Leonardo Franco Pinheiro Gaia

Avaliação da osteoporose por parâmetros hormonais e imunológicos

Assessment of osteoporosis by hormonal and immunological parameters

Uberaba-MG

2017

Leonardo Franco Pinheiro Gaia

Avaliação da osteoporose por parâmetros hormonais e imunológicos

Assessment of osteoporosis by hormonal and immunological parameters

Dissertação apresentada à Universidade de Uberaba, para obtenção de Título de Mestre em Odontologia, na Área de Biopatologia.

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues

Uberaba-MG

2017

Gaia, Leonardo Franco Pinheiro
Avaliação da osteoporose por parâmetros hormonais e imunológicos
44 páginas

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Uberaba

1. osteoporose 2. hôrmonios 3. Citocinas 4. IL-33 5. IL-6 I. Universidade de Uberaba.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Murilo Antônio Rocha

Profª. Drª. Ruchele Dias Nogueira G. Martins

Profª. Drª. Denise Bertulucci R. Rodrigues

Orientadora

Dedico esta obra à Marcela, minha esposa, que é quem realmente trabalha.

“Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante.”

Antoine de Saint-Exupéry

Agradecimentos

A realização desse trabalho não seria possível sem a colaboração de muitas pessoas, por isso, gostaria de agradecer a cada um pelo apoio em todos os momentos da minha trajetória.

Aos meus familiares e amigos que sempre me incentivaram e torceram pela minha vitória. Aos colegas de trabalho e à minha orientadora pelos ensinamentos, paciência e dedicação.

Aos pacientes que permitiram a realização desse projeto, ao programa de pós-graduação em odontologia e à Universidade de Uberaba. Ao Hospital Mário Palmério e ao Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro que disponibilizaram o espaço para coleta do material, ao Cefores e a e aos órgãos de financiamento CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Índice

Abreviaturas 07

Introdução Geral 08

Capítulo 1. Redação de artigo científico 17

Abstract 17

Resumo 18

1. Introdução 19

2. Materiais e Métodos 21

2.1. Grupo de Estudo 21

2.2. Coleta de sangue 21

2.3. Análise hormonal 21

2.4. Análise de citocinas - ELISA 22

2.5. Análise estatística 22

3. Resultados 23

4. Discussão e conclusão 29

Considerações Finais 32

Referências Bibliográficas 33

Anexos 41

Anexo 1: Revista escolhida para publicação 41

Anexo 2: Aprovação do Comitê de Ética 42

Abreviaturas

E2 – estrogênio

IGF-1 – fator de crescimento insulina-símile

IL-1 – interleucina 1

IL-4 – interleucina 4

IL-6 – interleucina 6

IL-12 – interleucina 12

IL-17A – interleucina 17A

IL-17R – receptor da IL-17

IL-22 – interleucina 22

IL-23 – interleucina 23

IL-33 – interleucina 33

IFN – γ – interferon gamma

JNK – quinase c-Jun N-terminal

M-CSF – fator estimulador de colônia de macrófagos

MMP - metaloproteinase

OPG – osteoprotegerina

PTH – paratormônio

Rank – receptor ativador do fator nuclear

Rankl – lingante do receptor ativador nuclear

TGF- β – fator de transformação do crescimento

Th1/ Th17 – perfil de linfócitos na resposta imunológica

TNF – fator de necrose tumoral

TIMPs – inibidores teciduais das metaloproteinases

Introdução Geral

Osteoporose

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica caracterizada por redução da densidade mineral óssea e pela deterioração micro arquitetural do tecido, devido ao desequilíbrio da remodelação óssea, que causa sua maior fragilidade e aumento na susceptibilidade para fraturas (Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group, 1994; DALLE CARBONARE et al., 2009). Na osteoporose, ocorre alteração quantitativa e qualitativa nos componentes desse tecido, havendo desmineralização mais intensa e prolongada, com uma velocidade maior e mobilização mais rápida dos minerais do que eles podem ser repostos (STAZI; TRINTI, 2007).

A osteoporose pode ser subdividida em primária e secundária. A primária pode ser subdividida em tipo I (osteoporose pós-menopausa) e tipo II (osteoporose senil), segundo a idade do paciente. A secundária é aquela decorrente de doenças, drogas ou outras condições que possam contribuir para a osteoporose, aumentando o risco de fraturas (DOBBS; BUCKWALTER; SALTZMAN, 1999).

É a doença osteometabólica mais comum entre os idosos, devido à alta incidência e à elevada prevalência de fraturas por fragilidade óssea (MORAES et al., 2014). Hoje, no mundo, a osteoporose representa não só um problema social, mas também econômico, pelos altos custos gerados com os cuidados que essa enfermidade exige. Atualmente, acomete aproximadamente 7% dos homens e 17% das mulheres em todo o mundo; destas, 70% estão na faixa etária de 80 anos ou mais. Na Europa, Estados Unidos e Japão, a osteoporose acomete aproximadamente 75 milhões de pessoas e calcula-se que irão ocorrer mais de 8 milhões de fraturas de quadril nos próximos 50 anos (PINHEIRO MDE; EIS, 2010).

No Brasil, estima-se que a osteoporose acometa 10 milhões de pessoas, sendo que maior a prevalência está entre as mulheres (7 *versus* 1,3% dos homens). Quando se estratifica pela idade, a prevalência tende a aumentar: na população com ≥ 65 anos, a prevalência é de 22% para ambos os sexos (32,7% para mulheres e 5,1% para homens) (PINHEIRO MDE; EIS, 2010).

Atualmente, a incidência da osteoporose vem aumentando em função da maior longevidade alcançada pela população feminina em todo o mundo, podendo acometer até 70% das mulheres acima de 80 anos (COMPSTON, 1997). A partir dos 40 anos, o volume de massa óssea começa a diminuir lentamente, mas, por volta dos 49 anos, na mulher, a queda é

acelerada pelo hipoestrogenismo, responsável pela perda de massa óssea num percentual que atinge cerca de 2 a 3 % ao ano, nos 10 primeiros anos após a menopausa. Em algumas mulheres, a queda é mais acentuada, levando, dentre outras alterações, à osteoporose (CLAASSEN et al., 2006; TALWAR et al., 2006), uma das comorbidades do climatério mais temidas por médicos e pacientes, em função do risco de fraturas e diminuição da qualidade de vida (COMPSTON, 1997).

Segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas, recomenda-se para o diagnóstico clínico a adoção dos critérios densitométricos da Organização Mundial da Saúde, com base na classificação do *T-score*: normal (*T-score* ≥ -1), osteopenia (*T-score* < -1 e > -2,5) e osteoporose (*T-score* ≤ -2,5). Para o tratamento, recomenda-se a suplementação com cálcio e vitamina D, estrogênios, bisfosfonatos (alendronato, risedronato e pamidronato), raloxifeno e calcitonina (Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group, 1994).

Fatores de risco

Vários fatores de risco estão associados ao desenvolvimento de osteoporose. Entretanto, os fatores de risco associados a fraturas são considerados os mais importantes, os principais são redução da massa óssea, idade avançada, história de fratura prévia, história materna de fratura, ser da raça branca, usar glicocorticoide, fumar ou ter fumado. A atividade física regular e o uso de estrogênios são fatores protetores contra a osteoporose (SIRIS et al., 2001) (FONTES et al., 2012). Outros fatores associados estão Densidade Mineral Óssea - DMO (baixa), estilo de vida (ausência de atividade física regular), envelhecimento, história materna de fratura e história de quedas (ROUZI et al., 2012).

No Brasil, o risco de fraturas é de 15,1% nas mulheres acima de 40 anos. Os principais fatores de risco para fraturas (com baixo trauma) nas mulheres são idade avançada, história familiar de fratura de fêmur, menopausa precoce, sedentarismo, baixa qualidade de vida, maior ingestão de fósforo, diabetes *mellitus*, uso de benzodiazepínicos e quedas recorrentes (PINHEIRO et al., 2009).

Na menopausa aumenta a renovação e diminui a formação óssea em cada unidade de remodelação, o que conduz a uma perda de massa óssea. O risco de osteoporose depende tanto da massa óssea máxima alcançada nos anos da idade adulta jovem quanto do índice de perda da massa nas épocas posteriores (LANZILLOTTI et al., 2003). Dentre os fatores de risco está a ausência de atividade física regular e de terapia de reposição hormonal, bem como fatores genéticos e os relativos à dieta (HALLBERG et al., 1992).

Formação óssea e osteoimunologia

Nos últimos anos muitos estudos estão sendo conduzidos para entender o processo de regulação fisiológica e patológica da remodelação óssea, evidências encontradas mostram que há uma relação entre o sistema imune e o osso (DEAL, 2012; SIGL; PENNINGER, 2014).

Os osteoclastos são originados de células tronco hematopoéticas. M-CSF (macrofage colony-stimulating factor), derivados de osteoblastos, conduzem à proliferação e sobrevivência desta células progenitoras para se ligarem ao receptor, cFms (KIM; KIM, 2014). Na presença do fator de crescimento M-CSF, a ativação do receptor RANK na superfície da célula precursora de osteoclastos maduros constituem um sinal essencial para diferenciação e ativação destes e consequentemente na reabsorção óssea (JABBAR et al., 2011). A diferenciação dos osteoclastos é iniciada pela ligação de RANKL, uma citocina da família de TNF, ao receptor ativador de NF-kB (RANK). Osteoblastos são a principal fonte de RANKL, mas a citocina também é expressa por osteócitos, fibroblastos ou células do sistema imune, incluindo células T e células dendríticas maduras (KIM; KIM, 2014).

Uma das principais vias de diferenciação e ativação osteoclastogênica envolve um sistema recentemente identificado, o RANK (receptor ativador do fator nuclear NFkB)-RANKL (receptor ativador do fator nuclear NFκB ligante)-OPG (osteoprotegerina) (KHOSLA, 2001). O RANKL é uma molécula importante para a diferenciação das células hematopoiéticas progenitoras que se transformam em osteoclastos maduros e exercem seus efeitos por meio de sua ligação ao receptor RANK. Por outro lado, a osteoclastogênese é bloqueada na presença da OPG, um receptor solúvel que ao se ligar ao RANKL impede a sua ligação ao seu receptor RANK, inibindo assim a diferenciação destas células (HOFBAUER; KUHNE; VIERECK, 2004). O RANKL é também um regulador da interação células dendríticas no sistema imune e um fator crucial no desenvolvimento inicial de linfócitos e na organogênese dos nódulos linfáticos (BERNSTEIN; LESLIE, 2003).

Entre os fatores estimuladores positivos da função e sobrevivência osteoblástica estão as proteínas morfogenéticas do osso, TGF-β, Wnt, insulina, neurotransmissor, fator de crescimento do fibroblasto, e hormônio da paratireoide (ARRON; CHOI, 2000; HOEPPNER; SECRETO; WESTENDORF, 2009; PIETSCHMANN et al., 2009; RAUNER et al., 2013). Após a ligação e sinalização intracelular, essas moléculas ativam diversos fatores de transcrição. Um fator chave para diferenciação dos osteoblastos é o Runt (Related Transcription fator-2). Consequentemente, a proteína da matriz óssea como colágeno tipo I

(COL I). Além disso, osteoblastos produzem os reguladores positivos e negativos da osteoclastogênese como o ligante para receptor ativador do fator nuclear (NF)-kB (RANKL) e o natural receptor laço para RANKL, osteoprotegerina (OPG), respectivamente (RAUNER; SIPOS; PIETSCHMANN, 2007).

Entre os reguladores negativos da formação dos osteoblastos incluem Dickkopf-related protein 1 e esclerostina, que é produzido principalmente pelos osteócitos e interfere no caminho de sinalização de Wnt. Além disso, algumas citocinas como IL-6 e TNF-α inibem a função osteoblástica (ROY, 2013).

Interessantemente, células do sistema imune, principalmente linfócitos T ativados e células apresentadoras de antígeno, também podem expressar RANKL, e assim influenciar a remodelação óssea através da produção de citocinas (WEITZMANN; PACIFICI, 2006). Por exemplo, IL-6, IL-17, TNF-α e IFN-γ promovem perda óssea por meio do favorecimento da produção de osteoclastos e pela inibição da diferenciação em osteoblastos (DAVID; SCHETT, 2010; MCLEAN, 2009). Outras citocinas como IL-4, IL-12 e IL-33 são inibidoras da diferenciação dos osteoclastos e diminuem a perda óssea (FUJII et al., 2012; SALEH et al., 2011). O TNF-α induz a osteoclastogênese direta e indiretamente, por meio do aumento da produção de M-CSF pelas células estromais da medula óssea ou pela diminuição de OPG pelos osteoblastos, respectivamente (LEE, 2013).

A IL-31 estimula a secreção de citocinas pro-inflamatórias, quimiocinas e matriz de metaloproteinase (KASRAIE; NIEBUHR; WERFEL, 2010; ZHANG et al., 2008). Além disso, tem sido observado que IL-31 pode afetar positivamente e negativamente a diferenciação em Th1 e Th17 em um sistema livre de células apresentadoras de antígeno (ZHANG et al., 2008).

A IL-17 é uma importante mediadora da artrite inflamatória e outras doenças que afetam o osso (YUAN et al., 2012), está diretamente relacionada com a estimulação da diferenciação dos osteoclastos e inibição da diferenciação dos osteoblastos, promovendo a perda óssea, mas na presença do estrogênio esse efeito é antagonizado (DESELM et al., 2012; TYAGI et al., 2012). Em osteoblastos, a IL-17 inibe a mineralização da matriz óssea e a produção de citocinas osteoclastogênicas, mas esse efeito também é antagonizado pelo estrogênio (TYAGI et al., 2012).

Estudo *in vivo* com a neutralização sistêmica de IL-17 em camundongos ovariectomizados previne a perda óssea, através da deterioração da microarquitetura óssea, aumento de marcadores da reabsorção e mudança em parâmetros celulares e moleculares da

célula óssea, sugerindo um papel crucial da IL-17 na mediação da perda óssea induzida pela deficiência de estrogênio (TYAGI et al., 2012).

Estudo utilizando bloqueador de TNF-α, foi observada inibição do efeito da IL-17 na osteoclastogênese, sugerindo que a IL-17 induz a produção de TNF-α em osteoblastos, os quais podem ser responsáveis pelos efeitos mediados pela IL-17 (YAGO et al., 2009). Também foi observada que a IL-17 mediou a inibição da diferenciação dos osteoblastos e aumentou a expressão de RANKL em osteoblastos da calvária (TYAGI et al., 2012).

Estes efeitos de IL-17 mediada foram bloqueados por E2, que é conhecido para reprimir a transcrição de genes alvo de NF-kB expressos por osteoblastos. E2 também anulou a expressão induzida de IL-17, IL-17R e de receptor de NF-kB translocação em osteoblastos, inibindo assim a sinalização a jusante mediadas por ligação da IL-17 ao seu receptor.

A IL-33 pertence à família de citocinas IL-1 que são conhecidas principalmente por suas funções pró-inflamatórias (AREND; PALMER; GABAY, 2008; SCHMITZ et al., 2005), estudos sugerem que a IL-33 desempenha a função de estimular citocinas do perfil Th2, como a IL-4 mediando um efeito osteoclastogênico independente de RANKL numa forma dependente de STAT 6 (SCHULZE et al., 2011; TOWNSEND et al., 2000).

Experimentos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a IL-33 age como um potente inibidor da osteoclastogênese (KELLER et al., 2012; SCHULZE et al., 2011). No estudo *in vitro*, usando uma análise molecular, foi demonstrado que a IL-33 aumenta a diferenciação de osteoblastos primários e inibe a formação de osteoclastos, o que pode ser relevante para o tratamento de desordens de perda óssea (SCHULZE et al., 2011).

Os efeitos da IL-33 são mediados através da interação com um receptor heterodimérico consistindo de ST2 ligado a membrana (IL1RL1) e IL-1RAcP, induzindo ativação de NF-kb e MAPK (CHACKERIAN et al., 2007; KUROWSKA-STOLARSKA et al., 2008; SCHMITZ et al., 2005).

A IL-33 é capaz de induzir significativamente a expressão Tnfsf11 em osteoblastos murino primários sem causar liberação sRankl para o meio, em contraste com PTH (KOLLMANN et al., 2013), estudos mostraram que apenas o tratamento com PTH de osteoblastos primários resultou em concentrações médias detectáveis de sRankl (HECKT et al., 2016).

A maior prevalência de osteoporose na doença celíaca está associada, sobretudo, à má absorção de cálcio e vitamina D com efeito direto no metabolismo ósseo, provavelmente secundárias às lesões da mucosa intestinal. Porém, alterações do IGF-1 (fator de crescimento insulina-símile-1) e da leptina em pacientes celíacos com perda de peso e baixo índice de

massa corpórea, podem ser fatores que contribuem para a redução da densidade mineral óssea, pelas alterações imunológicas que desencadeiam (KUNG; HUANG, 2007). Além disso, os níveis elevados de IL-1β, IL-6 e o receptor de TNF-1 desequilibram o sistema RANK (receptor ativador do fator nuclear Kappa B)-RANKL (ligante do receptorativador de NFκB, RANK)-osteoprotegerina, aumentando a perda de massa óssea associada à doença celíaca (HOFBAUER et al., 2004; KHOSLA, 2001; TILG et al., 2008).

Metaloproteinase e seus inibidores

As Metaloproteinases da Matriz (MMPs) constituem-se de um grupo de enzimas (endopeptidases) responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC) e das membranas basais (GROSS; LAPIERE, 1962).

A atividade das MMPs tem sido relacionada a importantes doenças, como destruição de articulações nos casos de artrite reumatóide, osteoartrite, aneurisma aórtico abdominal, infarto agudo do miocárdio e câncer. As MMPs também participam de processos de remodelação normais, como no desenvolvimento embriológico, na involução pós-parto do útero, na remodelação óssea, na ovulação e na reparação de feridas (BRECKON et al., 1999).

As MMPs são enzimas que participam ativamente na reabsorção óssea que ocorre na doença periodontal e nas lesões periapicais crônicas. Os osteoblastos expressam FIB-CL (*fibroblast-type collagenase*)-(MMP-1) quando estimulados. Portanto, hipoteticamente, a reabsorção óssea osteoclástica é iniciada por uma resposta osteoblástica a sinais de reabsorção, como a liberação de MMP, resultando em dissolução da camada osteóide não mineralizada, sendo os osteoclastos recrutados para essa região, os quais parecem não produzir MMP (HILL et al., 1994).

A família das metaloproteinases é indispensável para o recrutamento dos osteoclastos em metatarsos em desenvolvimento, e esta função é diferente da sinergia com proteinases de cisteína em matriz solubilizante calcificada na zona de reabsorção. A MMP específica responsável pela atividade dos osteoclastos e o seu modo de ação ainda não foram determinados. Entretanto, alguns estudos mostraram que concentrações no soro de MMP-2 e MMP-3 são mais elevados em alguns pacientes com espondilite anquilosante (ENGSIG et al., 2000; UCHIBORI et al., 2004). Devido esses dados, a MMP-2 e MMP-3 foram utilizadas para avaliar a eficácia clínica de bifosfonatos no tratamento secundário de osteoporose. Em conclusão, o bifosfonatos demonstraram papel importante no metabolismo ósseo, por meio da diminuição de MMP-2, MMP-3 em pacientes com espondilite anquilosante secundária a osteoporose (XIAO et al., 2012).

As MMPs derivadas de osteoblastos também têm sido mostradas por desempenhar um papel no metabolismo ósseo, devido sua participação na degradação da matriz óssea. A reabsorção óssea é dependente da atividade de MMP-3, que degrada o colágeno desnaturado tipo II e outros componentes da matriz orgânica óssea (HALL et al., 1999). Evidências têm sido acumuladas para uma participação ativa de MMP derivada de osteoblastos na iniciação da reabsorção óssea e formação óssea acoplada através da degradação da camada de superfície osteóide desmineralizada do osso permitindo que os osteoclastos ataquem a matriz mineralizada (BRECKON et al., 1999; HUANG et al., 2004).

As atividades das MMPs são controladas também por meio dos inibidores específicos, conhecidos como inibidores teciduais de MMPs (TIMPs). As TIMPs são proteínas pequenas e multifuncionais que regulam ambas as funções das MMPs, o nível de sua ativação e sua habilidade de hidrolisar um determinado substrato. O equilíbrio entre a produção de MMPs e a de TIMPs representa um ponto principal para manter a homeostase da matriz extracelular (BIRKEDAL-HANSEN, 1993).

Alguns estudos sugerem que TIMP-3 está associada com o aumento da formação de osso, enquanto diminui a reabsorção óssea in vivo (SHEN et al., 2010).

Fatores hormonais e osteoporose

Cerca de 50% das mulheres pós-menopáusicas com artrite reumatóide sofrem de osteoporose generalizada, com causas multifatoriais, envolvendo a deficiência de estrogênio, corticoterapia a longo prazo e inflamação sistêmica (FORSBLAD D'ELIA et al., 2003; SINIGAGLIA et al., 2000). A reabsorção óssea em osteoporose induzida por ovariectomia é impulsionado por TNF produzido por células T (ROGGIA et al., 2001).

Os osteoblastos, células formadoras de ossos, surgem de células-tronco mesenquimais (MSCs), que são capazes de dar origem a um número de linhagem celular, como adipócitos, mioblastos ou condrócitos (WANG, C. et al., 2015).

Quando exposto ao meio de diferenciação osteogênica suplementado com 17-β-estradiol (E2), as MSCs aumenta a expressão da proteína morfogenética óssea e osteocalcina, e aumenta significativamente a deposição de cálcio (FAWELL et al., 1990; HONG; COLPAN; PEPTAN, 2006). O estrogênio (E2) também estimula a expressão do gene osteogênico para fosfatase alcalina e o colágeno tipo I para MSCs (ZHOU et al., 2001). Em relação ao papel do estrogênio na diferenciação osteogênica de MSCs, há evidências de que o E2 suporta o crescimento e diferenciação principalmente através do receptor α de estrogênio

(WANG, Q. et al., 2006). Estas observações sugerem que o estrogênio poderia afetar profundamente a fisiologia dos osteoblastos. O estrogênio promove a saúde dos ossos, em parte, através da redução da apoptose dos osteoblastos devido à quinase regulada por sinal extracelular, via de sinalização e regulação negativa da quinase c-Jun N-terminal (JNK), que altera a atividade de um número de fatores de transcrição (KHOSLA; OURSLER; MONROE, 2012; KOUSTENI et al., 2001; KOUSTENI et al., 2003).

Foi especulado que o E2 promove a diferenciação osteoblástica principalmente no estágio inicial (GUI et al., 2016). O estrogênio inibe potencialmente a produção e a função dos osteoclastos, e esse é o mecanismo principal pelo qual esse hormônio conserva o esqueleto durante a idade reprodutiva de mamíferos fêmea (BURGER, 2001).

Em mulheres pós-menopausa, a deficiência de estrogênio está intimamente associada com aumento da incidência e a gravidade de osteoporose, e os dados clínicos demonstraram que mulheres pós-menopáusicas tendo terapia de reposição estrogênica tiveram um risco reduzido de fratura patológica comparados com aqueles que não tomam reposição hormonal (FAN et al., 2014). O estrógeno melhorou a diferenciação de células hBMSCs osteoblásticas através de ER-a (HONG et al., 2006) ou pela ativação de Wnt/b-catenina (BHUKHAI et al., 2012).

As células T são os principais indutores de osso reabsorvido sob a deficiência de estrogênio, porque a ovariectomia aumenta a produção de fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) por células T a um nível suficiente para aumentar osteoclastogênese (CENCI et al., 2000), através do aumento do ativador de receptor de nuclear kappa B ligante (RANKL) (WEITZMANN; PACIFICI, 2006). A deficiência de estrogênio aumenta produção de IL-1 (HU; MITCHO; RATH, 1988).

Níveis baixos de testosterona são comuns em homens mais velhos e estão associados com resultados adversos, tais como diabetes, obesidade, eventos cardiovasculares, sarcopenia, osteoporose e diminuição da libido (MATSUMOTO, 2002; TRAVISON et al., 2007). Idosos do gênero masculino com deficiência de testosterona total ou de estradiol têm maior probabilidade de ter osteoporose. Os homens mais velhos com deficiência de testosterona total são mais propensos a ter rápida perda óssea (FINK et al., 2006).

Devido ao aumento de casos de osteoporose na população causado pelo aumento da expectativa de vida, surgiu a necessidade de se estudar mais a doença. Visto isso, o trabalho de dissertação aqui apresentado, teve como objetivo avaliar níveis hormonais de níveis de citocinas em pacientes jovens e pacientes idosos com osteoporose.

O artigo referente a dissertação, apresentado a seguir, será enviado para publicação na revista *BONE* (Anexo 1).

Capítulo 01: Redação do artigo científico

Abstract: Osteoporosis has become more and more common these days. With an increase in life expectancy, the impact of this disease on the quality of life of elderly people is increasingly relevant. The effect of inflammatory cytokines and hormones on bone metabolism plays a key role. For a better understanding of this relationship, the cytokines IL-6, IL-22, IL-23, IL-33, IL-17A, IL-17R, metalloproteinase-3 (MMP-3), and hormones testosterone, estradiol, parathyroid hormone (PTH), leptin, calcitonin and D vitamin. Using a blood sample from 30 patients with Osteoporosis and 30 patients without Osteoporosis, cytokines, MMP-3 and leptin were dosed by the ELISA method, and hormones, calcitonin and vitamin D by the chemiluminescence method. Statistical analysis was considered significant when $p < 0.05$. In the group of patients with osteoporosis, the mean age of the female gender was 80.05 ± 9.47 years and the male gender was 74.9 ± 9.18 years. Women with osteoporosis presented a significant decrease in estradiol and vitamin D levels ($p = 0.047$ and $p = 0.0275$), respectively, as well as significantly higher levels of IL-6 and IL-33 ($p = 0.045$ and $p = 0.0121$), respectively. Men with Osteoporosis showed significantly higher levels of PTH and MMP-3 ($p = 0.0065$ and $p = 0.0379$), respectively, and significantly decreased levels of IL-33 ($p = 0.0228$). Therefore, hormonal and cytokine alterations are associated differently in Osteoporosis between men and women. The increase in MMP-3 and PTH and the decrease in the protective effect of IL-33 in men, could play an important role in osteoporosis, whereas in women the disease appears to increase with IL-6.

Key words: Osteoporosis, hormones, cytokines, IL-33, IL-6.

Resumo: A Osteoporose tem se mostrado cada vez mais frequente nos dias atuais. Com elevação da expectativa de vida, o impacto dessa doença na qualidade de vida das pessoas idosas é cada vez mais relevante. O efeito de citocinas inflamatórias e hormônios no metabolismo ósseo tem papel fundamental. Para um melhor entendimento dessa relação, foram avaliados os níveis de citocinas IL-6, IL-22, IL-23, IL-33, IL-17A, IL-17R, metaloproteinase-3(MMP-3), e hormônios: testosterona, estradiol, paratormônio (PTH), leptina, calcitonina e vitamina D. Através de amostra sanguínea, de 30 pacientes com Osteoporose e 30 pacientes sem, as citocinas, a MMP-3 e a leptina foram dosadas pelo método do ELISA, já os hormônios, calcitonina e a vitamina D pelo método de quimioluminescência. Após análise estatística, a diferença foi considerada significante quando o valor de $p < 0,05$. No grupo de pacientes com Osteoporose, a média de idade do gênero feminino foi de 80,05 ± 9,47 anos e do gênero masculino foi de 74,9 ± 9,18 anos. Mulheres com Osteoporose apresentam diminuição significativa nos níveis de estradiol e vitamina D ($p=0.047$ e $p=0.0275$), respectivamente, além de níveis significativamente maior de IL-6 e IL-33 ($p=0,045$ e $p=0.0121$), respectivamente. Homens com osteoporose demonstraram níveis significativamente maiores de PTH e MMP-3 ($p=0.0065$ e $p=0.0379$), respectivamente, e níveis significativamente diminuídos de IL-33 ($p=0.0228$). Desta forma, alterações hormonais e de citocinas estão associadas de maneira diferente na Osteoporose entre homens e mulheres. O aumento de MMP-3 e do PTH e a diminuição do efeito protetor da IL-33 em homens pode ser fator importante na Osteoporose, enquanto, nas mulheres, a doença parece cursar com aumento de IL-6.

Palavras-chaves: Osteoporose, hormônios, citocinas, IL-33, IL-6.

1. Introdução

A osteoporose é causada por um desequilíbrio no metabolismo ósseo normal entre os osteoblastos e osteoclastos (ZAIDI, 2007), sendo que no processo de reabsorção óssea o osteoclasto parece ter um papel mais ativo em relação ao osteoblasto (CHARLES et al., 2012; UDAGAWA et al., 2000). Estudos apontam que hormônios podem ter um papel importante no desequilíbrio de formação óssea (BRECKON et al., 1999), visto que o PTH parece induzir o osteócito a diferenciar em osteoclasto (SILVA; BILEZIKIAN, 2015). Da mesma forma, hormônios como o estradiol e a testosterona parecem ser importantes (DAMIEN; PRICE; LANYON, 2000; GUI et al., 2016; KOUSTENI et al., 2003), uma vez que, a testosterona age inibindo a apoptose de osteoblastos (WIREN et al., 2006). Já o estrogênio parece ter um papel importante na remodelação óssea, tanto em homens quanto em mulheres, uma vez que, esse hormônio parece estimular a liberação de calcitonina além de ativar receptores de vitamina D no intestino, permitindo sua função endócrina e imunológica no processo do metabolismo ósseo (ADAMS, 2006; CHEN et al., 2011). A calcitonina e a vitamina D ajudam a manter concentrações adequadas de cálcio no soro para permitir a mineralização normal do osso, além disso, a vitamina D é necessária para o crescimento ósseo e remodelação óssea por osteoblastos e osteoclastos (WEAVER et al., 2016). A leptina também é um hormônio que age na reabsorção óssea, ela ativa os receptores adrenérgicos β-2 nos osteoblastos através do sistema nervoso simpático e diminui a diferenciação e ativação dos osteoblastos enquanto aumenta a reabsorção óssea (CHAUVEAU et al., 2008).

O sistema imune tem papel de relevância na atividade osteoclástica da osteoporose (TAKAYANAGI, 2007). A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que tem propriedades estimuladoras da osteoclastogênese, o processo de diferenciação de osteoclastos por meio de IL-6 ocorre porque essa citocina induz a expressão do receptor ativador do ligante NF-jB (RANKL) na superfície de osteoblastos (PALMQVIST et al., 2002). O aumento de IL-6 foi associado com a presença de osteoporose em mulheres com deficiência de estrogênio, pois esse hormônio ativa uma cascata de sinalização de citocinas (SCHEIDT-NAVE et al., 2001). Já a IL-33 é conhecida por sua função pró-inflamatória (AREND et al., 2008; SCHMITZ et al., 2005), e age como uma potente inibidora da osteoclastogênese, reduzindo a expressão do gene dependente de Nfatc1 no precursor de osteoclastos mononucleares (KELLER et al., 2012; SCHULZE et al., 2011).

Ainda a IL-17 parece ter papel importante na remodelação óssea (DAVID; SCHETT, 2010; MCLEAN, 2009). A IL-17, por meio de uma regulação positiva de RANKL em osteoblasto e fibroblastos sinoviais, estimula a osteoclastogênese (KOTAKE et al., 1999), e

no osteoblasto, especificamente a IL-17A, parece inibir a diferenciação destas células por meio da regulação da via de sinalização de Wnt (SHAW; MAEDA; GRAVALLESE, 2016). A IL-22 e IL-23 têm sido estudadas na diferenciação e manutenção do perfil Th17 (TALAAT et al., 2015), entretanto não foi encontrado descrito o papel destas citocina na osteoporose.

As metaloproteinases de matriz têm sido estudadas na osteoporose. Estudos mostram que as MMPs são responsáveis pela degradação da matriz óssea, resultando em perda óssea (JONITZ-HEINCKE et al., 2016). A MMP-3 produzida pelo osteoblasto estimula o osteoclasto a degradar a matriz óssea mineralizada (BRECKON et al., 1999).

Com o aumento da expectativa de vida, doenças associadas com a mudança hormonal, como a osteoporose, estão aumentando em quantidades consideráveis, por isso, a importância do foco em estudos com a finalidade de tornar esta interação mais clara. Este estudo tem como objetivo associar níveis hormonais e de citocinas em pacientes com fraturas por osteoporose e pacientes do grupo controle.

2. Materiais e métodos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de ética da Universidade de Uberaba com protocolo de número: 51827515.4.0000.5145 (Anexo2).

2.1. Grupo de Estudo

Foram coletadas amostras de sangue de 30 pacientes idosos, com fratura atribuída à osteoporose (T-score ≤ -2,5) (grupo com osteoporose) e 30 amostras de sangue de pacientes jovens que tiveram fraturas decorrentes de acidentes de alto impacto (grupo controle). A coleta do material foi realizada na disciplina de ortopedia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e no Hospital Universitário Mário Palmério. Foram excluídos os pacientes com outras doenças ósseas, com fraturas não causadas por osteoporose, pacientes imunossuprimidos, com neoplasias malignas ou alterações hepáticas e que não concordaram participar da pesquisa. O soro coletado desses pacientes foi utilizado para dosagem hormonal e de citocinas.

2.2. Coleta de sangue

A coleta de sangue venoso foi realizada sempre no período matutino, um dia após a cirurgia de reconstrução óssea indicada pelo médico ortopedista. A amostra de sangue foi obtida por punção venosa, com a utilização de quatro tubos de coleta a vácuo contendo ativador de coágulo e gel separador. Após 30 minutos da coleta foi feita a centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos para obtenção de soro, sendo que, quatro tubos contendo 1 mL de soro cada foram encaminhados ao laboratório Hermes Pardini para dosagem hormonal e 1 tubo foi imediatamente armazenado no freezer -70°C para posterior dosagem das citocinas pela técnica do ELISA.

2.3. Análise hormonal

Após a centrifugação das amostras de sangue coletadas, quatro tubos de soro foram encaminhados ao laboratório Hermes Pardini, para análise hormonal. Foram realizadas dosagem de 1,25-hidroxivitamina D (Kit Diasorin), Calcitonina (Kit Siemens), Testosterona, Estradiol e Paratormônio (Kit Beckman Coulter) pela técnica de quimiluminescência, uma reação química, que ao se processar gera energia luminosa. Durante a reação, os reagentes se transformam em estados intermediários eletronicamente excitados, e ao passarem para um estado de menor excitação, liberam a energia absorvida na forma de luz.

2.4. Análise de citocinas – ELISA

Placas de poliestireno de alta afinidade (Costar, Half Area) foram sensibilizadas com 50μL de solução de anticorpos monoclonais anti-IL-17A, IL-23 (2μg/mL, Mabtech AB – Stockholm, SW), IL-17R, IL-22, IL-6 e leptina (4μg/mL, R&D Systems), IL-33 e MMP3 (0,8μg/mL, R&D Systems) diluídos em tampão PBS pH 7,2 e incubadas por 18 horas ("overnight") a 4ºC. Após este período, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS acrescido de Tween 20 (Sigma) e incubadas com 100μL de solução de PBS contendo 1% de albumina bovina – BSA (Sigma), para o bloqueio dos sítios ativos, por 18 horas ("overnight") a 4ºC. Após, foram lavadas quatro vezes com PBS-Tween 20. Passou-se então à adição de 50 μL do soro, diluídos em 1:2 (IL-17A, IL-23, IL-17R, IL-22, IL-6 e IL-33) e em 1:40 (MMP-3 e leptina) em BS-BSA 2%. Incubaram-se as placas à temperatura de 4ºC por 18 horas ("overnight"). As placas foram lavadas novamente por 4 vezes com PBS-Tween 20 e em seguida incubadas a 37ºC com 50μL de solução do respectivo anticorpo monoclonal conjugado à biotina anti-IL-17A (500ng/mL, Mabtech AB – Stockholm, SW), IL-23 (1μg/mL, Mabtech AB – Stockholm, SW), IL-17R, IL-22, IL-6 e IL-33 (200ng/mL, R&D Systems), MMP-3 (150ng/mL, R&D Systems) e leptina (25ng/mL, R&D Systems). Após duas horas as placas foram lavadas e novamente incubadas por duas horas com 50μL estreptoavidina conjugada à fosfatase alcalina (Sigma) diluída 1:250 em PBS-BSA 1%. Em seguida a atividade enzimática foi determinada pela adição de 50μL por poço de tampão tetrametilbenzidina-TMB (BD Biosciences). A absorbância determinada em leitor de microplacas (BIORAD 3550 MICROPLATE READER) com filtro de 450nm. Os resultados foram expressos em pg/mL, obtidos por regressão linear a partir de uma curva padrão estabelecida com concentrações conhecidas de cada uma das citocinas, metaloproteinase e leptina recombinantes.

2.5.Análise estatística

Os dados foram inseridos em uma planilha de dados no programa MS-Excel (Microsoft) e analisados pelo programa de estatística *Statview*. Os resultados que apresentaram distribuição não normal foram analisados com métodos não paramétricos. Para análise de variáveis comparando-se dois grupos, aplicou-se o teste Mann Whitney. Foi utilizado teste de *correlação de Spearman* para a correlacionar os níveis citocinas, vitamina D e hormônios. Foi considerado significante quando o valor de $p < 0,05$.

3. Resultados

No presente estudo, foi realizada a dosagem hormonal de 60 pacientes, sendo 30 de pacientes com osteoporose e 30 do grupo controle.

A média de idade dos pacientes foi de 58,8 ± 22,61 anos, sendo, a idade mínima do grupo de pacientes com osteoporose de 60 anos e a máxima de 98 anos (Tabela 1) e do grupo controle, a idade mínima foi de 18 anos e a máxima de 58 anos. No grupo de pacientes com osteoporose, a média de idade do gênero feminino foi de 80,05 ± 9,47 anos e do gênero masculino foi de 74,9 ± 9,18 anos. E no grupo controle, a média da idade gênero feminino foi de 39,5 ± 15,85 anos e gênero masculino foi de 39,6 ± 13,19 anos.

	Média idade (anos)	Número de pacientes (n)	Idade mínima (anos)	Idade máxima (anos)
Controle feminino	39,5	08	18	58
Controle masculino	39,6	22	19	58
Osteoporose feminino	80,05	18	64	98
Osteoporose masculino	74,9	12	60	88
Total	58,8	60	18	98

Tabela 1: Distribuição da média de idade dos pacientes (mínima e máxima) em números absolutos, de acordo com o gênero feminino e masculino do grupo controle e grupo com osteoporose.

Todas as análises foram feitas comparando gênero, grupo de pacientes com osteoporose e grupo controle.

Os níveis séricos de vitamina D foram significativamente maiores no gênero feminino do grupo controle quando comparados com gênero masculino do grupo controle (Mann Whitney; p=0.0169). Ao comparar os níveis séricos de vitamina D entre os dois grupos (controle e osteoporose) observou-se níveis significativamente maiores no gênero feminino do grupo controle, quando comparadas com o gênero feminino do grupo com osteoporose (p=0.0275). Não houve diferença significativa entre os gêneros masculinos e femininos do grupo com osteoporose (Figura 1A).

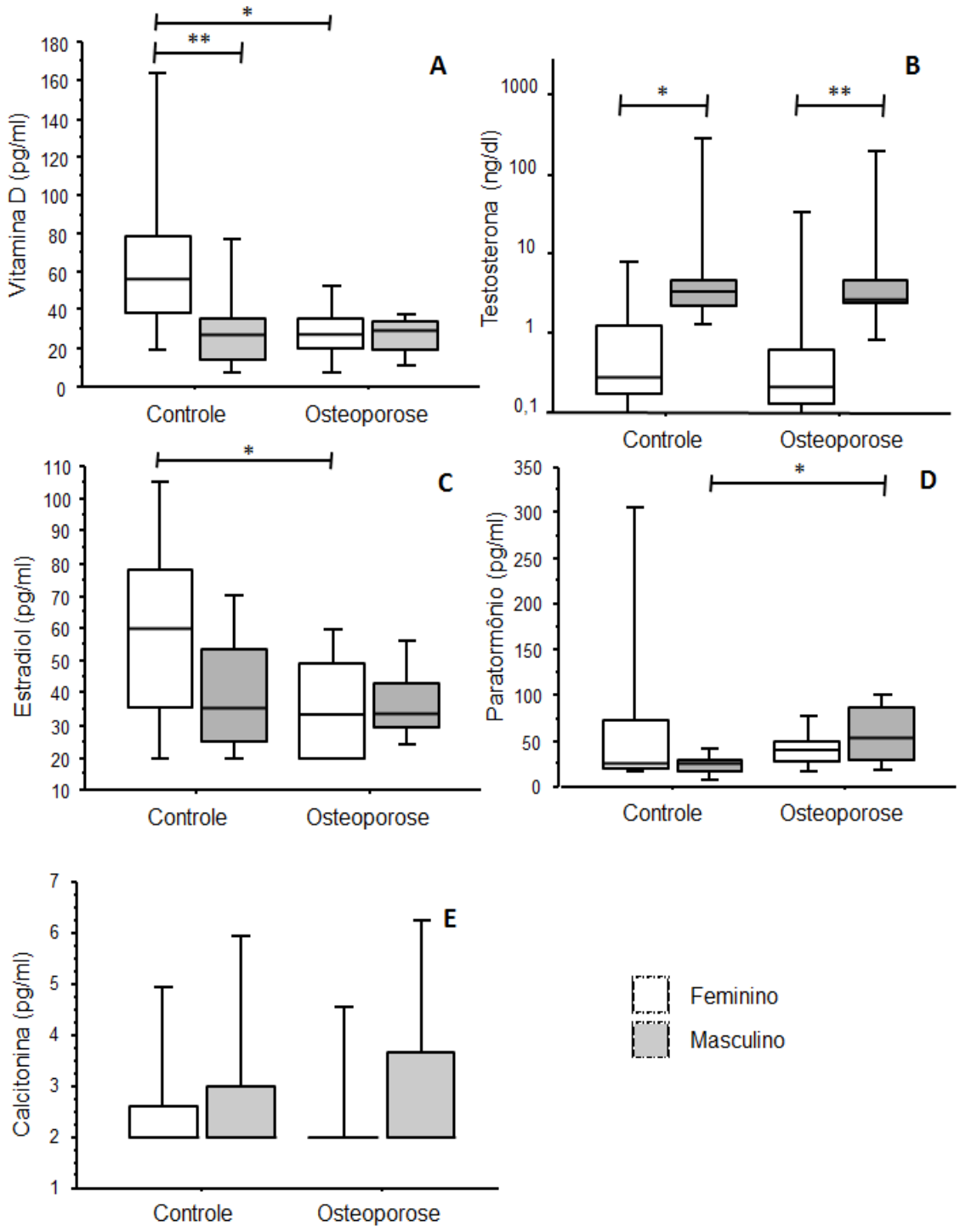

Figura 1: Dosagem hormonal por quimioluminescência de pacientes do sexo feminino e masculino diagnosticados com osteoporose e pacientes do grupo controle. A, Vitamina D1,25, sendo *p=0,0169 e **p=0,0275; B, Testosterona, sendo *p=0,0023 e **p=0,0046; C, Estradiol, sendo p=0.047; D, Paratormônio, sendo p=0.0065; E, Calcitonina (Mann Whitney).

Na análise de testosterona livre, foram observados níveis significativamente maiores no gênero masculino quando comparado com gênero feminino em ambos os grupos, controle

e osteoporose (Mann Whitney; *p=0.0023 e **p=0.0046). Não houve diferença significativa nos níveis de testosterona livre entre o gênero masculino do grupo controle e grupo com osteoporose (Figura 1B).

Os níveis de estradiol foram significativamente menores nas mulheres grupo com osteoporose comparados com o grupo controle (Mann Whitney; p=0.047). Não houve diferença significativa nos níveis de estradiol, entre homens e mulheres do grupo controle e grupo com osteoporose (Figura 1C).

Os níveis de paratormônios foram significativamente maiores nos homens com osteoporose quando comparados com o grupo controle (Mann Whitney; p=0.0065). Não houve diferença significativa entre as mulheres do grupo controle com as mulheres do grupo com osteoporose. Ainda não foi observado diferença significativa, nos níveis de paratormônios, quando comparado os gêneros masculino e feminino em ambos os grupos, controle e osteoporose. (Figura 1D).

Não houve diferença significativa nos níveis de calcitonina entre o grupo controle e o grupo com osteoporose, independentemente do gênero. Também não houve diferença significativa quando comparado homens e mulheres independentes dos grupos, controle e osteoporose (Figura 1E).

Os níveis séricos de citocinas foram realizados por ELISA, e os níveis de IL-6 foram significativamente maiores nas mulheres com osteoporose, quando comparados com aquelas do grupo controle (Mann Whitney; p=0,045). Entretanto, não houve diferença significativa nos homens do grupo controle comparados com os homens do grupo com osteoporose. Ainda, os níveis de IL-6 foram significativamente maiores nos homens do grupo controle quando comparados com as mulheres deste mesmo grupo (Mann Whitney; p=0.0199). Não houve diferença significativa entre o gênero masculino e feminino no grupo com osteoporose (Figura 2A).

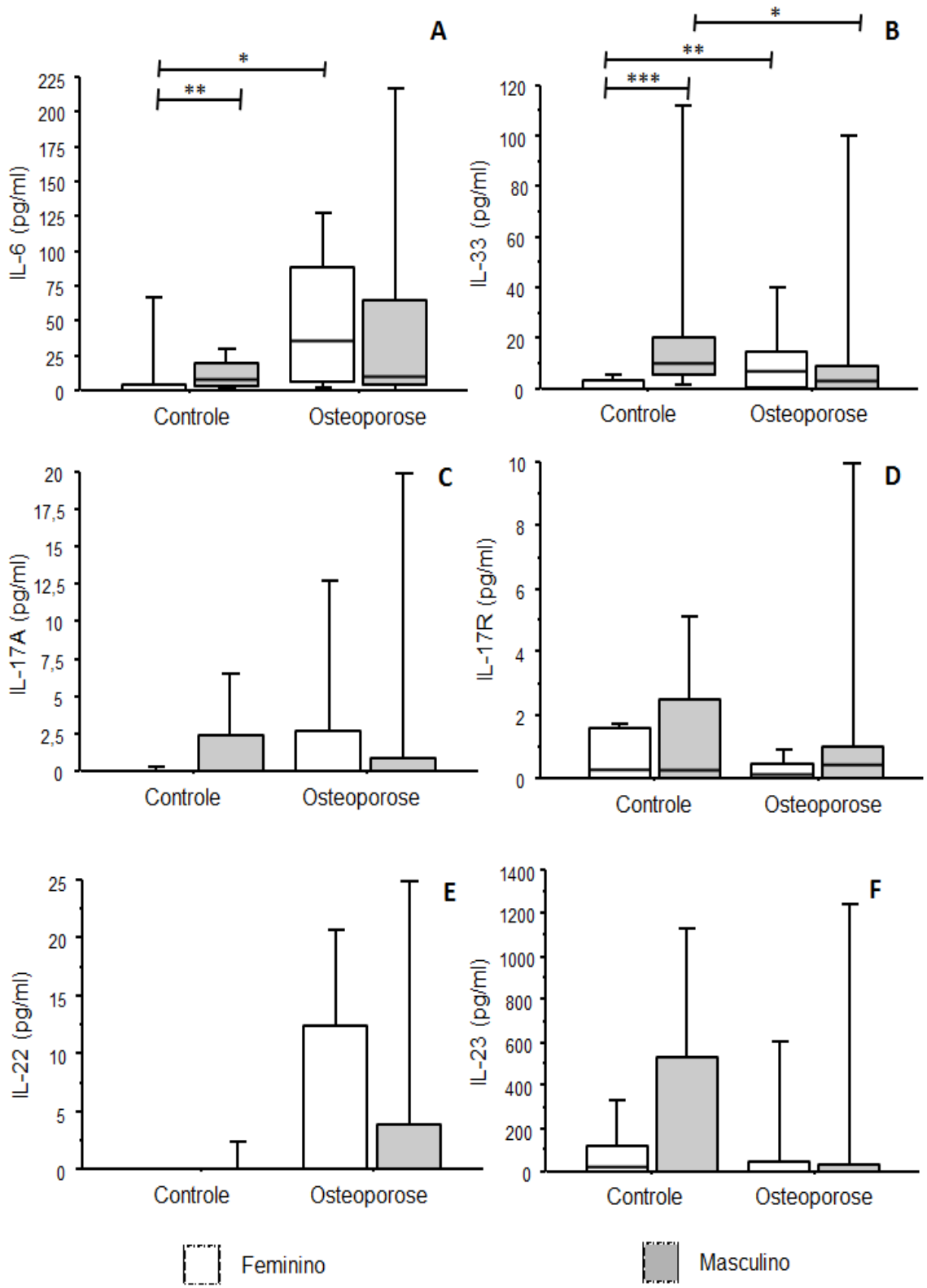

Figura 2: Dosagem de citocinas pelo método de ELISA do soro de pacientes do sexo feminino e masculino diagnosticados com osteoporose e pacientes do grupo controle. A, IL-6, sendo *p=0,0045 e **p=0,0199; B, IL-33, sendo *p=0,0228, **p=0,0121 e ***p=0,0010; C, IL-17A; D, IL-17R; E, IL-22; F, IL-23 (Mann Whitney).

Os níveis de IL-33, foram significativamente maiores nos homens do grupo controle comparados com os homens do grupo com osteoporose (Mann Whitney; p=0.0228). De maneira antagônica, as mulheres do grupo com osteoporose apresentaram níveis significativamente maiores quando comparadas com aquelas do grupo controle (p=0.0121). Ainda, os níveis de IL-33 no gênero masculino foram significativamente maiores no gênero feminino do grupo controle (Mann Whitney; p=0.001), essa diferença não foi observada no grupo com osteoporose. (Figura 2B).

Os pacientes agrupados por gênero ou pela existência ou não de osteoporose como analisados acima não apresentaram diferenças significativas nos níveis séricos de IL-17A, IL-17R, IL-22 e IL-23 (Figura 2C; 2D; 2E e 2F) dados não mostrados.

Os níveis séricos de MMP-3 foram significativamente maiores nos homens com osteoporose quando comparados com aqueles do grupo controle (Mann Whitney; p=0.0379). Não houve diferença significativa entre as mulheres do grupo controle e do grupo com osteoporose. Ainda, os níveis de MMP-3 nos homens com osteoporose foram significativamente maiores do que nas mulheres com osteoporose (p=0.0116) (Figura 3A).

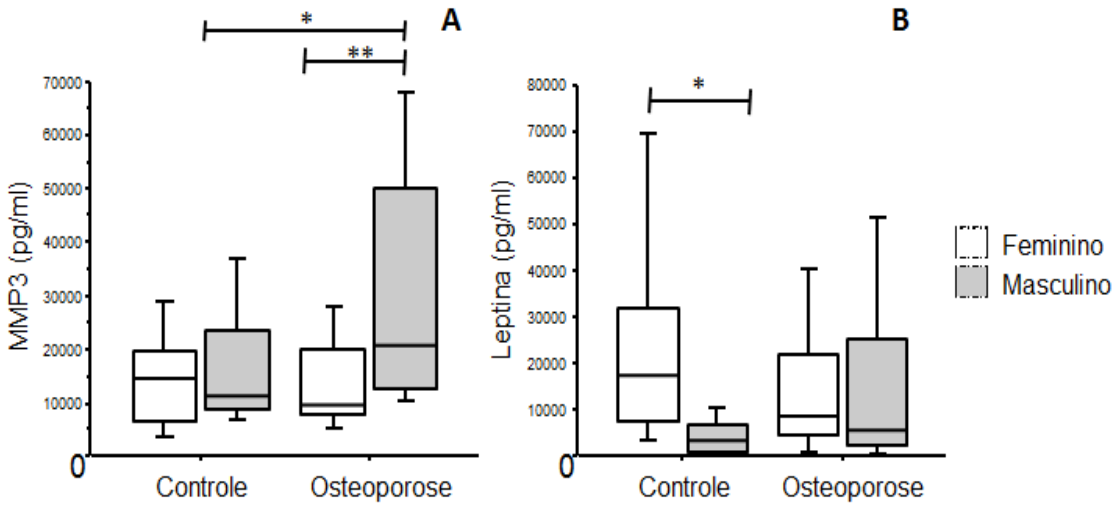

Figura 3: Dosagem de metaloproteinase e leptina pelo método de ELISA do soro de pacientes do sexo feminino e masculino diagnosticados com osteoporose e pacientes do grupo controle. A, MMP-3, sendo *p=0,0379 e **p=0,0116; B, Leptina, sendo *p=0,0056 (Mann Whitney).

Os níveis de leptina foram significativamente maiores nas mulheres do grupo controle quando comparados com os homens deste grupo (Mann Whitney; p=0.0056). Não houve diferença significativa nos níveis de leptina quando comparados grupo controle e grupo com osteoporose independente do gênero, assim como, não houve diferença significativa quando comparados os gêneros masculino e feminino no grupo com osteoporose (Figura 3B).

Foram realizados testes de correlação entre os níveis de estradiol e os níveis de IL-6, porém não houve correlação significativa. Da mesma forma, não houve correlação significativa entre os níveis paratormônio e IL-33. Ainda, ao correlacionar os níveis de estradiol com a IL-17, não houve correlação significativa. E da mesma forma, não houve correlação significativa entre os níveis paratormônio e IL-23 e IL-6.

4. Discussão e conclusão

A osteoporose é causada por um desequilíbrio da remodelação óssea, que pode ser causada por fatores hormonais, além disso, estudos mais recentes mostram que fatores imunológicos também influenciam na fisiopatogênese da doença. Neste estudo, foi avaliada a presença de hormônios, vitamina D, citocinas e MMP-3 em pacientes com osteoporose comparando também a diferença entre os gêneros.

No presente estudo, diferenças significativas foram encontradas nas dosagens de vitamina D, estradiol, testosterona, paratormônio, IL-6, IL-33, MMP-3 e leptina. Mulheres com osteoporose e homens jovens apresentaram níveis significativamente menores de vitamina D comparados com mulheres jovens. Estudos mostram que a deficiência de vitamina D está associada com fraqueza muscular, perda óssea, quedas e fraturas (BISCHOFF-FERRARI et al., 2003). Semelhante à literatura, nossos dados sugerem que a diminuição de vitamina D em mulheres de maior idade pode contribuir na predisposição à osteoporose. Esse estudo mostra também que níveis reduzidos de estradiol estão relacionados com o aparecimento da osteoporose em mulheres a partir de 60 anos, condizente com outros estudos que mostram que a saúde óssea está inversamente relacionada com níveis reduzidos de estradiol (GUI et al., 2016; KOUSTENI et al., 2001; KOUSTENI et al., 2003). A deficiência de estradiol também foi associada com a presença de osteoporose em homens com mais de 64 anos, (FINK et al., 2006), embora nos resultados obtidos não tenha sido encontrada essa associação.

A remodelação óssea também tem sido estimulada pelo PTH, um estudo feito com mulheres idosas mostra que houve um aumento significativo de PTH em mulheres com osteoporose (AL-DAGHRI et al., 2017). Em nosso estudo, níveis significativamente maiores de PTH foram encontrados em homens com osteoporose, mostrando que a presença do paratormônio contribui para o aparecimento da doença em homens com mais de 60 anos, ao contrário das mulheres que não tiveram diferenças nos níveis de PTH.

A testosterona não foi um fator limitante para o aparecimento da doença nos pacientes de nosso estudo, esse hormônio parece estar mais relacionado com as diferenças entre os gêneros masculino e feminino. Mas, estudo mostra que a deficiência de testosterona em homens com mais de 64 anos está associada com a rápida perda óssea e consequentemente com o desenvolvimento de osteoporose (FINK et al., 2006). Embora dados da literatura mostrem que a calcitonina age inibindo a reabsorção óssea (MARTIN; SIMS, 2005), não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de calcitonina entre os grupos e gêneros estudados.

A leptina foi associada com ativação de osteoclastos elevando a reabsorção óssea e diminuindo a diferenciação de osteoblastos (HE; JIANG; DAI, 2011; MAKKI; FROGUEL; WOLOWCZUK, 2013). Ao contrário do que foi mostrado na literatura, a leptina não está associada com a osteoporose nos pacientes do nosso estudo, níveis baixos de leptina foram encontrados apenas em homens jovens comparados com mulheres do mesmo grupo.

Entre as citocinas, a IL-6 está relacionada com a presença de osteoporose, pois é um regulador positivo na osteoclastogênese (O'BRIEN et al., 1999; YOSHITAKE et al., 2008). Semelhante ao nosso estudo, níveis elevados de IL-6 foram encontrados em mulheres com osteoporose, sugerindo que a presença desta citocina torna mulheres com mais de 60 anos mais propensas a desenvolver a doença, embora em homens essa diferença não foi encontrada.

Em nosso estudo níveis significativamente menores IL-33 foram encontrados em homens com osteoporose. Acreditamos que esta citocina, possa estar exercendo um papel protetor na osteoporose nos homens. Esses mesmos resultados condizem com a literatura que mostram que a IL-33 é forte supressora da diferenciação em osteoclastos e inibindo a reabsorção óssea (FUJII et al., 2012; SALEH et al., 2011).

Algumas metaloproteinases parecem ter um papel importante no início da reabsorção óssea. A MMP-3 tem sido estudada em modelo *in vitro* com cultura de células derivadas de pacientes com osteoartrite que mostra uma produção considerável de citocinas pro-inflamatórias e de MMP-3 que induz a degradação de matriz óssea (BONDESON et al., 2006; BRECKON et al., 1999; HUANG et al., 2004). Nossos resultados confirmam a participação da MMP-3 na remodelação óssea, níveis elevados de MMP-3 foram encontrados em homens com osteoporose comparados com mulheres do mesmo grupo e homens jovens, sugerindo sua participação na degradação de matriz óssea maior nos homens.

Apesar da IL-17 estar associada com a inibição da diferenciação de osteoblastos e conhecida por estimular a osteoclastogênese (DESELM et al., 2012; TYAGI et al., 2012), não foram encontradas diferenças significativas de IL-17A e IL-17R entre os grupos estudados. Assim como a IL-22 e IL-23, não houve associação com a osteoporose em nosso estudo, e nenhum trabalho foi encontrado relacionando essas citocinas com fatores associados à diferenciação óssea.

Então, nosso estudo sugere que o efeito protetor da IL-33 em homens está diminuído e a presença do PTH e da MMP-3 estimulam a osteoclastogênese, enquanto em mulheres há o aumento de IL-6 que está associada com a estimulação do processo de reabsorção óssea, junto com a diminuição da vitamina D e do estradiol.

Agradecimentos: Este estudo teve apoio das instituições Universidade de Uberaba, Universidade Federal do Triângulo Mineiro e Centro de Educação Profissional, além do suporte financeiro da FAPEMIG, CAPES e CNPq.

Considerações Finais

Existem diferenças hormonais entre os gêneros masculino e feminino.

Mulheres com osteoporose apresentaram níveis significativamente menores de estradiol e vitamina D comparadas com mulheres jovens sem osteoporose, já homens com osteoporose apresentaram níveis significativamente maiores de PTH comparados com homens sem osteoporose, isso mostra a importância dos hormônios e da vitamina D no desenvolvimento da doença.

Já a testosterona, apesar de níveis menores estarem associados com a osteoporose, nosso estudo não demonstra uma associação com a doença, há uma diferença significativa apenas em relação ao gênero, independente da idade e da presença da osteoporose.

Em relação às citocinas, um aumento significativo de IL-6 em mulheres com osteoporose e uma diminuição de IL-33 em homens com osteoporose mostraram uma relação destas com o desenvolvimento da doença. Além da IL-33, um aumento significativo de MMP-3 em homens com osteoporose também foi encontrado e associado à doença.

As outras citocinas, IL-17A, IL-17R, IL-22 e IL-23, a calcitonina e a leptina não tiveram diferenças significativas entre pacientes com e sem osteoporose.

Referências Bibliográficas

ADAMS, J. S. Vitamin D as a defensin. **J Musculoskelet Neuronal Interact,** v. 6, n. 4, p. 344-6, Oct-Dec 2006.

AL-DAGHRI, N. M. et al. Inflammation as a contributing factor among postmenopausal Saudi women with osteoporosis. **Medicine (Baltimore),** v. 96, n. 4, p. e5780, Jan 2017.

AREND, W. P.; PALMER, G.; GABAY, C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. **Immunol Rev,** v. 223, p. 20-38, Jun 2008.

ARRON, J. R.; CHOI, Y. Bone versus immune system. **Nature,** v. 408, n. 6812, p. 535-6, Nov 30 2000.

Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. **World Health Organ Tech Rep Ser,** v. 843, p. 1-129, 1994.

BERNSTEIN, C. N.; LESLIE, W. D. The pathophysiology of bone disease in gastrointestinal disease. **Eur J Gastroenterol Hepatol,** v. 15, n. 8, p. 857-64, Aug 2003.

BHUKHAI, K. et al. A phytoestrogen diarylheptanoid mediates estrogen receptor/Akt/glycogen synthase kinase 3beta protein-dependent activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. **J Biol Chem,** v. 287, n. 43, p. 36168-78, Oct 19 2012.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. **J Periodontol,** v. 64, n. 5 Suppl, p. 474-84, May 1993.

BISCHOFF-FERRARI, H. A. et al. [Effect of vitamin D on muscle strength and relevance in regard to osteoporosis prevention]. **Z Rheumatol,** v. 62, n. 6, p. 518-21, Dec 2003.

BONDESON, J. et al. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. **Arthritis Res Ther,** v. 8, n. 6, p. R187, 2006.

BRECKON, J. J. et al. Stromelysin (MMP-3) synthesis is up-regulated in estrogen-deficient mouse osteoblasts in vivo and in vitro. **J Bone Miner Res,** v. 14, n. 11, p. 1880-90, Nov 1999.

BURGER, H. G. Physiological principles of endocrine replacement: estrogen. **Horm Res,** v. 56 Suppl 1, p. 82-5, 2001.

CENCI, S. et al. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. **J Clin Invest,** v. 106, n. 10, p. 1229-37, Nov 2000.

CHACKERIAN, A. A. et al. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. **J Immunol,** v. 179, n. 4, p. 2551-5, Aug 15 2007.

CHARLES, J. F. et al. The collection of NFATc1-dependent transcripts in the osteoclast includes numerous genes non-essential to physiologic bone resorption. **Bone,** v. 51, n. 5, p. 902-12, Nov 2012.

CHAUVEAU, C. et al. Leptin receptors and beta2-adrenergic receptor mRNA expression in brain injury-related heterotopic ossification. **J Recept Signal Transduct Res,** v. 28, n. 4, p. 347-59, 2008.

CHEN, H. et al. A new regulator of osteoclastogenesis: estrogen response element-binding protein in bone. **J Bone Miner Res,** v. 26, n. 10, p. 2537-47, Oct 2011.

CLAASSEN, H. et al. Influence of 17beta-estradiol and insulin on type II collagen and protein synthesis of articular chondrocytes. **Bone,** v. 39, n. 2, p. 310-7, Aug 2006.

COMPSTON, J. E. Prevention and management of osteoporosis. Current trends and future prospects. **Drugs,** v. 53, n. 5, p. 727-35, May 1997.

DALLE CARBONARE, L. et al. Circulating mesenchymal stem cells with abnormal osteogenic differentiation in patients with osteoporosis. **Arthritis Rheum,** v. 60, n. 11, p. 3356-65, Nov 2009.

DAMIEN, E.; PRICE, J. S.; LANYON, L. E. Mechanical strain stimulates osteoblast proliferation through the estrogen receptor in males as well as females. **J Bone Miner Res,** v. 15, n. 11, p. 2169-77, Nov 2000.

DAVID, J. P.; SCHETT, G. TNF and bone. **Curr Dir Autoimmun,** v. 11, p. 135-44, 2010.

DEAL, C. Bone loss in rheumatoid arthritis: systemic, periarticular, and focal. **Curr Rheumatol Rep,** v. 14, n. 3, p. 231-7, Jun 2012.

DESELM, C. J. et al. IL-17 mediates estrogen-deficient osteoporosis in an Act1-dependent manner. **J Cell Biochem,** v. 113, n. 9, p. 2895-902, Sep 2012.

DOBBS, M. B.; BUCKWALTER, J.; SALTZMAN, C. Osteoporosis: the increasing role of the orthopaedist. **Iowa Orthop J,** v. 19, p. 43-52, 1999.

ENGSIG, M. T. et al. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. **J Cell Biol,** v. 151, n. 4, p. 879-89, Nov 13 2000.

FAN, J. Z. et al. Estrogen improves the proliferation and differentiation of hBMSCs derived from postmenopausal osteoporosis through notch signaling pathway. **Mol Cell Biochem,** v. 392, n. 1-2, p. 85-93, Jul 2014.

FAWELL, S. E. et al. Inhibition of estrogen receptor-DNA binding by the "pure" antiestrogen ICI 164,384 appears to be mediated by impaired receptor dimerization. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 87, n. 17, p. 6883-7, Sep 1990.

FINK, H. A. et al. Association of testosterone and estradiol deficiency with osteoporosis and rapid bone loss in older men. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 91, n. 10, p. 3908-15, Oct 2006.

FORSBLAD D'ELIA, H. et al. Radiographic joint destruction in postmenopausal rheumatoid arthritis is strongly associated with generalised osteoporosis. **Ann Rheum Dis,** v. 62, n. 7, p. 617-23, Jul 2003.

FUJII, T. et al. IL-4 inhibits TNF-alpha-mediated osteoclast formation by inhibition of RANKL expression in TNF-alpha-activated stromal cells and direct inhibition of TNF-alpha-activated osteoclast precursors via a T-cell-independent mechanism in vivo. **Bone,** v. 51, n. 4, p. 771-80, Oct 2012.

GROSS, J.; LAPIERE, C. M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 48, p. 1014-22, Jun 15 1962.

GUI, Y. et al. Multifarious effects of 17-beta-estradiol on apolipoprotein E receptors gene expression during osteoblast differentiation in vitro. **Biosci Trends,** v. 10, n. 1, p. 54-66, Feb 2016.

HALL, R. et al. Stromelysin-1 (MMP-3) in forming enamel and predentine in rat incisor-coordinated distribution with proteoglycans suggests a functional role. **Histochem J,** v. 31, n. 12, p. 761-70, Dec 1999.

HALLBERG, L. et al. Calcium and iron absorption: mechanism of action and nutritional importance. **Eur J Clin Nutr,** v. 46, n. 5, p. 317-27, May 1992.

HE, J. Y.; JIANG, L. S.; DAI, L. Y. The roles of the sympathetic nervous system in osteoporotic diseases: A review of experimental and clinical studies. **Ageing Res Rev,** v. 10, n. 2, p. 253-63, Apr 2011.

HECKT, T. et al. Parathyroid hormone induces expression and proteolytic processing of Rankl in primary murine osteoblasts. **Bone,** v. 92, p. 85-93, Aug 20 2016.

HILL, P. A. et al. The effects of selective inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP-1 in isolated osteoclasts. **J Cell Sci,** v. 107 (Pt 11), p. 3055-64, Nov 1994.

HOEPPNER, L. H.; SECRETO, F. J.; WESTENDORF, J. J. Wnt signaling as a therapeutic target for bone diseases. **Expert Opin Ther Targets,** v. 13, n. 4, p. 485-96, Apr 2009.

HOFBAUER, L. C.; KUHNE, C. A.; VIERECK, V. The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. **J Musculoskelet Neuronal Interact,** v. 4, n. 3, p. 268-75, Sep 2004.

HONG, L.; COLPAN, A.; PEPTAN, I. A. Modulations of 17-beta estradiol on osteogenic and adipogenic differentiations of human mesenchymal stem cells. **Tissue Eng,** v. 12, n. 10, p. 2747-53, Oct 2006.

HU, S. K.; MITCHO, Y. L.; RATH, N. C. Effect of estradiol on interleukin 1 synthesis by macrophages. **Int J Immunopharmacol,** v. 10, n. 3, p. 247-52, 1988.

HUANG, W. et al. Osteopontin is a negative regulator of proliferation and differentiation in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells. **Bone,** v. 34, n. 5, p. 799-808, May 2004.

JABBAR, S. et al. Osteoprotegerin, RANKL and bone turnover in postmenopausal osteoporosis. **J Clin Pathol,** v. 64, n. 4, p. 354-7, Apr 2011.

JONITZ-HEINCKE, A. et al. Contribution of human osteoblasts and macrophages to bone matrix degradation and proinflammatory cytokine release after exposure to abrasive endoprosthetic wear particles. **Mol Med Rep,** v. 14, n. 2, p. 1491-500, Aug 2016.

KASRAIE, S.; NIEBUHR, M.; WERFEL, T. Interleukin (IL)-31 induces pro-inflammatory cytokines in human monocytes and macrophages following stimulation with staphylococcal exotoxins. **Allergy,** v. 65, n. 6, p. 712-21, Jun 01 2010.

KELLER, J. et al. Transgenic over-expression of interleukin-33 in osteoblasts results in decreased osteoclastogenesis. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 417, n. 1, p. 217-22, Jan 6 2012.

KHOSLA, S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. **Endocrinology,** v. 142, n. 12, p. 5050-5, Dec 2001.

KHOSLA, S.; OURSLER, M. J.; MONROE, D. G. Estrogen and the skeleton. **Trends Endocrinol Metab,** v. 23, n. 11, p. 576-81, Nov 2012.

KIM, J. H.; KIM, N. Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation. **J Bone Metab,** v. 21, n. 4, p. 233-41, Nov 2014.

KOLLMANN, K. et al. Decreased bone formation and increased osteoclastogenesis cause bone loss in mucolipidosis II. **EMBO Mol Med,** v. 5, n. 12, p. 1871-86, Dec 2013.

KOTAKE, S. et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. **J Clin Invest,** v. 103, n. 9, p. 1345-52, May 1999.

KOUSTENI, S. et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. **Cell,** v. 104, n. 5, p. 719-30, Mar 9 2001.

KOUSTENI, S. et al. Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. **J Clin Invest,** v. 111, n. 11, p. 1651-64, Jun 2003.

KUNG, A. W.; HUANG, Q. Y. Genetic and environmental determinants of osteoporosis. **J Musculoskelet Neuronal Interact,** v. 7, n. 1, p. 26-32, Jan-Mar 2007.

KUROWSKA-STOLARSKA, M. et al. IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. **J Immunol,** v. 181, n. 7, p. 4780-90, Oct 1 2008.

LEE, Y. The role of interleukin-17 in bone metabolism and inflammatory skeletal diseases. **BMB Rep,** v. 46, n. 10, p. 479-83, Oct 2013.

MAKKI, K.; FROGUEL, P.; WOLOWCZUK, I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. **ISRN Inflamm,** v. 2013, p. 139239, Dec 22 2013.

MARTIN, T. J.; SIMS, N. A. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. **Trends Mol Med,** v. 11, n. 2, p. 76-81, Feb 2005.

MATSUMOTO, A. M. Andropause: clinical implications of the decline in serum testosterone levels with aging in men. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci,** v. 57, n. 2, p. M76-99, Feb 2002.

MCLEAN, R. R. Proinflammatory cytokines and osteoporosis. **Curr Osteoporos Rep,** v. 7, n. 4, p. 134-9, Dec 2009.

MORAES, L. F. et al. Expenditures on the treatment of osteoporosis in the elderly in Brazil (2008 - 2010): analysis of associated factors. **Rev Bras Epidemiol,** v. 17, n. 3, p. 719-34, Jul-Sep 2014.

O'BRIEN, C. A. et al. STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF-kappaB ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or parathyroid hormone. **J Biol Chem,** v. 274, n. 27, p. 19301-8, Jul 2 1999.

PALMQVIST, P. et al. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. **J Immunol,** v. 169, n. 6, p. 3353-62, Sep 15 2002.

PIETSCHMANN, P. et al. Osteoporosis: an age-related and gender-specific disease--a mini-review. **Gerontology,** v. 55, n. 1, p. 3-12, 2009.

PINHEIRO MDE, M.; EIS, S. R. Epidemiology of osteoporotic fractures in Brazil: what we have and what we need. **Arq Bras Endocrinol Metabol,** v. 54, n. 2, p. 164-70, Mar 2010.

PINHEIRO, M. M. et al. Clinical risk factors for osteoporotic fractures in Brazilian women and men: the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). **Osteoporos Int,** v. 20, n. 3, p. 399-408, Mar 2009.

RAUNER, M.; SIPOS, W.; PIETSCHMANN, P. Osteoimmunology. **Int Arch Allergy Immunol,** v. 143, n. 1, p. 31-48, 2007.

RAUNER, M. et al. Advances in osteoimmunology: pathophysiologic concepts and treatment opportunities. **Int Arch Allergy Immunol,** v. 160, n. 2, p. 114-25, 2013.

ROGGIA, C. et al. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 98, n. 24, p. 13960-5, Nov 20 2001.

ROUZI, A. A. et al. Independent predictors of all osteoporosis-related fractures among healthy Saudi postmenopausal women: the CEOR Study. **Bone,** v. 50, n. 3, p. 713-22, Mar 2012.

ROY, B. Biomolecular basis of the role of diabetes mellitus in osteoporosis and bone fractures. **World J Diabetes,** v. 4, n. 4, p. 101-13, Aug 15 2013.

SALEH, H. et al. Interleukin-33, a target of parathyroid hormone and oncostatin m, increases osteoblastic matrix mineral deposition and inhibits osteoclast formation in vitro. **Endocrinology,** v. 152, n. 5, p. 1911-22, May 2011.

SCHEIDT-NAVE, C. et al. Serum interleukin 6 is a major predictor of bone loss in women specific to the first decade past menopause. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 86, n. 5, p. 2032-42, May 2001.

SCHMITZ, J. et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. **Immunity,** v. 23, n. 5, p. 479-90, Nov 2005.

SCHULZE, J. et al. Interleukin-33 is expressed in differentiated osteoblasts and blocks osteoclast formation from bone marrow precursor cells. **J Bone Miner Res,** v. 26, n. 4, p. 704-17, Apr 2011.

SHAW, A. T.; MAEDA, Y.; GRAVALLESE, E. M. IL-17A deficiency promotes periosteal bone formation in a model of inflammatory arthritis. **Arthritis Res Ther,** v. 18, n. 1, p. 104, May 10 2016.

SHEN, Y. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) regulates hematopoiesis and bone formation in vivo. **PLoS One,** v. 5, n. 9, Sep 30 2010.

SIGL, V.; PENNINGER, J. M. RANKL/RANK - from bone physiology to breast cancer. **Cytokine Growth Factor Rev,** v. 25, n. 2, p. 205-14, Apr 2014.

SILVA, B. C.; BILEZIKIAN, J. P. Parathyroid hormone: anabolic and catabolic actions on the skeleton. **Curr Opin Pharmacol,** v. 22, p. 41-50, Jun 2015.

SINIGAGLIA, L. et al. A multicenter cross sectional study on bone mineral density in rheumatoid arthritis. Italian Study Group on Bone Mass in Rheumatoid Arthritis. **J Rheumatol,** v. 27, n. 11, p. 2582-9, Nov 2000.

SIRIS, E. S. et al. Identification and fracture outcomes of undiagnosed low bone mineral density in postmenopausal women: results from the National Osteoporosis Risk Assessment. **JAMA,** v. 286, n. 22, p. 2815-22, Dec 12 2001.

STAZI, A. V.; TRINTI, B. Risk of osteoporosis in endocrine disorders and celiac disease. **Ann Ist Super Sanita,** v. 43, n. 4, p. 430-3, 2007.

TAKAYANAGI, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. **Nat Rev Immunol,** v. 7, n. 4, p. 292-304, Apr 2007.

TALAAT, R. M. et al. Effect of bisphosphonates treatment on cytokine imbalance between TH17 and Treg in osteoporosis. **Inflammopharmacology,** v. 23, n. 2-3, p. 119-25, Jun 2015.

TALWAR, R. M. et al. Effects of estrogen on chondrocyte proliferation and collagen synthesis in skeletally mature articular cartilage. **J Oral Maxillofac Surg,** v. 64, n. 4, p. 600-9, Apr 2006.

TILG, H. et al. Gut, inflammation and osteoporosis: basic and clinical concepts. **Gut,** v. 57, n. 5, p. 684-94, May 2008.

TOWNSEND, M. J. et al. T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. **J Exp Med,** v. 191, n. 6, p. 1069-76, Mar 20 2000.

TRAVISON, T. G. et al. The relative contributions of aging, health, and lifestyle factors to serum testosterone decline in men. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 92, n. 2, p. 549-55, Feb 2007.

TYAGI, A. M. et al. Estrogen deficiency induces the differentiation of IL-17 secreting Th17 cells: a new candidate in the pathogenesis of osteoporosis. **PLoS One,** v. 7, n. 9, p. e44552, 2012.

UCHIBORI, M. et al. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in pigmented villonodular synovitis suggests their potential role for joint destruction. **J Rheumatol,** v. 31, n. 1, p. 110-9, Jan 2004.

UDAGAWA, N. et al. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. **Endocrinology,** v. 141, n. 9, p. 3478-84, Sep 2000.

WANG, C. et al. Application of bone marrow mesenchymal stem cells to the treatment of osteonecrosis of the femoral head. **Int J Clin Exp Med,** v. 8, n. 3, p. 3127-35, 2015.

WANG, Q. et al. Temporal expression of estrogen receptor alpha in rat bone marrow mesenchymal stem cells. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 347, n. 1, p. 117-23, Aug 18 2006.

WEAVER, C. M. et al. Calcium plus vitamin D supplementation and risk of fractures: an updated meta-analysis from the National Osteoporosis Foundation. **Osteoporos Int,** v. 27, n. 1, p. 367-76, Jan 2016.

WEITZMANN, M. N.; PACIFICI, R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. **J Clin Invest,** v. 116, n. 5, p. 1186-94, May 2006.

WIREN, K. M. et al. Osteoblast and osteocyte apoptosis associated with androgen action in bone: requirement of increased Bax/Bcl-2 ratio. **Bone,** v. 38, n. 5, p. 637-51, May 2006.

XIAO, H. et al. Detection of significant pathways in osteoporosis based on graph clustering. **Mol Med Rep,** v. 6, n. 6, p. 1325-32, Dec 2012.

YAGO, T. et al. IL-17 induces osteoclastogenesis from human monocytes alone in the absence of osteoblasts, which is potently inhibited by anti-TNF-alpha antibody: a novel mechanism of osteoclastogenesis by IL-17. **J Cell Biochem,** v. 108, n. 4, p. 947-55, Nov 1 2009.

YOSHITAKE, F. et al. Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF-kappaB signaling pathways. **J Biol Chem,** v. 283, n. 17, p. 11535-40, Apr 25 2008.

YUAN, F. L. et al. Type 17 T-helper cells might be a promising therapeutic target for osteoporosis. **Mol Biol Rep,** v. 39, n. 1, p. 771-4, Jan 2012.

ZAIDI, M. Skeletal remodeling in health and disease. **Nat Med,** v. 13, n. 7, p. 791-801, Jul 2007.

ZHANG, Q. et al. Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors. **Cytokine Growth Factor Rev,** v. 19, n. 5-6, p. 347-56, Oct-Dec 2008.

ZHOU, S. et al. Estrogen modulates estrogen receptor alpha and beta expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice. **J Cell Biochem Suppl,** v. Suppl 36, p. 144-55, 2001.

Anexos:

Anexo 1: Revista escolhida para publicação

BONE

Cell Molecular Biology; Pathophysiology; Treatment

ELSEVIER

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

- **Description** p.1
- **Audience** p.1
- **Impact Factor** p.1
- **Abstracting and Indexing** p.1
- **Editorial Board** p.2
- **Guide for Authors** p.4

ISSN: 8756-3282

DESCRIPTION

BONE is an interdisciplinary forum for the rapid publication of original articles and reviews on basic, translational, and clinical aspects of bone and mineral metabolism. The Journal also encourages submissions related to interactions of bone with other organ systems, including cartilage, endocrine, muscle, fat, neural, vascular, gastrointestinal, hematopoietic, and immune systems. Particular attention is placed on the application of experimental studies to clinical practice.

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy

Bone and Elsevier facilitate the author's response to the NIH Public Access Policy. For more details please see the Guide for authors

AUDIENCE

Bone Specialists, Orthopedists, Oncologists, Radiologists, Endocrinologists, Gynecologists, Rheumatologists, Cell and Molecular Biologists

IMPACT FACTOR

2015: 3.736 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
Bioengineering Abstracts
Elsevier BIOBASE
Current Contents
MEDLINE®
EMBASE
PASCAL/CNRS
Reference Update

Anexo 2: Aprovação do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE UBERABA - UNIUBE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da Osteoimunologia da Osteoporose e sua Relação com Fatores Hormonais

Pesquisador: DENISE BERTULUCCI ROCHA RODRIGUES
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 51827515.4.0000.5145
Instituição Proponente: SOCIEDADE EDUCACIONAL UBERABENSE
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.375.317

Apresentação do Projeto:
Trata-se da segunda apresentação do projeto "Avaliação da Osteoimunologia da Osteoporose e sua Relação com Fatores Hormonais", da profa Denise Bertulucci Rocha Rodrigues, da Universidade de Uberaba. No projeto, pretende-se coletar fragmentos ósseos e sangue de 120 pacientes atendidos no setor de ortopedia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, atendidos devido a fratura, sendo 60 indivíduos com osteoporose e 60 sem osteoporose. Nesse material será avaliado a expressão de vários marcadores moleculares. Não haverá retirada de fragmentos ósseos motivada apenas pela pesquisa, mas sim serão utilizados fragmentos que já seriam removidos como parte do tratamento da lesão.
O projeto foi colocado "em pendência na reunião do CEP-UNIUBE de 17/12/2015 com a seguinte recomendação:"É necessário alterar o TCLE excluindo a logomarca da UFTM e dados do CEP dessa instituição e mencionar a Universidade de Uberaba como instituição que realiza a pesquisa. Ainda no TCLE, inserir o telefone e email do CEP-UNIUBE e da pesquisadora responsável pelo projeto (Profa Denise Bertulucci Rocha Rodrigues). Se for o caso, considerar incluir ainda no TCLE o benefício que representa as dosagens que serão realizadas no sangue dos participantes (vitamina D, hormônios, etc), caso isso de fato seja um benefício para eles."

Endereço: Av.Nene Sabino, 1801
Bairro: Universitário **CEP:** 38.055-500
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3319-8811 **Fax:** (34)3314-8910 **E-mail:** cep@uniube.br

UNIVERSIDADE DE UBERABA - UNIUBE

Continuação do Parecer: 1.375.317

Objetivo da Pesquisa:

Apresenta-se o seguinte objetivo primário: "Avaliar moduladores da resposta imune e do balanço da ativação de osteoblasto/osteoclasto na osteoporose."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Como já relatado no parecer anterior, Não haverá riscos na participação da pesquisa, posto que a pesquisadora relata que "A coleta de fragmentos ósseos será embasada, em fratura inicial, cuja a retirada faz parte da estratégia de reconstrução cirúrgica do osso afetado. A retirada do fragmento não implica em risco ao pacientes ou ao processo de regeneração óssea. A coleta do material ósseo não mudará em nada a rotina dos cuidados de atenção à saúde dispensados aos paciente portadores de fraturas, ou seja, estes já
receberão o tratamento cirúrgico independentemente de aceitar ou não, participar da pesquisa"
Não menciona-se benefícios diretos ao paciente, mas para a coletividade "Os benefícios da execução desta pesquisa residem na possibilidade de contribuir na elucidação das diferentes dúvidas que ainda existem quanto aos fatores imunológicos envolvidos no processo de reabsorção óssea e como interferem no processo da osteoporose."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é pertinente, tem valor científico e está muito bem apresentada. Os critérios de inclusão e exclusão são claros. A proteção ao participante é assegurada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta-se uma folha de rosto assinada pela pesquisadora e pelo pró-reitor de pesquisa, pós-graduação e extensão da Universidade de Uberaba, bem como o projeto detalhado. Apresenta-se a autorização do gerente de ensino e Pesquisa do HC-UFTM (Dalmo Correia Filho) concordando com o desenvolvimento do projeto. Apresenta-se um TCLE agora corretamente indicando o contato do CEP-UNIUBE e da pesquisadora responsável.

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

não há

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme autorização da plenária do CEP-UNIUBE, o projeto é aprovado "ad referendum".

Endereço: Av.Nene Sabino, 1801
Bairro: Universitário **CEP:** 38.055-500
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3319-8811 **Fax:** (34)3314-8910 **E-mail:** cep@uniube.br

UNIVERSIDADE DE UBERABA - UNIUBE

Continuação do Parecer: 1.375.317

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_627924.pdf	17/12/2015 22:37:09		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	17/12/2015 22:31:52	DENISE BERTULUCCI ROCHA RODRIGUES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	parecer.pdf	10/12/2015 16:56:28	Danila Malheiros Souza	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoeticaosteoporose.pdf	10/12/2015 16:51:53	Danila Malheiros Souza	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	10/12/2015 16:46:07	Danila Malheiros Souza	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

UBERABA, 18 de Dezembro de 2015

Assinado por:
Geraldo Thadel Junior
(Coordenador)

Endereço: Av.Nene Sabino, 1801
Bairro: Universitário **CEP:** 38.055-500
UF: MG **Município:** UBERABA
Telefone: (34)3319-8811 **Fax:** (34)3314-8910 **E-mail:** cep@uniube.br