

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

DANILA MALHEIROS SOUZA

PADRÕES IMUNOENDÓCRINOS DISTINTAMENTE  
ASSOCIADOS EM HOMENS E MULHERES APÓS  
FRATURA DECORRENTE DE OSTEOPOROSE

Uberaba- MG

2021

DANILA MALHEIROS SOUZA

PADRÕES IMUNOENDÓCRINOS DISTINTAMENTE  
ASSOCIADOS EM HOMENS E MULHERES APÓS  
FRATURA DECORRENTE DE OSTEOPOROSE

*Tese apresentada à Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Patologia Básica e Experimental”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro para obtenção de Título de Doutora.*

**Orientadora:** Denise Bertulucci Rocha  
Rodrigues

**Coorientador:** Virmondes Rodrigues Júnior

Uberaba – MG

2021

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me proporcionou saúde e ter me dado oportunidade de dedicar aos estudos.

À minha família, meus pais *Marli Terezinha Malheiros Souza* e *João Hildebrando Resende Souza*, minha irmã *Daiane Malheiros Souza* e meu noivo *Mauricio Barbosa Ferreira*, por toda paciência, incentivo e apoio durante todos esses anos. E meus amigos de caminhada que deixou minha trajetória mais leve e com boas recordações.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> *Denise Bertulucci Rocha Rodrigues*, orientadora desse projeto, por compartilhar toda sua experiência, pelos ensinamentos, paciência e incentivo durante os anos de pesquisa. A todos os participantes do projeto, professores, alunos de mestrado, doutorado, iniciação científica e técnicos que colaboraram na execução desse trabalho.

À todos os colegas e professores da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Universidade de Uberaba e do Centro de Educação Profissional (CEFORES), pelos ensinamentos e oportunidade de compartilhar espaço e conhecimento durante esses anos.

À coordenadora Prof<sup>a</sup>. *Dra. Juliana Reis Machado e Silva*, e aos secretários *André Luís Rodrigues Costa* e *Tuânia Alves Cunha André* do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da UFTM, pela gentileza e dedicação com os pós-graduandos e docentes credenciados.

Aos professores componentes da banca examinadora que gentilmente aceitaram o convite para avaliarem este trabalho.

Muito obrigada!

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

Paulo Freire

## **APOIO FINANCEIRO**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisa do Cefores e no Laboratório de Imunologia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (Uberaba-MG) e com o apoio das seguintes Entidades e Instituições:

- Centro de Educação Profissional (Cefores);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);
- Universidade de Uberaba (UNIUBE);
- Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

## RESUMO

**Introdução:** A Osteoporose é resultado de um desequilíbrio no processo de remodelação da matriz óssea, onde a reabsorção e formação do osso são realizados pelos osteoclastos e osteoblastos, respectivamente. Este delicado equilíbrio sofre ação de diversos hormônios de células do sistema imune. Para um melhor entendimento da remodelação óssea, foi avaliado os níveis séricos das quimiocinas CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG, CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1 e CCL5/RANTES, das citocinas IL-6, IL-22, IL-23, IL-17A, IL-17R, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-4, IL-2, metaloproteinase-3 (MMP-3), e dos hormônios testosterona, estradiol, paratormônio (PTH), leptina, além da calcitonina e vitamina D em pacientes com fraturas devido a osteoporose. **Pacientes e métodos:** Os níveis séricos de hormônios, calcitonina e a vitamina D foram dosadas pelo método de quimioluminescência em pacientes com e sem osteoporose. As citocinas, quimiocinas e o MMP-3 presentes no soro de 30 pacientes com osteoporose foram dosadas pelo método do ELISA e CBA e comparadas as diferenças entre os gêneros masculino e feminino. **Resultados:** Quando comparadas as diferenças hormonais, as mulheres com osteoporose apresentaram níveis significativamente menores de estradiol e vitamina D ( $p=0.047$  e  $p=0.0275$ ), respectivamente. Homens com osteoporose demonstraram níveis significativamente maiores de paratormônio ( $p=0.0065$ ). Em relação aos fatores imunológicos o gênero masculino teve altos níveis de MMP-3 e baixos níveis de CCL-5, enquanto o feminino teve altos níveis de IL-33. **Conclusão:** Existem diferenças hormonais entre os gêneros na osteoporose. Em mulheres, os níveis significativamente menores de estradiol e vitamina D, e nos homens níveis significativamente maiores de paratormônio, parecem influenciar na doença. As diferenças dos fatores imunológicos também parecem agir de forma distinta em homens e mulheres. O aumento de MMP-3 e a diminuição de CCL5 pode ser um fator importante na osteoporose em homens, enquanto a doença parece estar associada com o aumento de IL-33 em mulheres.

Palavras-chaves: Osteoporose, hormônios, citocinas, quimiocinas.

## ABSTRACT

**Introduction:** Osteoporosis is the result of an imbalance in the bone matrix remodeling process, where bone resorption and formation are performed by osteoclasts and osteoblasts, respectively. This delicate balance is affected by several hormones of cells of the immune system. For a better understanding of bone remodeling, serum levels of chemokines CXCL10 / IP-10, CXCL9 / MIG, CXCL8 / IL-8, CCL2 / MCP-1 and CCL5 / RANTES, of cytokines IL-6, IL-22 were evaluated , IL-23, IL-17A, IL-17R, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-4, IL-2, metalloproteinase-3 (MMP-3), and of the hormones testosterone, estradiol, parathormone (PTH), leptin, in addition to calcitonin and vitamin D in patients with fractures due to osteoporosis. **Patients and methods:** Serum levels of hormones, calcitonin and vitamin D were measured by the chemiluminescence method in patients with and without osteoporosis. As cytokines, chemokines and MMP-3 have no pain, 30 patients with osteoporosis were measured using the ELISA and CBA method and compared as differences between men and women. **Results:** When compared as hormonal differences, as women with osteoporosis lower secondary levels of estradiol and vitamin D ( $p = 0.047$  and  $p = 0.0275$ ), respectively. Men with osteoporosis demonstrated advanced levels of parathormone ( $p = 0.0065$ ). Regarding immunological factors, the male gender had high levels of MMP-3 and low levels of CCL-5, while the female had high levels of IL-33. **Conclusion:** There are hormonal differences between genders in osteoporosis. In women, lower levels of estradiol and vitamin D, and in men, higher levels of parathyroid hormone seem to evade in the disease. Differences in immunological factors also appear to act differently in men and women. The increase in MMP-3 and decrease in CCL5 may be an important factor in osteoporosis in men, while a disease appears to be associated with an increase in IL-33 in women.

**Keywords:** Osteoporosis, hormones, cytokines, chemokines.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Controle da remodelação óssea pelo sistema OPG/RANKL. O ligante de RANK presente em osteoblastos se liga ao RANK de células pré-osteoclásticas induzindo a diferenciação de osteoclastos em células maduras. Esse processo é inibido pela Osteoprotegerina (OPG), que compete pela ligação de RANKL em pré-osteoclastos inibindo a sua diferenciação. 12
- Figura 2: Corpo vertebral com osteoporose à direita, mostrando seu encurtamento comparado a vértebra normal à esquerda. 16
- Figure 3: Imunopatologia da osteoporose. As células B estimulam a osteoclastogênese por meio da produção de anticorpos e pelo aumento da expressão de RANKL, mas inibem a osteoclastogênese pela estimulação de OPG. As células T junto com fatores ligados ao envelhecimento induzem a expressão de RANKL em osteoblastos e osteócitos, sendo os macrófagos auxiliares nesse processo por estimular a produção de citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . A inflamação, presente no processo normal do envelhecimento, inibe os osteoblastos, processo que também acontece por meio de citocinas produzidas pelos macrófagos. Em conjunto, todos esses fatores contribuem para o desenvolvimento da osteoporose. 20
- Figura 4: **Figura 1** Dosagem hormonal por quimioluminescência de pacientes do sexo feminino e masculino diagnosticados com osteoporose e pacientes do grupo controle. (A) Vitamina D<sub>1,25</sub>, 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). 30
- Figura 5: **Fig 1** Levels MMP-3, IL-33, IL-22, IL-23, IL-17A and IL-17R in osteoporotic male and female patients. Mann-Whitney, \*p<0.05 45
- Figura 6: **Fig 2** Levels of chemokines (CXCL10/IP-10, CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG, CCL5/RANTES and CXCL8/IL-8) in the serum of osteoporotic patients. Mann-Whitney, \*p<0.05 46



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: **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. 29

## **LISTA DE ANEXOS**

Anexo 1:	Comprovante do aceite para publicação do artigo 1	65
Anexo 2:	Comprovante de submissão do artigo 2	66
Anexo 3:	Aprovação do Comitê de Ética	67

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	11
1.1. BIOLOGIA DO TECIDO ÓSSEO.....	11
1.2. OSTEOIMUNOLOGIA.....	13
1.3. OSTEOPOROSE .....	16
1.4. FATORES HORMONAIS E IMUNOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA OSTEOPOROSE .....	18
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. OBJETIVO GERAL .....	22
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
3. ARTIGO 1 .....	23
4. ARTIGO 2.....	36
5. COMENTÁRIOS E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	56
6. CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS .....	58
8. ANEXOS .....	65

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

### 1.1. BIOLOGIA DO TECIDO ÓSSEO

O osso é um tecido dinâmico que está constantemente remodelando-se por meio da formação de um novo tecido e da eliminação do antigo [1]. É um processo fisiológico que continua por toda vida, havendo a renovação do esqueleto e mantendo sua integridade estrutural [2].

Há três tipos de células principais para manter o processo constante de remodelação óssea: os osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Os osteócitos são essenciais para que a matriz óssea seja mantida, são responsáveis pela modulação da remodelação óssea e formam a rede celular interna do osso, os osteoblastos são responsáveis pela formação óssea e os osteoclastos são células com capacidade de reabsorção, essas células interagem entre si podendo ativar umas às outras [3, 4]. Os osteoblastos estão essencialmente envolvidos na formação de osteoclastos a partir de células progenitoras hematopoiéticas através de um mecanismo envolvendo o contato célula-a-célula, por meio da ligação RANK (receptor ativador do fator nuclear NFκB) ao seu ligante RANKL, o “fator de diferenciação osteoclástica” [5, 6]. 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 [7]. Os osteoblastos é a principal fonte de RANKL, mas também é expressa por osteócitos, fibroblastos ou células do sistema imune, incluindo células T e células dendríticas maduras [3].

A diferenciação de osteoclastos é o primeiro passo para o processo de reabsorção óssea, induzido pelo fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) e o ativador do receptor do ligante NF-κB (RANKL). O M-CSF é essencial para a proliferação de precursores de osteoclastos por meio da ligação ao seu receptor cFms, enquanto o RANKL é indispensável para a formação de osteoclastos multinucleados e conseqüentemente pela reabsorção óssea [8, 9].

Por outro lado, para manter a regulação da remodelação óssea, a osteoprotegerina (OPG) pode atuar inibindo o RANKL, por competição, ao se ligar ao RANK e também diretamente, por meio de outros receptores presentes nos osteoclastos (Figura 1). Seus efeitos são antagônicos aos de RANKL, a OPG inibe a osteoclastogênese por bloquear a ligação de RANKL ao RANK [10, 11]. Diversas citocinas e hormônios, como os estrógenos, influenciam a gênese de osteoclastos por meio da regulação da produção de RANKL/OPG pelas células estromais e pelos osteoblastos [12].

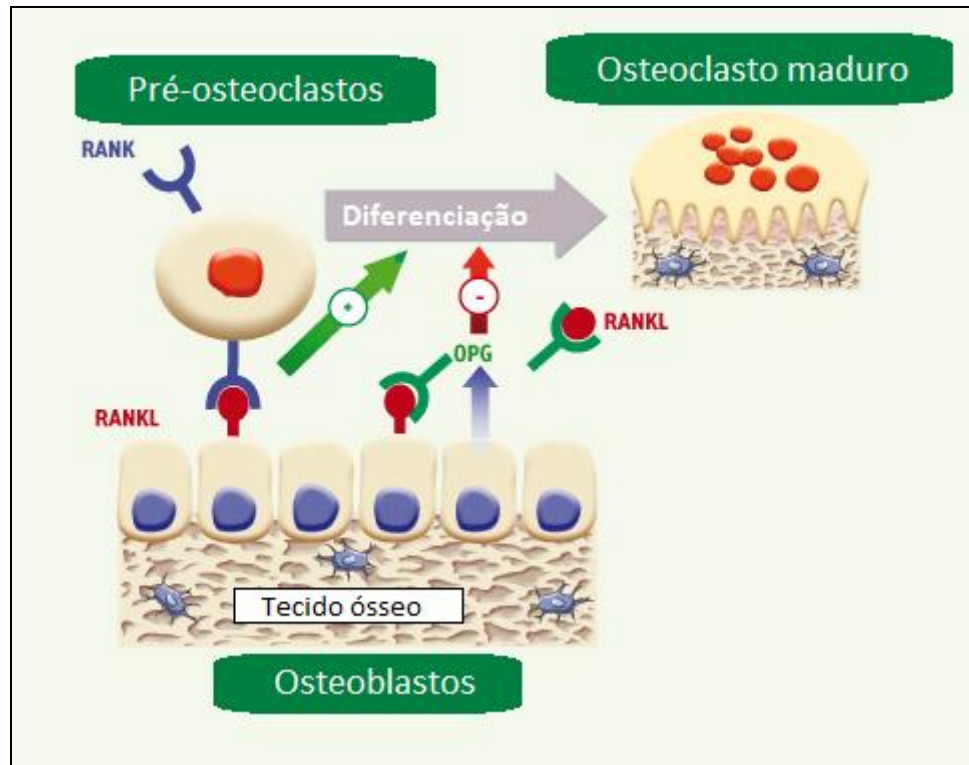


Figura 1: Controle da remodelação óssea pelo sistema OPG/RANKL. O ligante de RANK presente em osteoblastos se liga ao RANK de células pré-osteoclásticas induzindo a diferenciação de osteoclastos em células maduras. Esse processo é inibido pela Osteoprotegerina (OPG), que compete pela ligação de RANKL em pré-osteoclastos inibindo a sua diferenciação.

Fonte: Adaptado de Marie, 2008.

A concentração celular de RANKL está aumentada em mulheres pós-menopausa, e diminuída após tratamento com estradiol, mostrando que a deficiência desse hormônio aumenta direta ou indiretamente a produção de RANKL, contribuindo para reabsorção óssea [13]. Esse hormônio promove a saúde dos ossos 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 [14-16]. Assim, ele promove a diferenciação osteoblástica e inibe a produção e a função dos osteoclastos [17, 18].

A presença do estradiol também está relacionado com o aumento da deposição de cálcio no osso ao estimular células-tronco mesenquimais a aumentar a expressão da proteína morfogenética óssea e osteocalcina, afetando a fisiologia dos osteoblastos [19, 20]. As principais ações reconhecidas da calcitonina na homeostase do cálcio são inibir a reabsorção óssea e diminuir a reabsorção tubular de cálcio no rim [21, 22]. Em um estudo *in vitro*, foi mostrado que a calcitonina age inibindo a reabsorção óssea através da interação do seu

receptor com osteoclastos [23]. A suplementação de cálcio e vitamina D em pessoas idosas tem mostrado que há aumento da densidade mineral óssea e redução de fraturas [24].

Existe uma associação entre estradiol, testosterona circulante e densidade mineral óssea com o risco fraturas em homens idosos. Esses hormônios, em níveis reduzidos, estão associados com o risco de fraturas, e quando suas baixas disponibilidades estão atuando em conjunto há um maior risco de fraturas [25]. A ausência de testosterona aumenta a reabsorção nas superfícies esponjosa e endocortical e diminui a formação óssea periosteal durante o crescimento [26].

A remodelação óssea também tem sido estimulada pelo hormônio da paratireoide (PTH), podendo levar à perda ou ao ganho ósseo dependendo do equilíbrio entre formação e reabsorção. A exposição contínua de PTH aumenta a atividade dos osteoclastos, enquanto que a administração intermitente de PTH promove maior atividade osteoblástica [27, 28]. O principal efeito do uso intermitente do PTH é o aumento do número de osteoblastos e, conseqüentemente, a formação óssea. Este efeito é atribuído à proliferação dos precursores dos osteoblastos, inibição da apoptose e reativação de células lineares da matriz para sintetizar novos osteoblastos. Mas seu uso contínuo aumenta a formação dos osteoclastos, através da estimulação da via do RANKL. A ativação dos receptores de paratormônio também induz nos osteócitos a produção de alguns fatores, como a IL-6, que leva a expressão do RANKL em outras células [29].

## 1.2. OSTEOIMUNOLOGIA

Células do sistema imune, principalmente linfócitos T ativados e células apresentadoras de antígeno, também podem expressar RANKL, e assim influenciar a remodelação óssea tanto diretamente como através da produção de citocinas [30]. Por exemplo, IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  favorece a perda óssea por meio do favorecimento da diferenciação de osteoclastos e pela inibição da diferenciação em osteoblastos [31, 32]. Outras citocinas como IL-4, IL-12 e IL-33 são fortes supressoras da diferenciação em osteoclastos e inibe a perda óssea [33, 34]. O TNF- $\alpha$  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 [35].

A IL-6 é uma citocina que estimula a formação de osteoclastos em células de cultura, através de uma ação mediada pela presença de osteoblastos [36]. Isso ocorre porque a IL-6 está intimamente associada à expressão de RANKL nos osteoblastos. Ou seja, a IL-6 atua indiretamente na osteoclastogênese, estimulando a liberação de RANKL pelas células dos

tecidos ósseos, como os osteoblastos [37, 38]. Já foi mostrado que biomarcadores de destruição óssea mediados por osteoclastos foram suprimidos por inibidores de IL-6 em pacientes com artrite reumatoide, mas a falta de IL-6 não foi fator determinante para redução do número de osteoclastos [39, 40]. Isso mostra que essa citocina pode não estar envolvida no processo de reabsorção óssea fisiológica, mas sua importância pode ser restrita a estados patológicos de formação elevada de osteoclastos, incluindo artrite inflamatória, doença periodontal e doença inflamatória intestinal [41].

A presença de citocinas Th1 e Th17, contribuem para presença da osteoclastogênese, mediada por RANKL [42-44]. As citocinas Th1 predominam no estágio inflamatório da doença e a IL-22 com as demais citocinas de Th17 predominam durante as fases destrutivas dos ossos [45].

A IL-33 pertence à família de citocinas IL-1 que são conhecidas principalmente por suas funções pró-inflamatórias [46, 47], 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 STAT6 [48, 49].

Por outro lado, experimentos *in vitro* e *in vivo* mostram que a IL-33 age como um potente inibidor da osteoclastogênese [49, 50]. No estudo *in vitro*, usando uma análise molecular, foi mostrado 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 distúrbios de perda de osso [49]. Os efeitos da IL-33 são mediados através da interação com um receptor heterodimérico consistindo de ST2 ligado a membrana e IL-1RAcP, induzindo ativação de NF- $\kappa$ B e MAPK [47, 51, 52].

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 [53]. 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 [54].

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, 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 [55].

As MMPs derivadas de osteoblastos 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 [56].

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 [57]. Alguns estudos sugerem que TIMP-3 está associada com o aumento da formação de osso, enquanto diminui a reabsorção óssea *in vivo* [58].

Já as quimiocinas direcionam o recrutamento de células imunitárias e também estão envolvidas no tráfico de progenitores de osteoclastos [59, 60]. Entre elas podemos citar algumas com funções importantes nesse processo, a IP-10 é uma quimiocina que induz a ativação de integrinas, direciona a migração de vários tipos de células (células T ativadas, monócitos e células NK) e seus níveis séricos estão aumentados com a idade e em algumas doenças como artrite reumatoide [61].

Os osteoblastos apresentam receptores para CXCL10/IP-10, IL-8 e CXCL-MIG, que ao se ligar nessa célula ocorre a expressão de RANKL induzindo a osteoclastogênese [62]. RANTES é uma quimiocina que tem o papel de atrair eosinófilos, mastócitos e basófilos no local de inflamação alérgica e juntamente com MCP-1, expresso em osteoclastos maduros, induzem a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea [63, 64]. A CXCL8 é forte quimioatratante de osteoclastos e demonstrou estimular a osteoclastogênese, mediada por osteoblastos, em um estudo com precursores de osteoclastos e osteoblastos cultivados com CXCL8, sugerindo que essa quimiocina pode contribuir na osteoporose afetando a comunicação entre as células ósseas [65, 66]. Já a quimiocina CXCL9/MIG é conhecida por ser induzida em macrófagos por meio de IFN- $\gamma$  [67], tem mostrado também que RANKL pode induzir diretamente a expressão do gene MIG em precursores de osteoclastos, estimulando assim essas células [68].

Assim, podemos notar que não só os fatores hormonais, mas também as células e mediadores do sistema imunológico exercem papel crucial no metabolismo ósseo, seja estimulando os osteoblastos a produzir matriz óssea ou os osteoclastos fazer a reabsorção óssea, e mais ainda, o desequilíbrio desse conjunto de fatores pode ser fator importante para o aparecimento de doenças ósseas como a osteoporose.



### 1.3. OSTEOPOROSE

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica caracterizada por redução da densidade mineral óssea (DMO) e pela deterioração micro arquitetural do tecido, devido ao desequilíbrio da remodelação óssea, que causa sua maior fragilidade e aumento na susceptibilidade para fraturas (Figura 2) [69, 70].



Figura 2: Corpo vertebral com osteoporose à direita, mostrando seu encurtamento comparado a vértebra normal à esquerda.

Fonte: Robbins, 2010.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a osteoporose afeta mais de 10 milhões de pessoas no Brasil, sendo que apenas um terço é diagnosticada e apenas 20% destes recebem tratamento [71]. No mundo afeta mais de 200 milhões de pessoas e nos Estados Unidos ocorrem mais de 2 milhões de fraturas anualmente decorrente da osteoporose, com elevada taxa de morbimortalidade [72, 73].

A palavra osteoporose surgiu do estudo histológico de um osso osteoporótico por Jean Georges Lobstein, patologista francês, em 1830, mas popularizou-se entre os ortopedistas como um sinal radiológico, que significava rarefação óssea, em fraturas causadas por traumas de baixa energia [74]. Este mesmo sinal os radiologistas chamam osteopenia [75]. Em 1941, Albright atualizou o conceito de osteoporose para uma desordem esquelética englobando muitas patologias, nas quais a microarquitetura do tecido ósseo está deteriorada [76].

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 [77]. Tanto o osso cortical como o esponjoso são afetados [78].

A relação combinada entre os osteoblastos, células de formação óssea, e os osteoclastos, células de absorção óssea é um dos pré-requisitos para a homeostase óssea [79]. O desequilíbrio desses dois tipos de células pode prejudicar a solidez da estrutura óssea, desencadeando uma série de doenças osteolíticas, incluindo osteoartrite e a osteoporose [80, 81].

Pode ser subdividida em primária e secundária. A primária ainda pode ser subdividida em tipo I (osteoporose pós-menopausa) e tipo II (osteoporose senil), segundo a idade do paciente. Já a osteoporose secundária é aquela decorrente de doenças, drogas ou outras condições que possam contribuir para a osteoporose, aumentando o risco de fraturas [82].

Os fatores de risco mais valorizados para osteoporose são: o gênero feminino, as etnias amarela e branca, a idade mais avançada, a precocidade do início da menopausa, a hereditariedade, história pregressa de fraturas osteoporóticas, erros nutricionais (baixa ingestão de cálcio e de vitamina D3, situações para má absorção de alimentos), maus hábitos (ingestão exagerada de café, álcool, tabaco), sedentarismo, certas medicações e doenças como a artrite reumatoide e quase todas as doenças inflamatórias sistêmicas [75].

A capacidade dos osteoblastos em substituir a matriz óssea diminui com a idade, levando a um déficit na deposição de matriz e afinamento das trabéculas ósseas. Deficiência de estrogénios na menopausa induz uma aceleração rápida e significativa de remodelação óssea: o número de sítios de reabsorção aumenta, o que amplifica o intervalo entre a reabsorção e formação óssea, e induz uma perda de ligação trabecular, também é adicionado um afinamento do osso cortical por reabsorção endosteal que contribui para reduzir a resistência mecânica do osso [83].

As alterações nos níveis hormonais contribuem para o desequilíbrio da remodelação causando a desmineralização junto com outros mecanismos moleculares, como o aumento da produção de algumas citocinas, gerando certa aceleração da perda óssea [84]. Outro fator importante nesse processo ocorre quando há um desequilíbrio no sistema OPG/RANKL, o aumento da expressão de RANKL é inversamente correlacionada com os níveis circulantes de estradiol e correlacionada positivamente com os marcadores de reabsorção óssea na osteoporose [13].

Qualquer desequilíbrio entre essas duas moléculas induz anormalidades do metabolismo ósseo com impacto significativo na massa óssea. Em humanos, a maioria das doenças ósseas caracterizadas por osteólise estão associadas a uma produção anormal de OPG

ou RANKL [85]. Este envolvimento do casal OPG/RANKL na patogênese da osteoporose pós-menopausa sugere que novas estratégias terapêuticas poderiam ser desenvolvidas para reequilibrar esse sistema [86].

#### 1.4. FATORES HORMONAIS E IMUNOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA OSTEOPOROSE

Cerca de 50% das mulheres pós-menopáusicas com artrite reumatóide sofrem de osteoporose generalizada, com causas multifatoriais, envolvendo a deficiência de estradiol, corticoterapia a longo prazo e inflamação sistêmica [87, 88]. A reabsorção óssea em osteoporose induzida por ovariectomia é impulsionado por TNF produzido por células T [89].

Foi especulado que o estradiol promove a diferenciação osteoblástica principalmente no estágio inicial [17]. O estradiol inibe 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 [18].

Em mulheres pós-menopausa, a deficiência de estradiol 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 [90]. O estrógeno melhorou a diferenciação de células hBMSCs osteoblásticas através de ER- $\alpha$  [19] ou pela ativação de Wnt/b-catenina [91].

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 [92, 93]. Homens mais velhos 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 [94].

O paratormônio pode ser uma alternativa para maximizar os efeitos terapêuticos na osteoporose e diminuir a perda óssea [95, 96]. Por outro lado, foi mostrado que o PTH contribui na estimulação da maturação de osteoclastos, ele plasmático liga-se a receptores em osteoblastos ativos e seus precursores e assim estimula a produção de RANKL e diminui a taxa de produção de OPG, que agiria inibindo a maturação de osteoclastos por competir pelos locais de ligação de RANKL [97].

Os hormônios estrógeno, progesterona, hormônio do crescimento e PTH também estão relacionados com a absorção de cálcio, fator essencial na mineralização óssea. Essa absorção intestinal é regulada principalmente pelo calcitrol, um hormônio formado a partir da vitamina D [98-100]. A suplementação de vitamina D parece estar associada a desfechos clínicos

favoráveis. Em particular, a resolução da deficiência de vitamina D está associada a uma recuperação da densidade mineral óssea, além disso, a suplementação de vitamina D reduz o risco de fraturas associadas a quedas [101, 102].

Há maior prevalência de osteoporose em doenças as quais há má absorção intestinal de nutrientes está associada, sobretudo, à má absorção de cálcio e vitamina D, com efeito direto no metabolismo ósseo, provavelmente secundárias às lesões da mucosa intestinal [103]. 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 [104].

Há uma interação entre hormônios e células do sistema imunológico no processo de osteoporose, foi visto que as células T são os principais indutores de reabsorção óssea sob a deficiência de estradiol. A ovariectomia aumenta a produção de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) por células T a um nível suficiente para aumentar osteoclastogênese [105], através do aumento de RANKL em osteoblastos [30]. Pelo contrário, as células B secretam OPG inibindo a diferenciação de osteoclastos e conseqüentemente a reabsorção óssea [106].

Como já foi visto, muitos são os fatores imunológicos envolvidos na ativação de osteoclastos e osteoblastos, e o desequilíbrio da atividade dessas células resultam na osteoporose, assim podemos separar as principais citocinas associadas a indução ou prevenção da osteoporose (Figura 3). Uma produção excessiva de citocinas de reabsorção óssea como IL-6, IL-1 e TNF- $\alpha$  explica a ocorrência de osteoporose associada a doenças inflamatórias, essas citocinas agem ativando a diferenciação de osteoclastos por meio de RANKL e essas células induzem a osteoporose devido a reabsorção óssea [107].

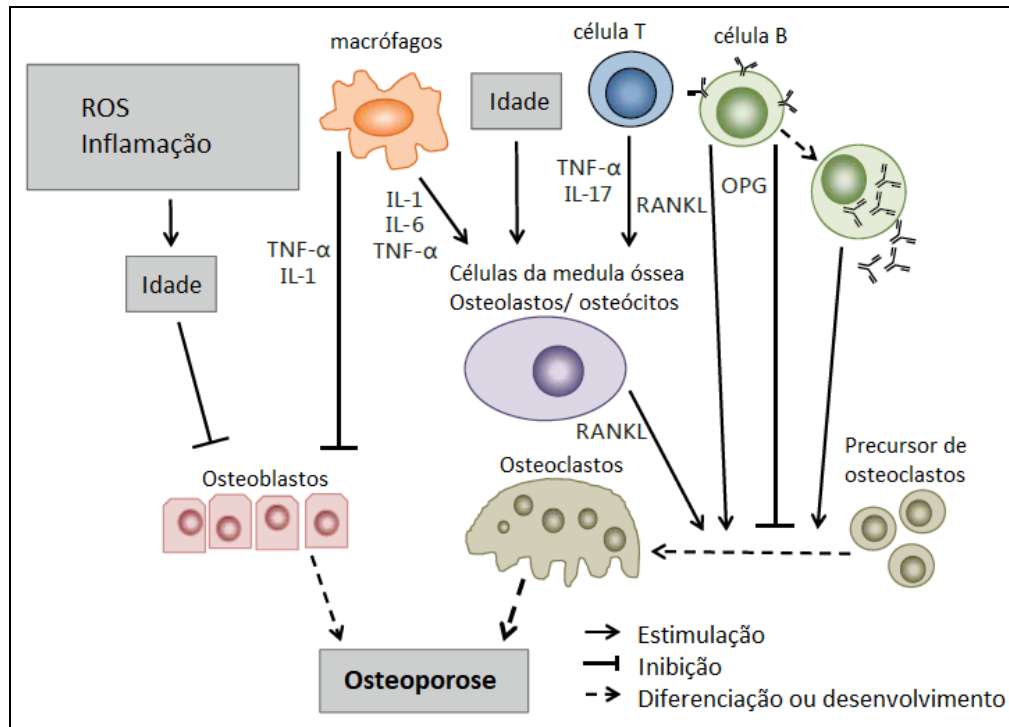


Figura 3: Imunopatologia da osteoporose. As células B estimulam a osteoclastogênese por meio da produção de anticorpos e pelo aumento da expressão de RANKL, mas inibem a osteoclastogênese pela estimulação de OPG. As células T junto com fatores ligados ao envelhecimento induzem a expressão de RANKL em osteoblastos e osteócitos, sendo os macrófagos auxiliares nesse processo por estimular a produção de citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ . A inflamação, presente no processo normal do envelhecimento, inibe os osteoblastos, processo que também acontece por meio de citocinas produzidas pelos macrófagos. Em conjunto, todos esses fatores contribuem para o desenvolvimento da osteoporose.

Fonte: Adaptado de: Pietschmann, 2016.

Outras citocinas possuem efeito contrário bloqueando a osteoclastogênese através da inibição de RANKL. As citocinas envolvidas nesse processo são IFN, IL-4 e IL-10. Já a IL-33, além de sua ação direta ao inibir a diferenciação de osteoclastos induzida por RANKL, ela também tem a função de inibir as metaloproteinases de matriz responsáveis pela degradação da matriz extracelular [53]. Portanto, essas citocinas possuem um efeito protetor impedindo a osteoporose.

Apesar dos estudos já realizados, o perfil das alterações hormonais e imunes de pacientes com osteoporose ainda são inconclusivos ou foram analisados em estudos isolados em que as diferentes variáveis não conseguem ser avaliadas em conjunto. 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 descobrir novos alvos ou biomarcadores para tornar o tratamento ainda mais

eficaz. Este estudo tem como objetivo associar níveis hormonais, de citocinas, quimiocinas e metaloproteinases em pacientes com osteoporose e pacientes controle e contribuir de maneira decisiva para o entendimento da doença.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os níveis hormonais em pacientes com fraturas decorrentes de osteoporose e comparar com níveis de pacientes jovens com fraturas de alto impacto. Analisar os fatores imunológicos como metaloproteinase de matriz, citocinas e quimiocinas em pacientes com osteoporose comparando as diferenças entre os gêneros masculino e feminino.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os níveis hormonais de estradiol, testosterona, paratormônio, vitamina D e calcitonina em pacientes com fraturas decorrentes de osteoporose e pacientes jovens com fratura de alto impacto.

Avaliar os níveis séricos de citocinas IL-6, IL-22, IL-23, IL-17A e IL-17R em pacientes com fraturas decorrentes de osteoporose avaliando as diferenças entre gêneros.

Avaliar os níveis séricos de quimiocinas CXCL10/IP-10, CXCL9/MIG, CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1 e CCL5/RANTES em pacientes com fraturas decorrentes de osteoporose avaliando as diferenças entre gêneros.

Avaliar os níveis séricos de metaloproteinase de matriz 3 em pacientes com fraturas decorrentes de osteoporose avaliando as diferenças entre gêneros.

## 3. ARTIGO 1

**Avaliação da influência hormonal em pacientes com fraturas atribuídas a osteoporose****Evaluation of hormonal influence in patients with fractures attributed to osteoporosis****Danila Malheiros-Souza<sup>a</sup>,**

Formação acadêmica: Biomédica Mestre em Ciências da Saúde;

<sup>a</sup>Laboratório de Imunologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

**Leonardo Franco Pinheiro Gaia<sup>b</sup>,**

Formação acadêmica: Médico Ortopedista;

<sup>a</sup>Laboratório de Imunologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

**Fausto Fernandes de Almeida Sousa<sup>a</sup>,**

Formação acadêmica: Médico Ortopedista;

<sup>a</sup>Laboratório de Imunologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

**Pedro Ivo Ferreira Favaro<sup>a</sup>,**

Formação acadêmica: Médico Ortopedista;

<sup>a</sup>Laboratório de Imunologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

**Virmondes Rodrigues<sup>a</sup>,**

Formação acadêmica: Médico Doutor em Imunologia;

<sup>a</sup>Laboratório de Imunologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

**Denise Bertulucci Rocha Rodrigues<sup>a,b</sup>**

Formação acadêmica: Odontologia Doutora em Patologia;

<sup>a</sup>Laboratório de Imunologia, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

<sup>b</sup>Laboratório de Imunobiologia, Universidade de Uberaba, Uberaba, Minas Gerais, Brazil;

**Endereço para correspondência:**

Denise Bertulucci Rocha Rodrigues



Universidade de Uberaba, Uberaba, Minas Gerais

Av Nenê Sabino, 1801, CEP: 38055-500 Uberaba MG, Brasil.

E-mail: denise.rodrigues@uniube.br

### **Fontes de suporte**

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.

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a influência dos níveis hormonais de vitamina D, calcitonina, testosterona, estradiol e paratormônio em pacientes com fratura atribuída a osteoporose, quando comparados a pacientes jovens que tiveram fraturas decorrentes de acidente de alto impacto.

**Métodos:** Foram coletadas amostras de sangue de 30 pacientes idosos, com fratura atribuída à osteoporose (T-score  $\leq -2,5$ ) (grupo com osteoporose) e 30 amostras de sangue de pacientes jovens que tiveram fraturas decorrentes de acidentes de alto impacto (grupo controle). Foram realizadas dosagem de 1,25-hidroxivitamina D (Kit Diasorin), Calcitonina (Kit Siemens), Testosterona, Estradiol e Paratormônio (Kit Beckman Coulter) pela técnica de quimiluminescência. 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 hormonais. Foi considerado significativo quando o valor de  $p < 0,05$ . Todas as análises foram feitas comparando gênero, e grupos de pacientes com e sem osteoporose.

**Resultados:** Mulheres com osteoporose apresentam níveis significativamente menores de estradiol e vitamina D ( $p=0.047$  e  $p=0.0275$ ), respectivamente. Homens com osteoporose demonstraram níveis significativamente maiores de paratormônio ( $p=0.0065$ ). Não houve diferença significativa nos níveis de testosterona e calcitonina.

**Conclusão:** Existem diferenças hormonais entre os gêneros na osteoporose. Em mulheres níveis significativamente menores de estradiol e vitamina D, e nos homens níveis significativamente maiores de paratormônio, parecem influenciar na doença.

**Palavras-chave:** Osteoporose; Hormônios; Estradiol; Calcitonina; Paratormônio.

## **Introdução**

A osteoporose é causada por um desequilíbrio no metabolismo ósseo normal entre os osteoblastos e osteoclastos<sup>1</sup>, sendo que no processo de reabsorção óssea o osteoclasto parece ter um papel mais ativo em relação ao osteoblasto.<sup>2,3</sup> Estudos apontam que hormônios podem ter um papel importante no desequilíbrio de formação óssea<sup>4</sup>, visto que o paratormônio parece induzir o osteócito a diferenciar em osteoclasto.<sup>5</sup> Da mesma forma, hormônios como o estradiol e a testosterona parecem ser importantes<sup>6-8</sup>, uma vez que, a testosterona age inibindo a apoptose de osteoblastos.<sup>9</sup> 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.<sup>10,11</sup> 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.<sup>12</sup>

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 avaliar a influência dos níveis hormonais de vitamina D, calcitonina, testosterona, estradiol e paratormônio em pacientes com fratura atribuída a osteoporose, quando comparados a pacientes jovens que tiveram fraturas decorrentes de acidente de alto impacto.

## **Materiais e métodos**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de ética com protocolo de número: 51827515.4.0000.5145.

### **Grupo de Estudo**

Foram coletadas amostras de sangue de 30 pacientes idosos, com fratura atribuída à osteoporose ( $T\text{-score} \leq -2,5$ ) (grupo com osteoporose) e 30 amostras de sangue de pacientes jovens que tiveram fraturas decorrentes de acidentes de alto impacto (grupo controle). Foram excluídos os pacientes com outras doenças ósseas, 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.

### **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 três 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.

### **Análise hormonal**

Após a centrifugação das amostras de sangue coletadas, os tubos de soro foram encaminhados 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.

### **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 hormonais. Foi considerado significativo quando o valor de  $p < 0,05$ .

## Resultados

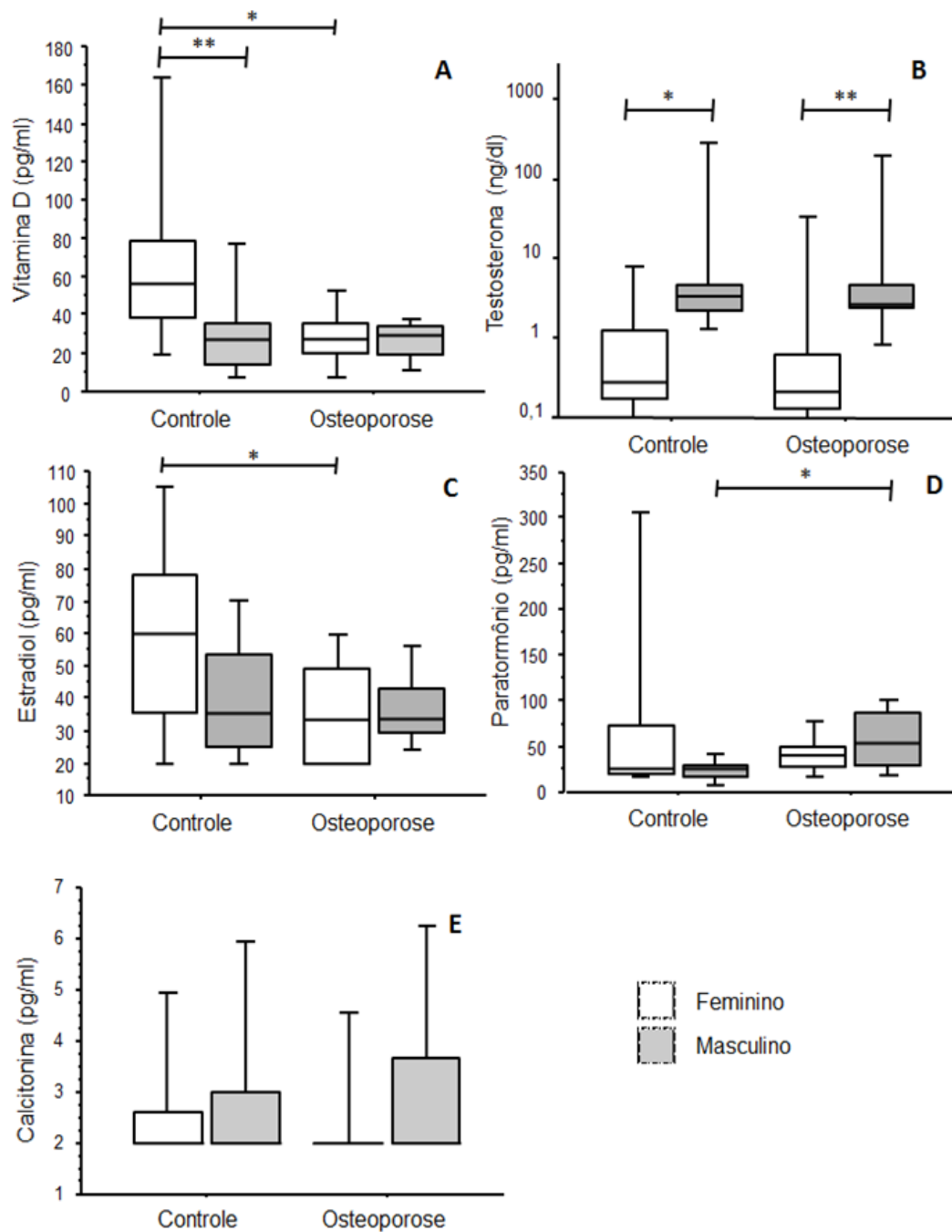
No presente estudo, foi realizada a dosagem hormonal de 60 pacientes, sendo 30 de pacientes com osteoporose e 30 do grupo controle.

A média de idade dos pacientes foi de  $58,8 \pm 22,61$  anos, e todas as análises foram feitas comparando gênero, grupo de pacientes com osteoporose e grupo controle. Os dados com o número de pacientes e a média de idade de cada grupo estão contidos na Tabela 1.

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

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).



## Discussão

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 em pacientes com osteoporose comparando também a diferença entre os gêneros.

No presente estudo, diferenças significativas foram encontradas nas dosagens de vitamina D, estradiol e paratormônio. 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.<sup>13</sup> 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.<sup>7,8,14</sup> A deficiência de estradiol também foi associada com a presença de osteoporose em homens com mais de 64 anos<sup>15</sup>, embora nos resultados obtidos não tenha sido encontrada essa associação.

A remodelação óssea também tem sido estimulada pelo paratormônio, um estudo feito com mulheres idosas mostra que houve um aumento significativo de paratormônio em mulheres com osteoporose.<sup>16</sup> Em nosso estudo, níveis significativamente maiores de paratormônio 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 paratormônio.

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 masculinos e femininos. Mas, estudo mostra que a deficiência de testosterona em homens com mais de 64 anos está associada com a rápida perda óssea e conseqüentemente com o desenvolvimento de osteoporose.<sup>15</sup> Embora dados da literatura mostrem que a calcitonina age inibindo a reabsorção óssea<sup>17</sup>, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de calcitonina entre os grupos e gêneros estudados.

### **Conclusão**

Este estudo sugere que 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 paratormônio 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.

### **Conflito de Interesses**

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

## Referências

1. Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nature Medicine* 2007; 37(7):791-801
2. Charles JF, Coury F, Sulyanto R, et al. The collection of NFATc1-dependent transcripts in the osteoclast includes numerous genes non-essential to physiologic bone resorption. *Bone* 2012;51(5): 902-912
3. U Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, et al. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology* 2000;141(9):3478-3484
4. Breckon JJ, Papaioannou S, Kon LW, et al. Stromelysin (MMP-3) synthesis is up-regulated in estrogen-deficient mouse osteoblasts in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res* 1999;14(11):1880-1890
5. Silva BC, Bilezikian JP. Parathyroid hormone: anabolic and catabolic actions on the skeleton. *Curr Opin Pharmacol* 2015;22:41-50
6. Damien E, Price JS, Lanyon LE. Mechanical strain stimulates osteoblast proliferation through the estrogen receptor in males as well as females. *J Bone Miner Res* 2000;15(11):2169-2177
7. Gui Y, Duan Z, Qiu X, et al. Multifarious effects of 17-beta-estradiol on apolipoprotein E receptors gene expression during osteoblast differentiation in vitro. *Biosci Trends* 2016;10(1):54-66
8. Kousteni S, Han L, Chen JR, et al. Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. *J Clin Invest* 2003;111(11):1651-1664
9. Wiren KM, Toombs AR, Semirale AA, Zhang X. Osteoblast and osteocyte apoptosis associated with androgen action in bone: requirement of increased Bax/Bcl-2 ratio. *Bone* 2006;38(5):637-651

10. Adams JS. Vitamin D as a defensin. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006;6(4):344-346
11. Chen H, Gilbert LC, Lu X, et al. A new regulator of osteoclastogenesis: estrogen response element-binding protein in bone. *J Bone Miner Res* 2011;26(10):2537-2547
12. Weaver CM, Alexander DD, Boushey CJ, et al. Calcium plus vitamin D supplementation and risk of fractures: an updated meta-analysis from the National Osteoporosis Foundation. *Osteoporos Int* 2016;27(1):367-376
13. Bischoff-Ferrari HA, Conzelmann M, Dick W, Theiler R, Stähelin HB. Effect of vitamin D on muscle strength and relevance in regard to osteoporosis prevention. *Z Rheumatol* 2003;62(6):518-521
14. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell* 2001;104(5):719-730
15. Fink HA, Ewing SK, Ensrud KE, et al. Association of testosterone and estradiol deficiency with osteoporosis and rapid bone loss in older men. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(10):3908-3915
16. Al-Daghri NM, Aziz I, Yakout S, et al. Inflammation as a contributing factor among postmenopausal Saudi women with osteoporosis. *Medicine (Baltimore)* 2017;96(4):e5780
17. Martin TJ, Sims NA. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends Mol Med* 2005;11(2):76-81

## 4. ARTIGO 2

**Immune mediators serum levels are distinctly associated with osteoporosis in male and female patients****Immune mediators in osteoporosis**

Malheiros-Souza, Danila<sup>b</sup>; Gaia, Leonardo Franco Pinheiro<sup>a</sup>; Silva, Djalma Alexandre Alves<sup>b</sup>; Silva, Marcos Vinícius<sup>b</sup>; Oliveira, Carlo José Freire<sup>b</sup>; Souza, Ingrid Hovsepian<sup>a</sup>; Sousa, Fausto Fernandes Almeida<sup>b</sup>; Favaro, Pedro Ivo Ferreira<sup>b</sup>; Pereira, Sanivia de Lima<sup>a,b</sup>; Rodrigues, Rodrigues, Virmondes<sup>b</sup>; Denise Bertulucci Rocha<sup>a,b</sup>.

<sup>a</sup>Laboratory of Immunobiology, University of Uberaba, Uberaba, Minas Gerais, Brazil;

Av Nenê Sabino, 1801, CEP: 38055-500

Uberaba MG, Brazil.

<sup>b</sup>Laboratory of Immunology, Department of Biological Sciences and Cefores, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

Av. Frei Paulino, 20, CEP 38.025-170

Uberaba MG, Brazil

**Corresponding author:**

\*Denise Bertulucci Rocha Rodrigues

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Av. Frei Paulino, 20, CEP 38.025-170

Uberaba MG, Brazil

Telephone number: +55 34 33195289

E-mail address: denise.rodrigues@uniube.br

**Keywords:** Osteoporosis; Cytokines and Chemokines.

### **LIST OF ALL ABBREVIATIONS**

MMP-3 - metalloproteinase-3

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay

CBA - Cytometric Bead Array

CCL – chemokine C-C motif ligand

CXCL - chemokine C-X-C motif ligand

IL - interleukin

RANK- Receptor activator nuclear kappaB

RANKL - Receptor activator nuclear kappaB- ligand

OPG - osteoprotegerin

PTH - parathyroid hormone

BSA PBS – Bovine Serum Albumin phosphate buffered saline

TMB - tetramethylbenzidine

TNF- $\alpha$  - Tumor Necrosis Factor alpha

NFAT - nuclear factor of activated T-cells

## ABSTRACT

**Introduction:** Osteoporosis is a chronic and progressive disease caused by an imbalance in the bone remodeling process. In this process, resorption and formation are performed by osteoclasts and osteoblasts, respectively. This delicate balance is regulated by several hormones and cytokines. Thus, to attain a better understanding of the bone remodeling associated process with osteoporosis in aging subjects, the following mediators were investigated: cytokines, chemokines and metalloproteinase-3 (MMP-3). **Patients and Methods:** To this end, blood samples were collected from 30 osteoporotic patients, cytokines, chemokines and MMP-3 were measured with the help of ELISA and CBA. **Results:** Men with osteoporosis had significantly higher levels of MMP-3 ( $p=0.0181$ ) and decreased levels of CCL5 ( $p=0.0414$ ) than women. Women with osteoporosis had significantly higher levels of IL-33 ( $p=0.0436$ ) compared to adult males. **Conclusion:** The different immunological factors seem to act differently in osteoporosis evaluated separately in men and women. An increase in MMP-3 and decreased CCL5 may be an important factor in osteoporosis in men, whereas the disease seems to be associated with an increase in IL-33 in women.

**Keywords:** Osteoporosis; Cytokines and Chemokines.

## 1. Introduction

Osteoporosis is a metabolic skeletal disease characterized by reduced bone mineral density, microarchitectural deterioration of bone tissue, decreased bone strength and increased risk of fragility fractures [1]. Besides fractures, the clinical complications of osteoporosis include chronic pain, depression, deformity, loss of independence and increased mortality, which affect individuals over the age of 50 [2].

Aging is associated with increased levels of circulating cytokines and proinflammatory markers. This phenomenon is known as “inflammaging,” and it plays a significant role in the etiopathology and pathophysiology of many diseases including atherosclerosis and Alzheimer's disease [3,4]. Various components of the innate and adaptive immune response have been reported to be capable of modulating osteoclast and osteoblast function and to also directly cause changes in the extracellular matrix [4].

The balance between osteoclast and osteoblast activities is necessary for maintaining bone homeostasis [5]. In addition to hormonal presence [6], more recent studies have shown that immunological factors contribute to the maintenance of this control through cytokines and chemokines [7,8]. IL-33 plays a key role in osteoblast differentiation and inhibition of osteoclastogenesis. The latter occurs due to a decrease in NFATc1-dependent gene expression in osteoclast precursor cells, which impairs osteoclast fusion capacity [9].

Conversely, IL-33 has been demonstrated to stimulate the production of proosteoclastogenic cytokines, such as IL-6, which act by inducing RANKL expression in osteoblasts that bind to osteoclasts, thereby activating new cells [10,11]. Decreased estrogen after menopause causes RANKL activity to be favored over OPG activity via the ERK1/2-MAPK signaling pathway, thus leading to bone resorption and bone loss [12,13].



IL-33 has different autocrine and paracrine functions: It can be a regulatory target of parathyroid hormone (PTH) and can, therefore, influence bone metabolism [14]. PTH acts on osteoblasts by increasing RANKL expression, which binds to RANK expressed in osteoclast precursors, thereby promoting the activation of osteoclasts and boosting bone resorption [15]. This action of PTH on osteoblasts triggers these cells to start producing MMP-3, which is a metalloproteinase associated with mineralized bone matrix degradation due to its direct action on osteoclasts [6, 16].

The increase in RANKL may also be associated with the induction of CXCL9/MIG, a chemokine responsible for osteoclast recruitment, thereby enhancing the process of bone resorption [17]. Chemokines control immune cell recruitment and are also involved in osteoclast progenitor trafficking [18]. Moreover, osteoblasts have receptors for CXCL10, CXCL8 and CXCL9, which bind to osteoclasts and, in turn, trigger RANKL expression and induce osteoclastogenesis and bone resorption [19].

Despite the studies that have been carried out so far, the profile of immune changes in osteoporotic patients is still inconclusive or has been analyzed in isolated studies whose different variables cannot be compared to one another. As life expectancy increases, disorders associated with hormonal change, such as osteoporosis, have been increasing considerably. Therefore, it is important to focus on studies aimed to find new targets or biomarkers to make treatment even more effective. This study aims to correlate and compare cytokine and chemokine levels in osteoporotic patients and patients without osteoporosis to better understand the pathogenesis and identify biomarkers of the disease.

## **2. Patients and Methods**

### **2.1. Ethics**

All procedures in this study were approved by the Research Ethics Committee of the University of Uberaba under protocol number 51827515.4.0000.5145, and all participants signed informed consent after clarifications had been provided.

### **2.2. Study group**

Peripheral blood samples were collected from 30 elderly patients, 18 female and 12 male patients, with osteoporotic fracture (T-score  $\leq -2.5$ ) (osteoporosis group).

Blood collection was performed at the orthopedics center of the Clinical Hospital of the Federal University of Triângulo Mineiro and of the Mário Palmério University Hospital of the University of Uberaba, in Uberaba, Minas Gerais state, Brazil. Patients with other bone diseases, fractures unrelated to osteoporosis, immunosuppressed patients, patients with malignant neoplasms, liver disorders, and those who did not agree to participate in the study weren't included.

Venous collection is normally collected in the morning, 24h after the bone reconstruction surgery indicated by the orthopedic physician. In this study, the sample was collected by venipuncture into a tube containing clot activator and separating gel. After 30 minutes, the sample was centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes to obtain serum, which was used to assess cytokine and chemokine levels.

### **2.4. Serum quantification of cytokines, and MMP-3 by ELISA**

Molecules of IL-17A, IL-17R, IL-6, IL-22, IL-23, IL-33, and MMP3 were analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's specifications. High-affinity polystyrene plates (Costar, Half Area) were sensitized with 50  $\mu$ l of anti-IL-23

monoclonal antibodies (2 $\mu$ g/mL, Mabtech AB, Stockholm, SW), IL-17R, IL-22 and leptin (4mg/mL, R&D Systems), and with IL-33 and MMP3 (0.8 $\mu$ g/mL, R&D Systems) diluted in PBS pH 7.2 and incubated for 18 hours at 4°C overnight. The plates were then washed with +0.05% Tween 20 PBS (Sigma) and blocked with 100  $\mu$ L of +1% BSA PBS (Sigma) at 4°C overnight. After that, they were washed, and 50  $\mu$ L of serum was added –diluted at 1:2 (IL-23, IL-6, IL-17A, IL-17R, IL-22 and IL-33) or at 1:40 (MMP-3), or at known levels of recombinant molecules (standard curve) – in 2% BSA PBS. Then, the plates were washed and incubated for 2 hours with 50  $\mu$ L of anti-IL-23 and IL-17A biotin-conjugated monoclonal antibody (1 $\mu$ g/mL, Mabtech AB - Stockholm, SW), IL-17R, IL-6, IL-22 and IL-33 (200ng/ml, R&D Systems), and MMP-3 (150ng/ml, R&D Systems). At the end of this step, they were washed again and incubated with 50  $\mu$ L alkaline phosphataseconjugated streptavidin (Sigma), diluted at 1:250 in 1% BSA PBS for two hours. Finally, enzymatic activity was determined by adding 50  $\mu$ L of tetramethylbenzidine (TMB) (BD Biosciences) and by incubation in a dark chamber for up to 30 minutes. The absorbance at 450 nm was determined on a microplate reader (Bio-RAD 3550 Microplate Reader). Results were expressed in pg/mL, obtained by linear regression from the standard curve of each analyte.

## **2.5. Quantification of chemokines by CBA**

Chemokines CCL-2 (MCP-1), CCL-5 (RANTES), CXCL-8 (IL-8), CXCL-9 (MIG) and CXCL-10 (IP-10) were measured using the Cytometric Bead Array (CBA) technique (BD BIOSCIENCES, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. Samples and recombinant cytokines were incubated with microspheres of different fluorescence intensities conjugated with a capture antibody specific for each cytokine. Then, PE-conjugated cytokine-specific antibodies were added. After incubation, the microspheres were washed with the solution of the kit itself (Wash Buffer) and analyzed on a FACSCalibur cytometer (BD

BIOSCIENCES) using the Cell Quest software (BD BIOSCIENCES). The cytokine-specific microspheres were separated as they emitted different fluorescence intensities at 660 nm, and so was the amount of cytokines conjugated to each microsphere, as they emitted fluorescence intensity at 585 nm. After data collection, of samples and recombinant cytokines, these data were analyzed in FCAP Array software 2.0 (SoftFlow, USA) and the levels of cytokines and chemokines were calculated from the standard curve.

## **2.6. Statistical analysis**

The collected data were entered into an Excel spreadsheet (Microsoft) and analyzed using StatView 4.0 (Abacus, USA) and Graphpad Prisma software. The results with non-normal distribution were analyzed with non-parametric Mann Whitney test. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

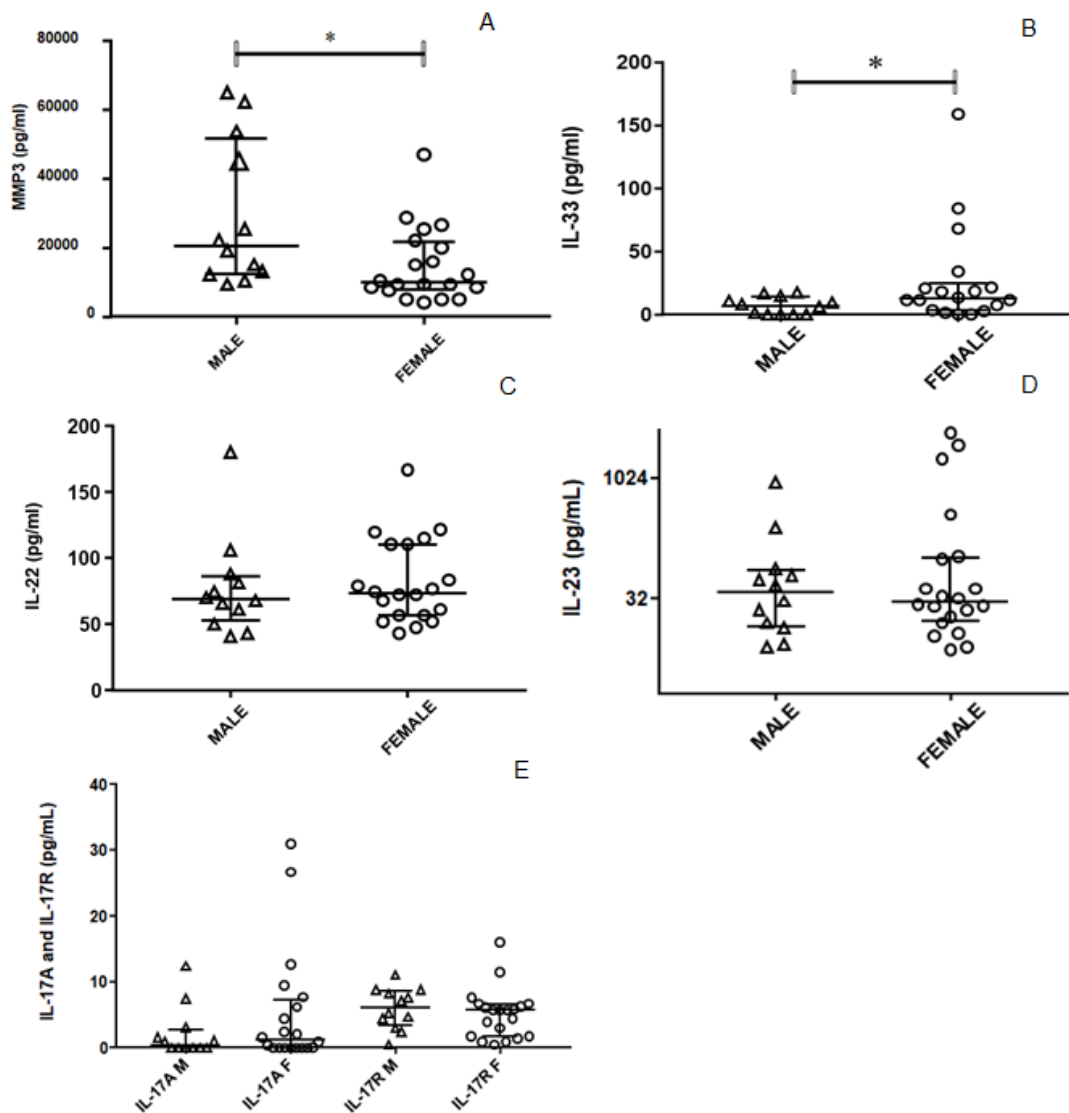
### **3. Results**

#### **3.1. Participant characteristics**

The study was divided into a group of 12 men and another of 18 women, both with osteoporosis, aged over 60 years. The mean age of female patients was  $80.05 \pm 9.47$  years, and the mean age of male patients was  $74.9 \pm 9.18$  years. Differences in the behavior of immunological factors were evaluated, such as cytokines IL-33, IL-22, IL-23, IL-6, IL-17A and IL-17R, chemokines CCL-5, CCL-2, CXCL-8, CXCL-9 and CXCL-10, and matrix 3 metalloproteinase.

#### **3.2. Association between cytokines, MMP-3 and osteoporosis**

Regarding cytokines and matrix metalloproteinases, MMP-3 levels are significantly increased in men (Mann Whitney;  $p = 0.0181$ ), and IL-33 levels are significantly increased in women (Mann Whitney;  $p = 0.0436$ ), when compared to men (Figures 1A and 1B). The other cytokines had no significant differences between the study groups, including IL-6 (data not shown).

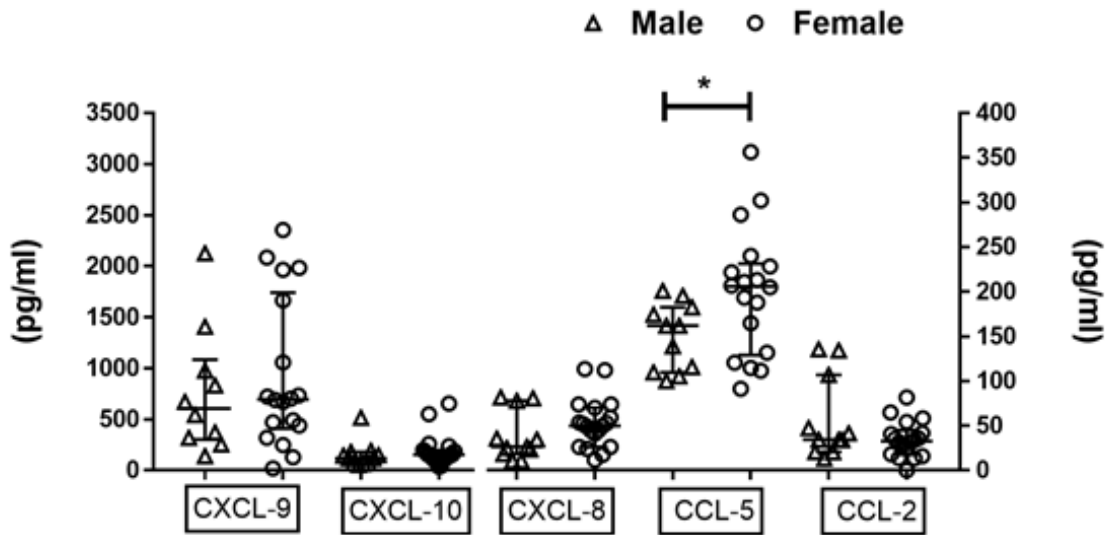


**Fig 1** Levels MMP-3, IL-33, IL-22, IL-23, IL-17A and IL-17R in osteoporotic male and female patients. Mann-Whitney, \* $p < 0.05$

The cytokines IL-22, IL-23 and IL-17 had very similar levels detected in men and women with osteoporosis, so there was no significant difference and both cytokines (Figure 1C, 1D and 1E). The cytokine IL-6 was not detected in many patients, showing very low levels in patients with osteoporosis (data not shown).

### 3.3 Association between chemokines and osteoporosis

As for chemokines, only CCL-5 achieved significantly lower levels in men (Mann Whitney;  $p = 0.0414$ ) when compared to women (Figure 2). The other chemokines had no differences between men and women.



**Fig 2** Levels of chemokines (CXCL10/IP-10, CCL2/MCP-1, CXCL9/MIG, CCL5/RANTES and CXCL8/IL-8) in the serum of osteoporotic patients. Mann-Whitney,  $*p < 0.05$

The chemokines CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10 and CCL2/MCP-1 was no significant difference between the studied groups. Similar to them, chemokine CXCL9/MIG also had no significant difference between men and women with osteoporosis, but its levels were slightly higher than other chemokines (Figure 2).

#### 4. Discussion and conclusion

Bone remodeling is imbalanced in osteoporosis, and that may be caused because hormonal and immunological factors play a role in the pathophysiology of the disease. In this study, the levels of serum cytokines, chemokines and MMP-3 were compared according to gender in patients with osteoporosis.

The results presented herein showed a different pattern of biomarkers associated with osteoporosis between genders for immunomediators molecules. Males with osteoporosis had significantly higher levels of MMP-3 and decreased of CCL-5. Conversely, women with osteoporosis had increased levels of IL-33.

MMP-3 has already been studied in an *in vitro* model with a synovial cell culture derived from patients with synovial osteoarthritis who underwent knee or hip arthroplasty. The authors observed high levels of proinflammatory cytokines and MMP-3, with the latter contributing to bone matrix degradation [20]. In our study, we found that increased MMP-3 in senile osteoporosis in men, suggesting that it may contribute to matrix degradation and the development of osteoporosis in the elderly.

Furthermore, in the case of rheumatoid arthritis, metalloproteinases showed significantly higher levels in male patients when compared to females [21]. Likewise, in the present study, MMP-3 levels are significantly increased in males with osteoporosis in comparison with the females. One of the known inflammatory markers related to aging is TNF- $\alpha$ , which has been shown to represent one of the cytokines that induce MMP-3 expression [22]. It was also seen that the regulatory factor of interferon 5 (IRF5) mediates the expression of MMP-3 induced by TNF- $\alpha$  in chondrocytes [23]. In an experimental model, the cytokine IL-1 significantly increased the expression of messenger RNA for MMP-3, which was associated with increased bone degradation [24]. These findings may explain, at least in



part, the gender and age differences of MMP-3 [25]. Thus, based on hormonal and inflammatory differences, MMP-3 appears to act with different intensity in males and females.

An *in vitro* study on femoral bone marrow cells from newborn mice showed that osteoclastogenesis is inhibited by the presence of IL-33, probably due to the inhibition of the nuclear factor of activated T-cells (NFAT) expression, which is the transcription factor for osteoclast differentiation, analyzed by the hybridization method [9]. IL-33 seems to play an important role in osteoblasts as well. *In vitro* studies on calvarial cells of IL-33-treated newborn mice showed that this cytokine was able to inhibit sclerostin in osteocytes, which appear to act on osteoblasts, as sclerostin inhibits the Wnt pathway that is responsible for the activation of osteoblast differentiation [14]. The diversity of mechanisms of action of IL-33 suggest that the increase or decrease of this cytokine may be associated with both osteoclast and osteoblast activity.

The effects of IL-33 on bone may vary depending on the stage of the disease and hormonal factors, and its final effect depends on the clinical course of the disease [26]. In women, IL-33 has a different effect, probably through estrogen-dependent pathways. IL-33 can also stimulate cytokines with dual (opposite) effects on osteoclastogenesis, stimulating the formation of osteoclasts. This occurs through the induction of the production of cytokines, such as IL-6, thereby contributing to osteoporosis by stimulating osteoblasts to produce more RANKL that bind to osteoclasts to activate them, thus acting as a positive regulator of osteoclastogenesis [27]. In our study, this cytokine was found increased in women, possibly also due to the natural aging process, and may contribute to the development of osteoporosis, but the levels of IL-6, in the patients of the present study, had no detected levels.

The cytokine IL-6 has been studied as capable of promoting the differentiation of osteoclasts from their precursors by stimulating the expression of RANKL [28], and can also

directly activate osteoclastic activity by independent mechanisms of RANKL [29]. And IL-17 also seems to stimulate osteoclast differentiation by increasing the expression of prostaglandin E2 in osteoblasts that will express osteoclast differentiation factor [30].

In an experimental study with rheumatoid arthritis, the cytokine IL-17 was found to inhibit osteoblast differentiation, proposing that this cytokine may limit bone formation in sites of the inflamed periosteum [31]. Thus, it can be observed that IL-17 acts to increase bone resorption and decrease formation, and by different mechanisms it contributes to osteoporosis when it presents high levels. Although the cytokines IL-6 and IL-17 play an important role in osteoporosis, in the patients in the present study, they had low levels detected, showing that they did not act effectively in both female and male osteoporosis patients, with no differences between genders when related to them.

IL-23 is considered an anti-resorptive cytokine, and low levels of this cytokine have been found in patients with osteoporosis [32]. Like IL-6 and IL-17, no differences were found in IL-23 levels in male and female osteoporosis patients.

Among chemokines, CCL5/RANTES has receptors expressed in primary osteoblasts, so they act as a chemoattractant to these cells by stimulating bone formation. It was also seen that they are reduced with increasing age [33]. In our study, these cells have significantly lower levels in men over 60 and with osteoporosis, compared to women with the same conditions. Thus, the work shows that these chemokines play an important role in the development of osteoporosis, especially in men.

Several chemokines have been shown to influence skeletal remodeling in physiological and pathological processes. The chemokines studied here stimulate the decrease in bone mass, with CXCL9 inhibiting bone formation and CCL2, CXCL8 and CXCL10 stimulating osteoclastogenesis [34]. Despite their important role, these chemotherapies do not seem to differ between male and female osteoporosis patients.

Therefore, the present study suggests that immune mediators changes are associated differently in osteoporosis in men and women. An increase in MMP-3 and decreased CCL5 may be an important factor in osteoporosis in men, whereas the disease seems to be associated with an increase in IL-33 in women.

### **Acknowledgement**

Leonardo Gaia, Fausto Silva, Pedro Favaro, Carlo Oliveira, Sanívia Pereira and Danila Malheiros Souza: Data Curation, Resources and Investigation. Danila Malheiros Souza, Marcos Silva, Ingrid Souza and Djalma Silva: Methodology and Formal analysis and Writing. Danila Malheiros Souza and Denise Rodrigues: Writing - Original Draft and Supervision. Virmondes Rodrigues: Formal analysis and Writing - Review & Editing revised the manuscript.

### **Conflicts of interest**

There are no conflicts of interest relevant to this manuscript.

### **Funding**

This work was supported by the University of Uberaba, the Federal University of Triangulo Mineiro; Professional Education Center – Cefores; Minas Gerais State Research Support Foundation – FAPEMIG; Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - CAPES and National Council for Scientific and Technological Development - CNPq.

## 5. References

- [1] Gali, J.C. (2001) Osteoporosis. *Acta Ortopédica Brasileira* 9(2): 53-62. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-78522001000200007>.
- [2] Kanis, J.A., et al., (2013) European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporosis international* 24(1): 23-57. <https://doi.org/10.1007/s00198-012-2074-y>
- [3] Franceschi, C., et al., (2000) Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 908: 244-54. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x>
- [4] Michaud, M., et al., (2013) Proinflammatory cytokines, aging, and age-related diseases. *J Am Med Dir Assoc* 14(12): 877-82. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2013.05.009>
- [5] Wang, L., et al., (2015) Osteoblast-induced osteoclast apoptosis by fas ligand/FAS pathway is required for maintenance of bone mass. *Cell Death Differ* 22(10): 1654-64. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.14>
- [6] Breckon, J.J., et al., (1999) Stromelysin (MMP-3) synthesis is up-regulated in estrogen-deficient mouse osteoblasts in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res* 14(11): 1880-90. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.11.1880>
- [7] Takayanagi, H., (2007) Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 7(4): 292-304. <https://doi.org/10.1038/nri2062>
- [8] Szekanecz, Z. and A.E. Koch, (2016) Successes and failures of chemokine-pathway targeting in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 12(1): 5-13. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.157>

[9] Schulze, J., et al., (2011) Interleukin-33 is expressed in differentiated osteoblasts and blocks osteoclast formation from bone marrow precursor cells. *J Bone Miner Res* 26(4): 704-17. <https://doi.org/10.1002/jbmr.269>

[10] Palmqvist, P., et al., (2002) 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* 169(6): 3353-62. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.6.3353>

[11] Moulin, D., et al., (2007) Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. *Cytokine* 40(3): 216-25. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.09.013>

[12] Tera Tde, M., et al., (2014) The RANK/ RANKL/ OPG interaction in the repair of autogenous bone grafts in female rats with estrogen deficiency. *Braz Oral Res* 28. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2014.vol28.0054>

[13] Wang, Y.D., et al., (2012) Selective regulation of osteoblastic OPG and RANKL by dehydroepiandrosterone through activation of the estrogen receptor beta-mediated MAPK signaling pathway. *Horm Metab Res* 44(7): 494-500. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1311567>

[14] Saleh, H., et al., (2011) Interleukin-33, a target of parathyroid hormone and oncostatin m, increases osteoblastic matrix mineral deposition and inhibits osteoclast formation in vitro. *Endocrinology* 152(5): 1911-22. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1268>

[15] Hofbauer, L.C., et al., (2014) Endocrine aspects of bone metastases. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2(6): 500-12. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(13\)70203-1](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70203-1)

[16] Jonitz-Heincke, A., et al., (2016) Contribution of human osteoblasts and macrophages to bone matrix degradation and proinflammatory cytokine release after exposure to abrasive endoprosthetic wear particles. *Mol Med Rep* 14(2): 1491-500. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5415>

[17] Khan, U.A., et al., (2014) Differential expression of chemokines, chemokine receptors and proteinases by foreign body giant cells (FBGCs) and osteoclasts. *J Cell Biochem* 115(7): 1290-8. <https://doi.org/10.1002/jcb.24781>

[18] Wang, C.T., et al., (2010) Over-expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL), inflammatory cytokines, and chemokines in periprosthetic osteolysis of loosened total hip arthroplasty. *Biomaterials* 31(1): 77-82. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.017>

[19] O'Brien, C.A., et al., (2008) Control of bone mass and remodeling by PTH receptor signaling in osteocytes. *PloS one* 3(8): e2942. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002942>

[20] Bondeson, J., et al., (2006) 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* 8(6): R187. <https://doi.org/10.1186/ar2099>

[21] Kodama, R., et al., (2018) Serum levels of matrix metalloproteinase-3 and autoantibodies related to rheumatoid arthritis in the general Japanese population and their association with osteoporosis and osteoarthritis: the ROAD study. *J Bone Miner Metab* 36(2): 246-253. <https://doi.org/10.1007/s00774-017-0834-7>

[22] Ågren, M.S., et al., (2015) Tumor necrosis factor- $\alpha$ -accelerated degradation of type I collagen in human skin is associated with elevated matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 ex vivo. *Eur J Cell Biol* 94(1): 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2014.10.001>

[23] Guo, L., et al., (2018) Interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates the expression of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) in human chondrocytes. *International immunopharmacology* 55: 231-236. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.11.035>

[24] Kusano, K., et al., (1998) Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2,-3,-9, and-13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology* 139(3): 1338-1345. <https://doi.org/10.1210/endo.139.3.5818>

[25] Maggio, M., et al., (2006) Correlation between testosterone and the inflammatory marker soluble interleukin-6 receptor in older men. *J Clin Endocrinol Metab* 91(1): 345-7. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-1097>

[26] Ginaldi, L., et al., (2019) Interleukin-33 serum levels in postmenopausal women with osteoporosis. *Scientific reports* 9(1): 3786. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40212-6>

[27] Yoshitake, F., et al., (2008) Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* 283(17): 11535-11540. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607999200>

[28] Adebajo OA, Moonga BS, Yamate T, Sun L, Minkin C, Abe E, et al. (1998) Mode of action of interleukin-6 on mature osteoclasts. Novel interactions with extracellular Ca<sup>2+</sup> sensing in the regulation of osteoclastic bone resorption. *J Cell Biol.* 142(5):1347-56. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.5.1347>

[29] Müller B. Cytokine imbalance in non-immunological chronic disease. (2002) *Cytokine.* 18(6):334-9. <https://doi.org/10.1006/cyto.2002.0882>

[30] Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, et al. (1999) IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* 103(9):1345-52. <https://doi.org/10.1172/JCI5703>

[31] Shaw AT, Maeda Y, Gravallesse EM. (2016) IL-17A deficiency promotes periosteal bone formation in a model of inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther.* 18(1):104. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-0998-x>

[32] Azizieh F, Raghupathy R, Shehab D, Al-Jarallah K, Gupta R. (2017) Cytokine profiles in osteoporosis suggest a proresorptive bias. *Menopause*. 24(9):1057-64. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000000885>

[33] Yano S, Mentaverri R, Kanuparthi D, Bandyopadhyay S, Rivera A, Brown EM, et al. Functional expression of beta-chemokine receptors in osteoblasts: role of regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in osteoblasts and regulation of its secretion by osteoblasts and osteoclasts. *Endocrinology*. 2005;146(5):2324-35. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0065>

[34] Brylka LJ, Schinke T. (2019) Chemokines in Physiological and Pathological Bone Remodeling. *Front Immunol*. 10:2182. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02182>



## 5. COMENTÁRIOS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A osteoporose é uma doença com alta prevalência em todo o mundo, afetando milhões de pessoas e é considerada um dos principais problemas de saúde pública por sua associação a fraturas com graves repercussões clínicas e sociais. Alguns estudos já mostraram que os fatores imunológicos exercem papel importante no processo de formação e reabsorção óssea, mas a osteoimunologia ainda é pouco entendida e por isso a importância desse estudo.

Nosso estudo teve como objetivo avaliar os níveis hormonais em pacientes com fraturas associadas a osteoporose comparadas com pacientes devido fraturas de alto impacto afim de elucidar como estão os níveis dos fatores estudados nesses pacientes. Foi visto que existem diferenças hormonais entre os gêneros na osteoporose. Em mulheres, os níveis significativamente menores de estradiol e vitamina D, e nos homens níveis significativamente maiores de paratormônio, parecem influenciar na doença. As diferenças dos fatores imunológicos também parecem agir de forma distinta em homens e mulheres. O aumento de MMP-3 e a diminuição de CCL5 pode ser um fator importante na osteoporose em homens, enquanto a doença parece estar associada com o aumento de IL-33 em mulheres.

## 6. CONCLUSÕES

Alterações hormonais e de citocinas estão associadas de maneira diferente na osteoporose entre homens e mulheres. Quando avaliada as alterações hormonais comparando a pacientes jovens com fratura de alto impacto foi visto que os hormônios interagem de forma diferente em pacientes do gênero masculino e feminino, visto que o aumento de paratormônio em homens contribui para osteoporose e a diminuição de estradiol e vitamina D nas mulheres têm papel importante nesse grupo.

E ainda, em relação aos fatores imunológicos, eles também parecem agir de forma distinta em homens e mulheres. Enquanto em homens o aumento de MMP-3 e a diminuição de CCL5 pode ser um fator importante na osteoporose desse grupo, o aumento de IL-33 parece agir na osteoporose em mulheres.

## 7. REFERÊNCIAS

- [1] T.D. Rachner, S. Khosla, L.C. Hofbauer, Osteoporosis: now and the future, *Lancet* 377(9773) (2011) 1276-87.
- [2] L.T. Duong, G.A. Rodan, Regulation of osteoclast formation and function, *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 2(1) (2001) 95-104.
- [3] J.H. Kim, N. Kim, Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation, *Journal of bone metabolism* 21(4) (2014) 233-41.
- [4] O. Verborgt, N.A. Tatton, R.J. Majeska, M.B. Schaffler, Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation?, *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 17(5) (2002) 907-14.
- [5] T. Suda, N. Takahashi, T.J. Martin, Modulation of osteoclast differentiation, *Endocrine reviews* 13(1) (1992) 66-80.
- [6] N. Takahashi, N. Udagawa, T. Suda, A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function, *Biochemical and biophysical research communications* 256(3) (1999) 449-55.
- [7] L.C. Hofbauer, C.A. Kuhne, V. Viereck, The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases, *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 4(3) (2004) 268-75.
- [8] D.M. Biskobing, X. Fan, J. Rubin, Characterization of MCSF-induced proliferation and subsequent osteoclast formation in murine marrow culture, *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 10(7) (1995) 1025-32.
- [9] N. Udagawa, N. Takahashi, E. Jimi, K. Matsuzaki, T. Tsurukai, K. Itoh, N. Nakagawa, H. Yasuda, M. Goto, E. Tsuda, K. Higashio, M.T. Gillespie, T.J. Martin, T. Suda, Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand, *Bone* 25(5) (1999) 517-23.
- [10] S. Tanaka, Signaling axis in osteoclast biology and therapeutic targeting in the RANKL/RANK/OPG system, *American journal of nephrology* 27(5) (2007) 466-78.
- [11] P. Marie, P. Halbout, OPG/RANKL-Implication et cible thérapeutique dans l'ostéoporose, *médecine/sciences* 24(1) (2008) 105-110.
- [12] M. Shimizu, T. Sasaki, A. Ishihara, R. Furuya, T. Kawawa, Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats, *Journal of electron microscopy* 47(5) (1998) 517-26.
- [13] G. Eghbali-Fatourehchi, S. Khosla, A. Sanyal, W.J. Boyle, D.L. Lacey, B.L. Riggs, Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women, *The Journal of clinical investigation* 111(8) (2003) 1221-30.
- [14] S. Kousteni, L. Han, J.R. Chen, M. Almeida, L.I. Plotkin, T. Bellido, S.C. Manolagas, Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids, *The Journal of clinical investigation* 111(11) (2003) 1651-64.
- [15] S. Kousteni, T. Bellido, L.I. Plotkin, C.A. O'Brien, D.L. Bodenner, L. Han, K. Han, G.B. DiGregorio, J.A. Katzenellenbogen, B.S. Katzenellenbogen, P.K. Roberson, R.S. Weinstein, R.L. Jilka, S.C. Manolagas, Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity, *Cell* 104(5) (2001) 719-30.
- [16] S. Khosla, M.J. Oursler, D.G. Monroe, Estrogen and the skeleton, *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 23(11) (2012) 576-81.
- [17] Y. Gui, Z. Duan, X. Qiu, W. Tang, H.J. Gober, D. Li, L. Wang, Multifarious effects of 17-beta-estradiol on apolipoprotein E receptors gene expression during osteoblast differentiation in vitro, *Bioscience trends* 10(1) (2016) 54-66.

- [18] H.G. Burger, Physiological principles of endocrine replacement: estrogen, *Hormone research* 56 Suppl 1 (2001) 82-5.
- [19] L. Hong, A. Colpan, I.A. Peptan, Modulations of 17-beta estradiol on osteogenic and adipogenic differentiations of human mesenchymal stem cells, *Tissue engineering* 12(10) (2006) 2747-53.
- [20] S.E. Fawell, R. White, S. Hoare, M. Sydenham, M. Page, M.G. Parker, Inhibition of estrogen receptor-DNA binding by the "pure" antiestrogen ICI 164,384 appears to be mediated by impaired receptor dimerization, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(17) (1990) 6883-7.
- [21] S. Wallach, G. Rousseau, L. Martin, M. Azria, Effects of calcitonin on animal and in vitro models of skeletal metabolism, *Bone* 25(5) (1999) 509-16.
- [22] P.M. Sexton, D.M. Findlay, T.J. Martin, Calcitonin, *Current medicinal chemistry* 6(11) (1999) 1067-93.
- [23] T.J. Martin, N.A. Sims, Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption, *Trends in molecular medicine* 11(2) (2005) 76-81.
- [24] B. Dawson-Hughes, S.S. Harris, E.A. Krall, G.E. Dallal, Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older, *The New England journal of medicine* 337(10) (1997) 670-6.
- [25] E.S. LeBlanc, C.M. Nielson, L.M. Marshall, J.A. Lapidus, E. Barrett-Connor, K.E. Ensrud, A.R. Hoffman, G. Laughlin, C. Ohlsson, E.S. Orwoll, G. Osteoporotic Fractures in Men Study, The effects of serum testosterone, estradiol, and sex hormone binding globulin levels on fracture risk in older men, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 94(9) (2009) 3337-46.
- [26] D. Vanderschueren, L. Vandenput, S. Boonen, M.K. Lindberg, R. Bouillon, C. Ohlsson, Androgens and bone, *Endocrine reviews* 25(3) (2004) 389-425.
- [27] D.W. Dempster, F. Cosman, E.S. Kurland, H. Zhou, J. Nieves, L. Woelfert, E. Shane, K. Plavetic, R. Muller, J. Bilezikian, R. Lindsay, Effects of daily treatment with parathyroid hormone on bone microarchitecture and turnover in patients with osteoporosis: a paired biopsy study, *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 16(10) (2001) 1846-53.
- [28] R.M. Neer, C.D. Arnaud, J.R. Zanchetta, R. Prince, G.A. Gaich, J.Y. Reginster, A.B. Hodsmann, E.F. Eriksen, S. Ish-Shalom, H.K. Genant, O. Wang, B.H. Mitlak, Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis, *The New England journal of medicine* 344(19) (2001) 1434-41.
- [29] T. Bellido, V. Saini, P.D. Pajevic, Effects of PTH on osteocyte function, *Bone* 54(2) (2013) 250-7.
- [30] M.N. Weitzmann, R. Pacifici, Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale, *The Journal of clinical investigation* 116(5) (2006) 1186-94.
- [31] R.R. McLean, Proinflammatory cytokines and osteoporosis, *Current osteoporosis reports* 7(4) (2009) 134-9.
- [32] J.P. David, G. Schett, TNF and bone, *Current directions in autoimmunity* 11 (2010) 135-44.
- [33] T. Fujii, H. Kitaura, K. Kimura, Z.W. Hakami, T. Takano-Yamamoto, 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* 51(4) (2012) 771-80.
- [34] H. Saleh, D. Eeles, J.M. Hodge, G.C. Nicholson, R. Gu, S. Pompolo, M.T. Gillespie, J.M. Quinn, Interleukin-33, a target of parathyroid hormone and oncostatin m, increases osteoblastic matrix mineral deposition and inhibits osteoclast formation in vitro, *Endocrinology* 152(5) (2011) 1911-22.

- [35] Y. Lee, The role of interleukin-17 in bone metabolism and inflammatory skeletal diseases, *BMB reports* 46(10) (2013) 479-83.
- [36] N.E. McGregor, I.J. Poulton, E.C. Walker, S. Pompolo, J.M. Quinn, T.J. Martin, N.A. Sims, Ciliary neurotrophic factor inhibits bone formation and plays a sex-specific role in bone growth and remodeling, *Calcified tissue international* 86(3) (2010) 261-70.
- [37] S. Kwan Tat, M. Padrines, S. Theoleyre, D. Heymann, Y. Fortun, IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology, *Cytokine & growth factor reviews* 15(1) (2004) 49-60.
- [38] P. Palmqvist, E. Persson, H.H. Conaway, U.H. Lerner, 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, *Journal of immunology* 169(6) (2002) 3353-62.
- [39] M.A. Karsdal, G. Schett, P. Emery, O. Harari, I. Byrjalsen, A. Kenwright, A.C. Bay-Jensen, A. Platt, IL-6 receptor inhibition positively modulates bone balance in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to anti-tumor necrosis factor therapy: biochemical marker analysis of bone metabolism in the tocilizumab RADIATE study (NCT00106522), *Seminars in arthritis and rheumatism* 42(2) (2012) 131-9.
- [40] N.A. Sims, L.Y. Chia, Regulation of sclerostin expression by paracrine and endocrine factors, *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism* 10(2) (2012) 98-107.
- [41] N.A. Sims, Cell-specific paracrine actions of IL-6 family cytokines from bone, marrow and muscle that control bone formation and resorption, *The international journal of biochemistry & cell biology* 79 (2016) 14-23.
- [42] K.W. Kim, H.R. Kim, J.Y. Park, J.S. Park, H.J. Oh, Y.J. Woo, M.K. Park, M.L. Cho, S.H. Lee, Interleukin-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts, *Arthritis and rheumatism* 64(4) (2012) 1015-23.
- [43] L. Zhang, J.M. Li, X.G. Liu, D.X. Ma, N.W. Hu, Y.G. Li, W. Li, Y. Hu, S. Yu, X. Qu, M.X. Yang, A.L. Feng, G.H. Wang, Elevated Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis, *Journal of clinical immunology* 31(4) (2011) 606-14.
- [44] D.M. Roelvelde, M.I. Koenders, The role of the Th17 cytokines IL-17 and IL-22 in Rheumatoid Arthritis pathogenesis and developments in cytokine immunotherapy, *Cytokine* 74(1) (2015) 101-7.
- [45] L.F. da Rocha, Jr., A.L. Duarte, A.T. Dantas, H.A. Mariz, R. Pitta Ida, S.L. Galdino, M.G. Pitta, Increased serum interleukin 22 in patients with rheumatoid arthritis and correlation with disease activity, *The Journal of rheumatology* 39(7) (2012) 1320-5.
- [46] W.P. Arend, G. Palmer, C. Gabay, IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines, *Immunological reviews* 223 (2008) 20-38.
- [47] J. Schmitz, A. Owyang, E. Oldham, Y. Song, E. Murphy, T.K. McClanahan, G. Zurawski, M. Moshrefi, J. Qin, X. Li, D.M. Gorman, J.F. Bazan, R.A. Kastelein, 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* 23(5) (2005) 479-90.
- [48] M.J. Townsend, P.G. Fallon, D.J. Matthews, H.E. Jolin, A.N. McKenzie, T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses, *The Journal of experimental medicine* 191(6) (2000) 1069-76.
- [49] J. Schulze, T. Bickert, F.T. Beil, M.M. Zaiss, J. Albers, K. Wintges, T. Streichert, K. Klaetschke, J. Keller, T.N. Hissnauer, A.S. Spiro, A. Gessner, G. Schett, M. Amling, A.N. McKenzie, A.K. Horst, T. Schinke, Interleukin-33 is expressed in differentiated osteoblasts and blocks osteoclast formation from bone marrow precursor cells, *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 26(4) (2011) 704-17.

- [50] J. Keller, P. Catala-Lehnen, K. Wintges, J. Schulze, T. Bickert, W. Ito, A.K. Horst, M. Amling, T. Schinke, Transgenic over-expression of interleukin-33 in osteoblasts results in decreased osteoclastogenesis, *Biochemical and biophysical research communications* 417(1) (2012) 217-22.
- [51] M. Kurowska-Stolarska, P. Kewin, G. Murphy, R.C. Russo, B. Stolarski, C.C. Garcia, M. Komai-Koma, N. Pitman, Y. Li, W. Niedbala, A.N. McKenzie, M.M. Teixeira, F.Y. Liew, D. Xu, IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4, *Journal of immunology* 181(7) (2008) 4780-90.
- [52] A.A. Chackerian, E.R. Oldham, E.E. Murphy, J. Schmitz, S. Pflanz, R.A. Kastelein, IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex, *Journal of immunology* 179(4) (2007) 2551-5.
- [53] J. Gross, C.M. Lapiere, Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48 (1962) 1014-22.
- [54] J.J. Breckon, S. Papaioannou, L.W. Kon, A. Tumber, R.M. Hembry, G. Murphy, J.J. Reynolds, M.C. Meikle, Stromelysin (MMP-3) synthesis is up-regulated in estrogen-deficient mouse osteoblasts in vivo and in vitro, *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 14(11) (1999) 1880-90.
- [55] P.A. Hill, G. Murphy, A.J. Docherty, R.M. Hembry, T.A. Millican, J.J. Reynolds, M.C. Meikle, The effects of selective inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP-1 in isolated osteoclasts, *Journal of cell science* 107 ( Pt 11) (1994) 3055-64.
- [56] R. Hall, D. Septier, G. Embery, M. Goldberg, Stromelysin-1 (MMP-3) in forming enamel and predentine in rat incisor-coordinated distribution with proteoglycans suggests a functional role, *The Histochemical journal* 31(12) (1999) 761-70.
- [57] H. Birkedal-Hansen, Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases, *Journal of periodontology* 64(5 Suppl) (1993) 474-84.
- [58] Y. Shen, I.G. Winkler, V. Barbier, N.A. Sims, J. Hendy, J.P. Levesque, Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) regulates hematopoiesis and bone formation in vivo, *PloS one* 5(9) (2010).
- [59] Z. Szekanecz, A.E. Koch, Successes and failures of chemokine-pathway targeting in rheumatoid arthritis, *Nature reviews. Rheumatology* 12(1) (2016) 5-13.
- [60] U.A. Khan, S.M. Hashimi, S. Khan, J. Quan, M.M. Bakr, M.R. Forwood, N.M. Morrison, Differential expression of chemokines, chemokine receptors and proteinases by foreign body giant cells (FBGCs) and osteoclasts, *Journal of cellular biochemistry* 115(7) (2014) 1290-8.
- [61] E.Y. Lee, Z.H. Lee, Y.W. Song, The interaction between CXCL10 and cytokines in chronic inflammatory arthritis, *Autoimmunity reviews* 12(5) (2013) 554-7.
- [62] C.T. Wang, Y.T. Lin, B.L. Chiang, S.S. Lee, S.M. Hou, Over-expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL), inflammatory cytokines, and chemokines in periprosthetic osteolysis of loosened total hip arthroplasty, *Biomaterials* 31(1) (2010) 77-82.
- [63] K.P. Lam, Y.T. Chu, C.H. Kuo, W.L. Wang, T.S. Tok, Y.Y. Chin, S.C. Chen, C.H. Hung, Suppressive effects of procaterol on expression of IP-10/CXCL 10 and RANTES/CCL 5 by bronchial epithelial cells, *Inflammation* 34(4) (2011) 238-46.
- [64] M.S. Kim, C.J. Day, N.A. Morrison, MCP-1 is induced by receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, promotes human osteoclast fusion, and rescues granulocyte macrophage colony-stimulating factor suppression of osteoclast formation, *The Journal of biological chemistry* 280(16) (2005) 16163-9.

- [65] K. Fuller, J.M. Owens, T.J. Chambers, Macrophage inflammatory protein-1 alpha and IL-8 stimulate the motility but suppress the resorption of isolated rat osteoclasts, *Journal of immunology* 154(11) (1995) 6065-72.
- [66] J.L. Pathak, A.D. Bakker, P. Verschuere, W.F. Lems, F.P. Luyten, J. Klein-Nulend, N. Bravenboer, CXCL8 and CCL20 Enhance Osteoclastogenesis via Modulation of Cytokine Production by Human Primary Osteoblasts, *PloS one* 10(6) (2015) e0131041.
- [67] S. Mahalingam, G. Chaudhri, C.L. Tan, A. John, P.S. Foster, G. Karupiah, Transcription of the interferon gamma (IFN-gamma)-inducible chemokine Mig in IFN-gamma-deficient mice, *The Journal of biological chemistry* 276(10) (2001) 7568-74.
- [68] H.B. Kwak, S.W. Lee, H.M. Jin, H. Ha, S.H. Lee, S. Takeshita, S. Tanaka, H.M. Kim, H.H. Kim, Z.H. Lee, Monokine induced by interferon-gamma is induced by receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and is involved in osteoclast adhesion and migration, *Blood* 105(7) (2005) 2963-9.
- [69] L. Dalle Carbonare, M.T. Valenti, M. Zanatta, L. Donatelli, V. Lo Cascio, Circulating mesenchymal stem cells with abnormal osteogenic differentiation in patients with osteoporosis, *Arthritis and rheumatism* 60(11) (2009) 3356-65.
- [70] Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group, *World Health Organization technical report series* 843 (1994) 1-129.
- [71] E. Rodrigues, Osteoporose ameaça 30 milhões de brasileiros, *Revista Comciência*, disponível em: < <http://www.eesc.usp.br/bioeng/resumomonoticia.php> (2004).
- [72] J.A. Kanis, Assessment of osteoporosis at the primary health-care level, *Technical report*, 2007.
- [73] R. Burge, B. Dawson-Hughes, D.H. Solomon, J.B. Wong, A. King, A. Tosteson, Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005–2025, *Journal of bone and mineral research* 22(3) (2007) 465-475.
- [74] L.G. Oliveira, Osteoporose: guia para diagnóstico, prevenção e tratamento, *Osteoporose: guia para diagnóstico, prevenção e tratamento* 2002.
- [75] M.P.G. de Souza, Diagnóstico e tratamento da osteoporose, *Rev Bras Ortop* 45(3) (2010) 220-9.
- [76] NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, March 7-29, 2000: highlights of the conference, *Southern medical journal* 94(6) (2001) 569-73.
- [77] A.V. Stazi, B. Trinti, Risk of osteoporosis in endocrine disorders and celiac disease, *Annali dell'Istituto superiore di sanita* 43(4) (2007) 430-3.
- [78] D. Marshall, O. Johnell, H. Wedel, Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures, *Bmj* 312(7041) (1996) 1254-1259.
- [79] B. Langdahl, S. Ferrari, D.W. Dempster, Bone modeling and remodeling: potential as therapeutic targets for the treatment of osteoporosis, *Therapeutic advances in musculoskeletal disease* 8(6) (2016) 225-235.
- [80] A. Bertuglia, M. Lacourt, C. Girard, G. Beauchamp, H. Richard, S. Laverty, Osteoclasts are recruited to the subchondral bone in naturally occurring post-traumatic equine carpal osteoarthritis and may contribute to cartilage degradation, *Osteoarthritis and cartilage* 24(3) (2016) 555-66.
- [81] K. Mukherjee, N. Chattopadhyay, Pharmacological inhibition of cathepsin K: A promising novel approach for postmenopausal osteoporosis therapy, *Biochemical pharmacology* 117 (2016) 10-9.
- [82] M.B. Dobbs, J. Buckwalter, C. Saltzman, Osteoporosis: the increasing role of the orthopaedist, *The Iowa orthopaedic journal* 19 (1999) 43-52.

- [83] S. Khosla, B.L. Riggs, Pathophysiology of age-related bone loss and osteoporosis, *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 34(4) (2005) 1015-30, xi.
- [84] G.A. Rodan, T.J. Martin, Therapeutic approaches to bone diseases, *Science* 289(5484) (2000) 1508-14.
- [85] L.C. Hofbauer, M. Schoppet, Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases, *Jama* 292(4) (2004) 490-5.
- [86] T.J. Martin, Current, new and emerging anti-resorptive drugs; antibody blockade of RANKL action, *IBMS BoneKEy* 3 (2006) 42.
- [87] H. Forsblad D'Elia, A. Larsen, E. Waltbrand, G. Kvist, D. Mellstrom, T. Saxne, C. Ohlsson, E. Nordborg, H. Carlsten, Radiographic joint destruction in postmenopausal rheumatoid arthritis is strongly associated with generalised osteoporosis, *Annals of the rheumatic diseases* 62(7) (2003) 617-23.
- [88] L. Sinigaglia, A. Nervetti, Q. Mela, G. Bianchi, A. Del Puente, O. Di Munno, B. Frediani, F. Cantatore, R. Pellerito, S. Bartolone, G. La Montagna, S. Adami, A multicenter cross sectional study on bone mineral density in rheumatoid arthritis. Italian Study Group on Bone Mass in Rheumatoid Arthritis, *The Journal of rheumatology* 27(11) (2000) 2582-9.
- [89] C. Roggia, Y. Gao, S. Cenci, M.N. Weitzmann, G. Toraldo, G. Isaia, R. Pacifici, Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(24) (2001) 13960-5.
- [90] J.Z. Fan, L. Yang, G.L. Meng, Y.S. Lin, B.Y. Wei, J. Fan, H.M. Hu, Y.W. Liu, S. Chen, J.K. Zhang, Q.Z. He, Z.J. Luo, J. Liu, Estrogen improves the proliferation and differentiation of hBMSCs derived from postmenopausal osteoporosis through notch signaling pathway, *Molecular and cellular biochemistry* 392(1-2) (2014) 85-93.
- [91] K. Bhukhai, K. Suksen, N. Bhummaphan, K. Janjorn, N. Thongon, D. Tantikanlayaporn, P. Piyachaturawat, A. Suksamrarn, A. Chairoungdua, A phytoestrogen diarylheptanoid mediates estrogen receptor/Akt/glycogen synthase kinase 3beta protein-dependent activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway, *The Journal of biological chemistry* 287(43) (2012) 36168-78.
- [92] A.M. Matsumoto, Andropause: clinical implications of the decline in serum testosterone levels with aging in men, *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 57(2) (2002) M76-99.
- [93] T.G. Travison, A.B. Araujo, V. Kupelian, A.B. O'Donnell, J.B. McKinlay, The relative contributions of aging, health, and lifestyle factors to serum testosterone decline in men, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92(2) (2007) 549-55.
- [94] H.A. Fink, S.K. Ewing, K.E. Ensrud, E. Barrett-Connor, B.C. Taylor, J.A. Cauley, E.S. Orwoll, Association of testosterone and estradiol deficiency with osteoporosis and rapid bone loss in older men, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91(10) (2006) 3908-15.
- [95] M. Dang, A.J. Koh, X. Jin, L.K. McCauley, P.X. Ma, Local pulsatile PTH delivery regenerates bone defects via enhanced bone remodeling in a cell-free scaffold, *Biomaterials* 114 (2016) 1-9.
- [96] A. Camirand, D. Goltzman, A. Gupta, M. Kaouass, D. Panda, A. Karaplis, The Role of Parathyroid Hormone-Related Protein (PTHrP) in Osteoblast Response to Microgravity: Mechanistic Implications for Osteoporosis Development, *PloS one* 11(7) (2016) e0160034.
- [97] S. Khosla, Minireview: the OPG/RANKL/RANK system, *Endocrinology* 142(12) (2001) 5050-5.
- [98] P. Charles, Calcium absorption and calcium bioavailability, *Journal of internal medicine* 231(2) (1992) 161-8.



- [99] R.P. Heaney, R.R. Recker, M.R. Stegman, A.J. Moy, Calcium absorption in women: relationships to calcium intake, estrogen status, and age, *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 4(4) (1989) 469-75.
- [100] A.W. Norman, Intestinal calcium absorption: a vitamin D-hormone-mediated adaptive response, *The American journal of clinical nutrition* 51(2) (1990) 290-300.
- [101] J.S. Adams, V. Kantorovich, C. Wu, M. Javanbakht, B.W. Hollis, Resolution of vitamin D insufficiency in osteopenic patients results in rapid recovery of bone mineral density, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84(8) (1999) 2729-30.
- [102] H.A. Bischoff-Ferrari, B. Dawson-Hughes, W.C. Willett, H.B. Staehelin, M.G. Bazemore, R.Y. Zee, J.B. Wong, Effect of Vitamin D on falls: a meta-analysis, *Jama* 291(16) (2004) 1999-2006.
- [103] F.A. Sylvester, An update on bone abnormalities associated with gastrointestinal and liver disease, *The Endocrinologist* 11(2) (2001) 77-85.
- [104] W. Huang, B. Carlsen, G. Rudkin, M. Berry, K. Ishida, D.T. Yamaguchi, T.A. Miller, Osteopontin is a negative regulator of proliferation and differentiation in MC3T3-E1 pre-osteoblastic cells, *Bone* 34(5) (2004) 799-808.
- [105] S. Cenci, M.N. Weitzmann, C. Roggia, N. Namba, D. Novack, J. Woodring, R. Pacifici, Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha, *The Journal of clinical investigation* 106(10) (2000) 1229-37.
- [106] T.J. Yun, P.M. Chaudhary, G.L. Shu, J.K. Frazer, M.K. Ewings, S.M. Schwartz, V. Pascual, L.E. Hood, E.A. Clark, OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40, *The Journal of Immunology* 161(11) (1998) 6113-6121.
- [107] P. Pietschmann, D. Mechtcheriakova, A. Meshcheryakova, U. Föger-Samwald, I. Ellinger, Immunology of osteoporosis: a mini-review, *Gerontology* 62(2) (2016) 128-137.

## 8. ANEXOS

## Anexo 1: Comprovante do aceite para publicação do artigo 1

**Encontro:** 26 de novembro de 2020  
**Para:** "Denise Rodrigues" denise.rodrigues@uniube.br  
**De:** "Revista Brasileira de Ortopedia" rbo@sbot.org.br  
**Sujeito:** Ref.: Sra. Nº RBO-D-20-00280 Avaliação da influência hormonal em pacientes com fraturas atribuídas a osteoporose

Ref.: Sra. Nº RBO-D-20-00280  
Avaliação da influência hormonal em pacientes com fraturas atribuídas a osteoporose  
Revista Brasileira de Ortopedia

Prezado Rodrigues,

Tenho o prazer de informar que seu artigo foi aceite para publicação.

Seu manuscrito aceite será transferido para nosso departamento de produção. Enquanto isso, você deverá preencher uma série de formulários online necessários para publicação. Se precisarmos de informações adicionais de você durante o processo de produção, entraremos em contato.

Obrigado por enviar seu trabalho para a Revista Brasileira de Ortopedia. Esperamos que você nos considere novamente para envios futuros.

Atenciosamente,

Sergio L. Checchia  
Editor-Chefe  
Revista Brasileira de Ortopedia

\*\*\*\*\*

Em conformidade com os regulamentos de proteção de dados, você pode solicitar a remoção de seus dados pessoais de registro a qualquer momento. (Use o seguinte URL: <https://www.editorialmanager.com/rbo/login.asp?a=r>). Entre em contato com o escritório da publicação se tiver alguma dúvida.

## Anexo 2: Comprovante de submissão do artigo 2

---

Dear Dr. Rodrigues,

Please be aware that due to annual leave and the COVID-19 pandemic, processing and peer reviewing manuscripts may take longer than usual.

RE: Immune mediators serum levels are distinctly associated with osteoporosis in male and female patients

Authors: SOUZA, DANILA; Gaia, Leonardo ; Silva, Djalma; Silva, Marcos; Oliveira, Carlo; Souza, Ingrid; Sousa, Fausto; Favaro, Pedro Ivo; Pereira, Sanivia; Rodrigues, Virmondes; Rodrigues, Denise

Manuscript ID: CEI-2020-8776

Thank you for submitting the above manuscript to 'Clinical and Experimental Immunology'. Your manuscript will be seen by an editor for an initial assessment shortly. Following this assessment it will be sent out for review in due course. In all future correspondence concerning this manuscript, please quote the manuscript reference number (CEI-2020-8776).

You can follow the progress of your manuscript by logging on periodically to Scholar One Manuscripts using your User ID and Password.

The status of your manuscript will be displayed in your author centre.

If you require any further assistance/information please do not hesitate to contact the editorial office.

Yours sincerely  
Matt Perryman  
Clinical and Experimental Immunology

Tel: +44 (0) 20 3019 5909

Fax: +44 (0) 20 3019 5902

[imm@immunology.org](mailto:imm@immunology.org)

## Anexo 3: 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: 38.055-000

UF: MG

Município: UBERABA

Telefone: (34)3319-8811

Fax: (34)3314-8010

E-mail: cep@uniube.br

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