah M, et al. The Endothelial Cell Annexin A2 System and Vascular Fibrinolysis. *Gen Physiol Biophys.* 2009; 28, 20–28.
34. Falcone DJ, et al. Plasminogen-mediated matrix invasion and degradation by macrophages is dependent on surface expression of annexin II. *Blood.* 2001; 97, 777-784.
35. Brownstein C, et al. Annexin II mediates plasminogen-dependent matrix invasion by human monocytes: Enhanced expression by macrophages. *Blood.* 2004; 103, 317–324.
36. Takahashi S, et al. Cloning and identification of annexin II as an autocrine/paracrine factor that increases osteoclast formation and bone resorption. *J Biol Chem.* 1994; 269, 28696-28701.
37. Mena C, et al. Annexin II increases osteoclast formation by stimulating the proliferation of osteoclast precursors in human marrow cultures. *J Clin Invest.* 1999; 103, 1605-1613.
38. Li F, et al. Annexin II stimulates RANKL expression through MAPK. *J Bone Miner Res.* 2005; 20, 1161-1167.
39. Lu G, et al. Cloning and characterization of the annexin II receptor on human marrow stromal cells. *J Biol Chem.* 2006; 281, 30542-30550.
40. Mcvoy LA. & Kew RR. CD44 and Annexin A2 Mediate the C5a Chemotactic Cofactor Function of the Vitamin D Binding Protein. *J Immunol.* 2005; 175, 4754–4760.
41. Rankin CR, et al. Annexin A2 Regulates  $\beta$ 1 Integrin Internalization and Intestinal Epithelial Cell Migration. *J Biol Chem.* 2013; 288, 15229–15239.