

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde

ALEXANDRE DOMINGUES BARBOSA

**Perfil de expressão dos genes *SOST*, *LRP5*, *DKK1*, *WNT2*,
WNT16 e *BMP2* da via Wnt de sinalização em pacientes
osteoporóticos em uso de bisfosfonatos**

Recife

2018

ALEXANDRE DOMINGUES BARBOSA

**Perfil de expressão dos genes *SOST*, *LRP5*, *DKK1*, *WNT2*,
WNT16 e *BMP2* da via Wnt de sinalização em pacientes
osteoporóticos em uso de bisfosfonatos**

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof^a Dr^a Paula Sandrin-Garcia

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Barbosa, Alexandre Domingues

Perfil de expressão dos genes SOST, LRP5, DKK1, WNT16, BMP2 da via Wnt de sinalização em pacientes osteoporóticos em uso de bisfosfonatos/ Alexandre Domingues Barbosa- 2018.

106 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Paula Sandrin-Garcia

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2018.

Inclui referências, apêndices e anexos

1. Osteoporose 2. Expressão gênica 3. Proteínas I. Sandrin-Garcia, Paula (orient.) II. Título

616.716

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-298

ALEXANDRE DOMINGUES BARBOSA

Perfil de expressão dos genes *SOST*, *LRP5*, *DKK1*, *WNT2*, *WNT16* e *BMP2* da via Wnt de sinalização em pacientes osteoporóticos em uso de bisfosfonatos

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovado em 08 / 03 / 2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Paula Sandrin-Garcia (orientadora)

Professora Adjunto, Dept°. Genética - CB/UFPE
Pesquisadora do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA/UFPE

Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior (examinador interno)

Professor Titular do departamento de Bioquímica - CB/UFPE.
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde do LIKA/UFPE

Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior (examinador interno)

Professor Adjunto, Dept°. Patologia - CCS/UFPE
Pesquisador do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA/UFPE

Dr. André de Souza Cavalcanti (examinador externo)

Professor do Departamento Materno Infantil da UFPE
Coordenador do Ambulatório de Reumatologia Pediátrica do HC/UFPE.

Dr. Thiago Sotero Fragoso (examinador externo)

Professor Adjunto do Serviço de Reumatologia do HU/UFAL
Coordenador do Serviço de Reumatologia do HU/UFAL

Recife

2018

Dedico este trabalho às quatro mulheres de minha vida: minha mãe e minha esposa pelo apoio, dedicação e incentivo; e minhas filhas pelo amor, alegria e carinho renovadores.

AGRADECIMENTOS

A realização desta tese de doutorado contou com importantes apoios e incentivos sem os quais não se tornaria uma realidade e aos quais serei sempre grato.

À DEUS que orienta a caminhada da minha vida, me engrandece e me fortalece a cada dia.

À Profa. Ângela Duarte, exemplo de profissional, pelas suas orientações e oportunidades em minha vida profissional.

À Profa. Paula Sandrin-Garcia, minha orientadora, pela sua total confiança e disponibilidade, pelas opiniões, críticas e colaboração para a realização deste trabalho.

À amiga Camilla que com seu apoio irrestrito contribuiu para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao amigo Thiago, incentivador para a realização desta Pós-Graduação.

A minha irmã Fernanda pelo incentivo e apoio.

Aos residentes e pacientes do serviço de reumatologia do HC-UFPE pelas suas contribuições a este projeto.

“Ainda que maldigamos o envelhecimento, é ele que nos traz a aceitação das ambiguidades, das diferenças, do contraditório e abre espaço para uma diversidade de experiências com as quais nem sonhávamos anteriormente.”

(Drauzio Varella, 2016)

RESUMO

A osteoporose é a doença osteometabólica mais frequente na mulher pós-menopausada e de incidência crescente na população mundial devido ao aumento da longevidade. Produz comprometimento na qualidade e na densidade mineral óssea que podem levar a fraturas por fragilidade em locais como fêmur, coluna vertebral e punho. Devido às fraturas, a doença apresenta elevada morbimortalidade nos indivíduos acometidos. Apesar do surgimento de novas classes terapêuticas para o tratamento da osteoporose, as drogas de primeira linha são representadas pelos bisfosfonatos que têm como alvo as células osteoclásticas responsáveis pela reabsorção óssea. Por outro lado, a atividade anabólica dos osteoblastos, células formadoras de osso, é determinada pela atividade da via Wnt de sinalização. Sabendo que modificações na função das proteínas que compõem esta via podem gerar alterações na massa óssea, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão dos genes *SOST*, *LRP5*, *DKK1*, *WNT2*, *WNT16* e *BMP2* da via Wnt de sinalização em pacientes osteoporóticos em uso de bisfosfonato oral, alendronato de sódio. O grupo amostral foi composto por 695 mulheres em período de pós-menopausa atendidas na Divisão de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco no período de 2011 até 2017. Deste total, 90 mulheres foram selecionadas para os ensaios de expressão. Os indivíduos avaliados foram divididos em 03 subgrupos: 30 osteoporóticos, 29 osteopênicos e 27 indivíduos saudáveis. O perfil de expressão dos genes da via Wnt, *SOST*, *LRP5*, *DKK1*, *WNT2*, *WNT16* e *BMP2*, foi avaliado pelo método de PCR em tempo real quantitativa (qPCR) utilizando primers ou sondas Taqman em equipamento ABI 7500 (Thermo Fisher). Os resultados mostraram aumento da expressão gênica do *DKK1* com Fold Change (FC) = 31 nos pacientes osteopênicos, enquanto que nos pacientes osteoporóticos em uso de bisfosfonatos não houve aumento relevante da expressão (FC=1,25), quando ambos os subgrupos foram comparados com os controles. Também observamos aumento da expressão dos genes *WNT2* e *WNT16* (FC= 5,89 e 90,32 respectivamente) no subgrupo de pacientes osteoporóticos quando comparados com os controles. Da mesma forma, no subgrupo osteopênico, a expressão desses genes *WNT2* e *WNT16* também se mostrou aumentada em relação aos controles (FC= 2,72 e FC= 20, respectivamente). Quando os subgrupos osteopênico e osteoporótico foram comparados, observamos que os genes *WNT2* e *WNT16* mostraram-se reprimidos

(FC = -2,17 e FC = -4,54) e o gene *DKK1* mostrou-se induzido (FC = 24,8). Nossos resultados sugerem que o alendronato de sódio parece apresentar ação anabólica sobre os osteoblastos reprimindo a expressão da proteína inibitória Dickkopf1 na via Wnt, bem como aumentando a expressão de proteínas ativadoras da via, como a WNT2 e WNT16, favorecendo a formação óssea.

Palavras-chave: osteoporose. gene. via de sinalização Wnt. alendronato.

ABSTRACT

Osteoporosis is the most frequent osteometabolic disease in postmenopausal women and the incidence is increasing in the world population due to longevity. The disease compromises the bone quality and mineral density which can lead to fragility fractures as the hip, spine and wrist. Due to fractures, osteoporosis presents high morbidity and mortality in affected individuals. Despite the development of new drugs, bisphosphonates are the first-line osteoporosis treatment and they target the osteoclastic cells responsible for bone resorption. On the other hand, the anabolic activity of osteoblasts, bone-forming cells, is determined by the activity of the Wnt signaling pathway. Modifications in the function of the proteins in this pathway can generate changes in the bone mass, so our objective was to evaluate the expression of the *SOST*, *LRP5*, *DKK1*, *WNT2*, *WNT16* and *BMP2* genes of the Wnt signaling pathway in osteoporotic patients using oral bisphosphonate, alendronate sodium. The sample group consisted of 695 postmenopausal women attending the Rheumatology Division of the Hospital das Clínicas of the Federal University of Pernambuco from 2011 to 2017. Of this total, 90 women were selected for the expression tests. The individuals evaluated were divided into three subgroups: 30 osteoporotics, 29 osteopenics and 27 healthy individuals. The expression profile of the Wnt pathway genes: *SOST*, *LRP5*, *DKK1*, *WNT2*, *WNT16* and *BMP1* was evaluated by quantitative real-time PCR (qPCR) technology using primers or Taqman probes in ABI 7500 (Thermo Fisher) equipment. The results showed increased gene expression of *DKK1* Fold Change (FC) = 31 in osteopenic patients, whereas in osteoporotic patients using bisphosphonates there was no significant increase in expression (FC = 1,25) when both subgroups were compared to controls. In the subgroup of osteoporotic patients, the results showed increased expression of the *WNT2* and *WNT16* genes (FC = 5,89 and 90,32, respectively) when compared to controls. In the osteopenic subgroup, *WNT2* and *WNT16* gene expression also increased in relation to the healthy individuals (FC = 2,72 and FC=20, respectively). When we compared the osteopenic and osteoporotic subgroups in the expression analysis, we observed that the *WNT2* and *WNT16* genes were repressed (FC = -2.17 and FC = -4.54) and the *DKK1* gene was induced (FC = 24.8). Our results suggest that alendronate sodium appears to present anabolic action on osteoblasts by repressing the Dickkopf1 inhibitory protein

in the Wnt pathway, as well as increasing the expression of pathway activating proteins, such as *WNT2* and *WNT16*, favoring bone formation.

Keywords: osteoporosis. gene. Wnt signaling pathway. alendronate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação do ciclo de remodelamento ósseo. Fases do ciclo de remodelamento e atuação das células ósseas.	25
Figura 2 -Desenvolvimento dos osteoblastos e osteoclastos. Origem das células osteoblásticas a partir de precursores mesenquimais e das células osteoclásticas a partir de precursores hematopoiéticos.	26
Figura 3 - Modulação da atividade osteoclástica pelos osteoblastos. A produção de RANKL e OPG modula a atividade e a diferenciação dos osteoclastos.	28
Figura 4 - Comunicação entre as células ósseas. Os prolongamentos celulares dos osteócitos estabelecem uma rede de comunicação entre eles e as células de revestimento ósseo, osteoblastos e osteoclastos.	30
Figura 5 - Fases do ciclo de remodelamento ósseo. Reabsorção com intensa atividade osteoclástica. Reversão com recrutamento de pré-osteoblastos. Formação com síntese da matriz osteoide pelos osteoblastos. Repouso onde ocorre o processo de mineralização.	31
Figura 6 - Interações entre células ósseas e proteínas envolvidas no ciclo de remodelamento. Participação das proteínas da via Wnt e da via OPG/RANK/RANKL. Hormônios como PTH, estrogênio, calcitonina e vitamina D controlam o ciclo. Síntese do colágeno tipo I pelos osteoblastos. Ação da cathepsina K, importante enzima na reabsorção osteoclástica do tecido ósseo.	35
Figura 7 - Via Wnt ativada e não sinalizada. Via Wnt ativada pelo seu ligante com a amplificação da β catenina e a via Wnt não sinalizada com a degradação da β catenina.	38
Figura 8 - Os mais importantes genes relacionados à densidade mineral óssea. Representam os principais genes identificados nos estudos de genoma de associação relacionados com a DMO.	45
Figura 9 - Bisfosfonatos evitam a apoptose de osteoblastos e osteócitos. Os bisfosfonatos mantêm os canais de Cx43 abertos favorecendo a fosforilação das ERKs e a sobrevivência celular.	47

Figura 10 - Realização de atividade física no Grupo Clínico. Comparação entre os subgrupos Controle, OPN e OP quanto à realização de atividades físicas.	59
Figura 11 - Média de idade do Grupo Expressão. Comparação entre as idades médias dos subgrupos Controle, OPN e OP.	62
Figura 12 - Avaliação de parâmetros laboratoriais do Grupo Clínico. Comparação entre os valores médios de 25(OH)D, cálcio, fosfatase alcalina, PTH, calciúria, fósforo e magnésio entre os subgrupos Controle, OPN e OP.	64
Figura 13 - Avaliação de tabagismo no Grupo Clínico. Avaliação quanto a presença de tabagismo entre os indivíduos dos subgrupos Controle, OPN e OP.	65
Figura 14 - Avaliação de parâmetros laboratoriais do Grupo Expressão. Comparação entre os valores médios de 25(OH)D, cálcio, fosfatase alcalina, PTH, calciúria, fósforo e magnésio entre os subgrupos Controle, OPN e OP.	68
Figura 15 - Valores do FRAX para fratura maior em indivíduos osteopênicos do Grupo Expressão. Considera-se para tratamento valores de FRAX $\geq$ 20% (KANIS, 2008).	70
Figura 16 - Valores do FRAX para fratura de quadril em indivíduos osteopênicos do Grupo Expressão. Considera-se para tratamento valores de FRAX $\geq$ 3% (KANIS, 2008).	70
Figura 17 - Expressão gênica dos genes <i>LRP5</i> , <i>DKK1</i> , <i>WNT2</i> , <i>WNT16</i> e <i>BMP2</i> no subgrupo de mulheres osteopênicas em relação ao subgrupo controle saudável. Destacando os genes <i>DKK</i> (FC= 31), <i>WNT2</i> (FC = 2,72) e <i>WNT16</i> (FC = 20).	72
Figura 18 - Expressão gênica dos genes <i>LRP5</i> , <i>DKK1</i> , <i>WNT2</i> , <i>WNT16</i> e <i>BMP2</i> no subgrupo de mulheres osteoporóticas em relação ao subgrupo controle saudável. Destacando os genes <i>DKK</i> (FC= 1,25), <i>WNT2</i> (FC = 5,89) e <i>WNT16</i> (FC = 90,32).	72
Figura 19 - Expressão gênica dos genes <i>LRP5</i> , <i>DKK1</i> , <i>WNT2</i> , <i>WNT16</i> e <i>BMP2</i> no subgrupo de mulheres osteopênicas em relação ao subgrupo osteoporótico. Destaque para o gene <i>DKK1</i> que apresentou FC = 24,8 mais expresso nos pacientes OPN do que nos pacientes OP. Já os genes <i>WNT2</i> e <i>WNT16</i> mostraram-se menos expressos nos pacientes OPN do que nos pacientes OP, com FC = -2,17 e -4,54.	73

Figura 20 - Expressão gênica dos genes *LRP5*, *DKK1*, *WNT2*, *WNT16* e *BMP2* entre os indivíduos que sofreram fratura e os não fraturados do subgrupo osteoporótico.

74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Eficácia de vários agentes antiosteoporóticos na prevenção de fraturas e ganho de DMO na coluna vertebral.	51
Tabela 2 - Fatores de risco clínico utilizados na ferramenta FRAX.	54
Tabela 3 - Características sócio epidemiológicas do Grupo Clínico: idade, idade de menarca, idade de menopausa, consumo de álcool e prática de atividade física.	60
Tabela 4 - Características sócio epidemiológicas do Grupo Expressão: idade, idade de menarca, idade de menopausa, consumo de álcool e prática de atividade física.	61
Tabela 5 - Características clínicas/laboratoriais do Grupo Clínico: peso, IMC, parâmetros laboratoriais, comorbidades, tabagismo, uso de outros medicamentos não associados ao metabolismo ósseo e hereditariedade.	66
Tabela 6 - Características clínicas/laboratoriais do Grupo Expressão: peso, IMC, parâmetros laboratoriais, comorbidades, tabagismo, uso de outros medicamentos não associados ao metabolismo ósseo e hereditariedade.	69

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

APC	-adenomatosis polyposis coli
<i>AXIN</i>	-gene que codifica a proteína axina
B2M	-beta-2-microglobulina
BMP's	-proteínas morfogenéticas ósseas
BMU	-unidades multicelulares básicas
BPs	-bisfosfonatos
BPNNs	-bisfosfonatos que não contêm nitrogênio
BPNS	-bisfosfonatos contendo nitrogênio
catK	-catepsina K
cbfa1	-fator de ligação do núcleo alfa 1
cDNA	-ácido desoxirribonucleico complementar
<i>COL1A1, A2</i>	-gene que codifica a proteína colágeno 1A, 2A
Cq	-Ciclo de quantificação
<i>CTNNB1</i>	-gene que codifica a β catenina 1
Cx	-conexina
<i>DKK1</i>	-gene que codifica a proteína Dickkopf-relacionada 1
DKK1, 2, 3, 4	-proteína Dickkopf-relacionada 1, 2, 3, 4
DKKL1	-proteína relacionada Dickkopf-like 1
DMO	-densidade mineral óssea
ERKs	-quinases regulatórias de sinal extracelular
ESR1, 2	-receptor de estrogênio 1, 2
<i>ESR1</i>	-gene do receptor do estrogênio 1
FC	-Fold Change
Fz	-receptores transmembrana frizzled
GAPDH	-gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<i>GPR177</i>	-gene que codifica a proteína GPR177
GSK3 β	-quinase3 β do glicogênio sintase

GWAS	-estudos de associação do genoma
IGF-1	-fator de crescimento semelhante à insulina 1
IMC	-índice de massa corpórea
JAG1	-gene que codifica a proteína jagged-1
LEF1	-fator potenciador linfóide de ligação 1
LRP1, 5, 6	-coreceptor da proteína receptora de LDL relacionado 1, 5, 6
<i>LRP4</i> , 5	-gene que codifica o coreceptor da proteína receptora de LDL relacionado 4, 5
MAP	-proteína quinase ativada por mitógenos
MCSF	-fator estimulador de colônia de macrófagos
<i>MEF2C</i>	-gene que codifica a proteína MEF2C
MEK	-quinase ativadora da MAP quinase
<i>MTHFR</i>	-gene que codifica a proteína Metilenotetrahidrofolato redutase
MTHFR	-metilenotetrahidrofolato redutase
NF-κB	-fator nuclear kappa B
OP	-osteoporose
OPG	-osteoprotegerina
OPN	-osteopenia
PCR	-reação em cadeia de polimerase
PTHrP	-receptor do PTH
QCT	-tomografia computadorizada quantitativa
RANK	-receptor NF-κB
RANKL	-ligante ativador do receptor NF-κB
RPLP0	-proteína ribossomal P0
Rspo`s	-R-espondinas
SERMs	-moduladores seletivos do receptor de estrogênio
<i>sFRP4</i>	-gene que codifica a proteína relacionada ao receptor frizzled 4
sFRP1, 4, 5	-proteínas secretadas frizzled relacionadas 1, 4, 5
<i>SOST</i>	-gene que codifica a proteína esclerostina
SPNs	-polimorfismos de nucleotídeo único

TCF4	-fator de transcrição 4
TGFβ	-fator de transformação do crescimento beta
VDR	-gene do receptor de vitamina D
VDR	-receptores de vitamina D
WIF1	-fator de inibição da Wnt 1
<i>WIF1</i>	-gene que codifica a proteína WIF1
Wnt 1	-proteína Wnt 1
<i>WNT3A, 4, 5B, 16</i>	-gene que codifica a proteína WNT3A, 4, 5B, 16

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 OSTEOPOROSE.....	21
2.2 CICLO DE REMODELAMENTO ÓSSEO.....	23
2.2.1 Células do remodelamento ósseo.....	25
2.2.1.1 Osteoblasto.....	25
2.2.1.2 Osteoclasto.....	27
2.2.1.3 Osteócito.....	29
2.2.2 Fases do ciclo de remodelamento ósseo.....	30
2.2.2.1 Ativação.....	31
2.2.2.2 Reabsorção.....	32
2.2.2.3 Reversão.....	33
2.2.2.4 Formação.....	33
2.2.2.5 Finalização do ciclo.....	34
2.3. VIA DE SINALIZAÇÃO WNT E CÉLULAS ÓSSEAS.....	35
2.4 GENÉTICA DA OSTEOPOROSE.....	40
2.4.1 As proteínas da via WNT.....	41
2.5 TRATAMENTO DA OSTEOPOROSE.....	46
2.6 FRAX® - FRACTURE RISK ASSESSMENT TOOL.....	51
3 HIPÓTESE.....	55
4 OBJETIVOS.....	55
4.1 OBJETIVO GERAL.....	55
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	55
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
5.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	56
5.2 ISOLAMENTO DE RNAm E SÍNTESE DE cDNA.....	57
5.3 ENSAIOS DE EXPRESSÃO.....	57
5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
6 RESULTADOS.....	58
6.1 CARACTERIZAÇÃO SÓCIO EPIDEMIOLÓGICA.....	58
6.2 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA / LABORATORIAL.....	63
6.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	71
7 DISCUSSÃO.....	74

7.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA.....	74
7.2 EXPRESSÃO DOS GENES DA VIA WNT.....	77
8 CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS.....	84
APÊNDICE A: TCLE PACIENTES E GRUPO CONTROLE.....	95
APÊNDICE B: FORMULÁRIO DE ACOMPANHAMENTO DE.....	101
PACIENTES	
ANEXO A: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA...	104
ANEXO B: POLYMORPHISMS IN KEY BONE.....	105
MODULATOR CYTOKINES GENES INFLUENCE	
BISPHOSPHONATES THERAPY IN POSTMENOPAUSAL WOMEN	
ANEXO C: OSTEOPOROSE, SISTEMA IMUNE E GENÉTICA.....	106

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é a doença osteometabólica mais prevalente na população e acomete especialmente mulheres após a menopausa. Sua principal característica clínica é a fratura por fragilidade de elevada morbimortalidade nos indivíduos acometidos. A doença apresenta uma patogênese multifatorial, na qual o fator genético desempenha um papel chave.

Atualmente a terapêutica anabólica com alvo nos osteoblastos, células formadoras de osso, vem ganhando destaque inclusive com o surgimento de novos agentes terapêuticos. Por outro lado, os bisfosfonatos representam ainda a primeira linha de tratamento antiosteoporótico de ação classicamente antiosteoclástica.

Segundo a literatura, o sistema de sinalização Wnt, representa a via de estimulação das células formadoras de osso – os osteoblastos – os quais se apresentam em menor número ou com função deficiente no osso osteoporótico.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil de expressão gênica de proteínas da via Wnt em mulheres pós-menopausadas com osteoporose em uso de bisfosfonato, alendronato de sódio, em relação ao das mulheres osteopênicas e indivíduos saudáveis do estado de Pernambuco.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 OSTEOPOROSE

A osteoporose (OP) tem sido reconhecida como um dos maiores problemas de saúde pública do mundo, devido à alta taxa de morbimortalidade relacionada a fraturas, particularmente entre mulheres idosas (PAIVA, et al., 2002). É considerada uma doença esquelética sistêmica caracterizada por diminuição da massa óssea e deterioração microarquitetural do tecido ósseo, com consequente aumento da fragilidade óssea e suscetibilidade à fratura (RENNÓ, et al., 1993). Conforme os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), o indivíduo portador de osteoporose apresenta T-Score igual ou menor que -2,5. Por outro lado, os indivíduos com T-score entre -1,0 e -2,5 são classificados como osteopênicos; e, os com T-score maiores que -1,0 apresentam densidade normal da massa óssea (Kanis, et al., 2008).

Representa uma doença de importância crescente tendo em vista o aumento da expectativa de vida populacional, que no caso do Brasil é de aproximadamente 75 anos para as mulheres (OLIVEIRA, 2017). Estima-se que uma em cada duas mulheres; e, um em cada cinco homens acima de 65 anos de idade apresentarão pelo menos uma fratura relacionada à osteoporose em algum momento da vida (PAIVA, et al., 2002).

A doença acomete mais de 75 milhões de pessoas na Europa, Japão e nos Estados Unidos, com um risco estimado de fraturas em torno de 15% (KAI, ANDERSON, LAU, 2004). Dados norte-americanos mostram que as fraturas devido à osteoporose são mais graves, letais em 12 a 20% dos casos, e geram despesas médicas de aproximadamente dez bilhões de dólares / ano (QUEIROZ, PEREIRA, FIGUEIREDO, 2014).

No Brasil, há escassez de dados referentes à população acometida pela osteoporose. Estima-se que 10 milhões de brasileiros sejam portadores da patologia, dos quais 2,4 milhões anualmente sofram fraturas; e destes, cerca de 200 mil morrerão em decorrência direta dessas fraturas. Calcula-se que a osteoporose atinja cerca de 35% das mulheres acima de 45 anos de idade em nosso país (MORAES, SILVA, SILVA, 2014).

Também denominada "epidemia silenciosa", a perda de tecido ósseo geralmente é assintomática e em muitos casos só é diagnosticada quando ocorre a primeira fratura, ou seja, quando a doença já se encontra estabelecida (ANDRADE, 2015).

A perda de massa óssea é uma consequência inevitável do processo de envelhecimento (MORAES, SILVA, SILVA, 2014). Entretanto, no indivíduo com osteoporose a perda é tão importante que a massa óssea cai abaixo do limiar para fraturas, principalmente em determinados locais, como quadris, vértebras e antebraços (MORAES, SILVA, SILVA, 2014; ANDRADE, 2015).

Os locais de maior ocorrência de fratura são punhos, coluna e quadril (KANIS, et al., 2011).

As fraturas na coluna são as mais comuns e geralmente são causadas por atividades do cotidiano, devido ao esforço de levantar, empurrar ou puxar objetos. Cerca de 70% dessas fraturas são consideradas assintomáticas e em apenas 30% seus portadores apresentam dor de moderada a grave. Em mulheres, a incidência de fraturas vertebrais clinicamente sintomáticas aumenta em torno dos 55 a 60 anos; e nos homens, em torno de 75 anos (HARRISON, et al., 2007).

Com relação ao surgimento de novas fraturas, a fratura vertebral pode ter o efeito "cascata", e, cerca de 1 a cada 5 mulheres que tiveram fratura na coluna, terão outra fratura dentro do período de 1 ano. O risco de futuras fraturas nessa região tende a aumentar de acordo com o número de fraturas ocorridas. Se compararmos as mulheres sem fratura na coluna com mulheres que tiveram 2 ou mais fraturas, esse número aumentará em 7 vezes o risco de nova fratura de coluna no período de 12 meses (KLOTZBUECHER, et al., 2007).

As fraturas na coluna vertebral causam grande impacto na população. Nos idosos, os custos médicos associados a essas fraturas incluem despesas hospitalares e de reabilitação. E, se, em indivíduos ativos, os custos também se relacionam com a perda de dias de trabalho. O surgimento de fraturas vertebrais eleva em 8 vezes o índice de mortalidade na população acometida. Essas fraturas podem gerar dor e deformidade na coluna, diminuição da estatura, imobilidade, depressão, diminuição da função pulmonar, alteração da função gástrica e morte prematura nos indivíduos acometidos (KLOTZBUECHER, et al., 2000).

As fraturas de quadril são as mais complexas, sendo responsáveis pela redução da qualidade de vida e pelo aumento da mortalidade. Representam a segunda fratura osteoporótica mais comum com as mais sérias consequências em termos de morbidade e mortalidade, pois apresenta uma taxa de 20-30% de morte no primeiro ano após o seu evento. Além disso, 20% dos indivíduos fraturados apresentam uma mobilidade severamente comprometida após o primeiro ano, requerendo longo tempo de cuidados médicos; e 50% das mulheres que fraturam o quadril se mantêm com algum grau de comprometimento da mobilidade (ROSENGREN, KARLSSON, 2014).

Em mulheres, a incidência de fraturas do quadril aumenta por volta dos 65 anos de idade e cresce exponencialmente. Em homens, a incidência de fraturas do quadril aumenta em torno dos 70 anos. Como marcador de risco para novas fraturas, um indivíduo portador de fratura do quadril, apresenta um risco relativo de 2,5 para fraturas vertebrais e de 2,3 para uma nova fratura de quadril (ROSENGREN, KARLSSON, 2014). Por ano, no mundo, ocorrem em torno de 1,6 milhões de casos de fraturas de quadril. Em 2050, este número poderá aumentar para cerca de 6,3 milhões. Na Ásia e na América Latina ocorrem as maiores incidências de fraturas por fragilidade relacionadas à osteoporose (PINHEIRO, CICONELLI, JACQUES, 2010).

As fraturas de punho ocorrem em grande parte das mulheres, antes mesmo das fraturas de colo do fêmur e de coluna. A incidência dessas fraturas começa a aumentar em torno dos 50 anos. Representa o terceiro tipo de fratura osteoporótica mais comum. Após sua ocorrência, cerca de 30-40% das mulheres queixam-se de dor e/ou fraqueza crônicas no membro acometido (KHAN, et al., 2001).

No Brasil, de acordo com dados do Sistema Único de Saúde do triênio 2008-2010, foram utilizados cerca de 300 milhões de reais com gastos relacionados à osteoporose. Nesse valor incluem-se exames, medicamentos, procedimentos clínicos, cirúrgicos e próteses. Cerca de 76% desse valor foi empregado em mulheres osteoporóticas (MORAES, SILVA, SILVA, 2014).

2.2 CICLO DE REMODELAMENTO ÓSSEO

Durante a vida, o tecido ósseo passa por um processo de modelagem e remodelação com o objetivo de crescer ou alterar a sua forma. A modelagem óssea é

o processo pelo qual os ossos mudam a forma ou o tamanho em resposta a influências fisiológicas ou forças mecânicas, enquanto a remodelação óssea ocorre para que o osso possa manter sua força e a homeostase mineral. O processo predominante na infância é a modelagem, enquanto que na idade adulta a remodelação óssea predomina (KOBAYASHI, et al., 2003).

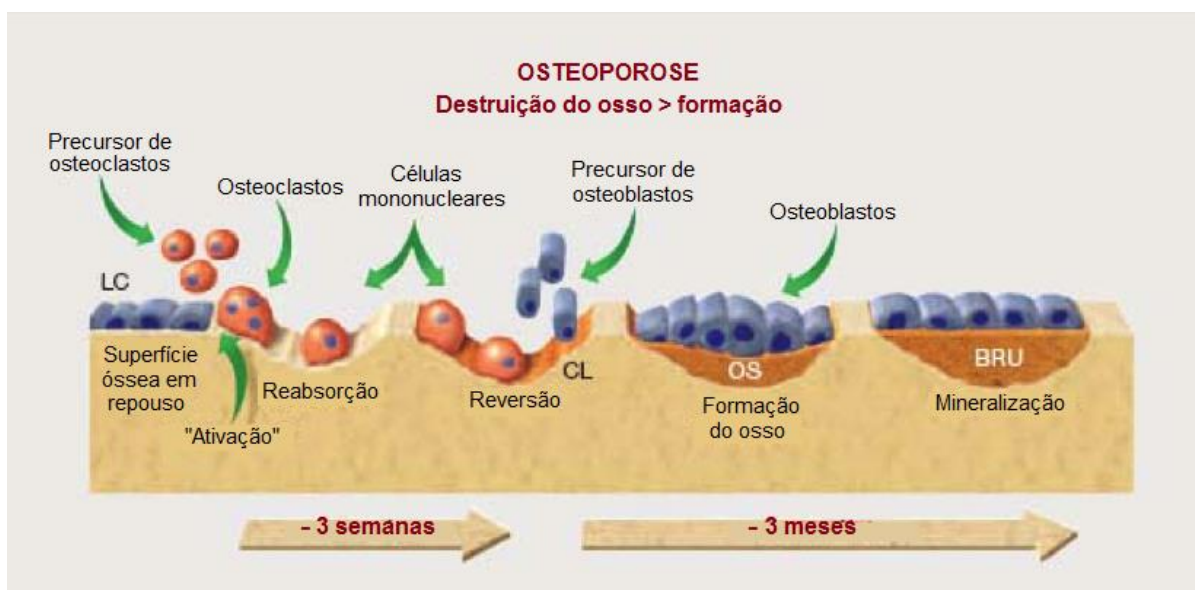
As forças biomecânicas estimulam os ossos a mudarem sua forma através da ação dos osteoblastos e dos osteoclastos que adicionam ou removem tecido ósseo na superfície apropriada (KATSIMBRI, 2017).

O remodelamento ósseo envolve a remoção de osso antigo e a substituição por uma matriz óssea recém-formada (chamada osteoide) que sofrerá por um processo de mineralização para a formação de um novo osso. O processo de remodelação inicia-se antes do nascimento e continua ao longo da vida de modo a evitar o acúmulo de microlesões no esqueleto (KOBAYASHI, et al., 2003; KATSIMBRI, 2017).

Embora a remodelação ocorra em locais que necessitem de reparo, a maioria dos seus sítios são aleatórios. Reabsorção e formação ósseas estão bem acoplados no processo de remodelamento, um desequilíbrio entre esses dois mecanismos pode gerar doenças minerais ósseas como a osteoporose, quando há excesso de perda óssea; ou a osteopetrose, quando há excesso de formação óssea (KOBAYASHI, et al., 2003; KATSIMBRI, 2017).

As principais células envolvidas na remodelação óssea são os osteoblastos e os osteoclastos. A função dessas células está fortemente acoplada uma a outra, realizando reabsorção de osso danificado e formação de novo osso sequencialmente. Outras células envolvidas na remodelação óssea são as células de revestimento ósseo e os osteócitos, que além de derivados dos osteoblastos, atuam como células endócrinas e apresentam a função de mecanossensores. A remodelação óssea aumenta com o envelhecimento. Na perimenopausa e na pós-menopausa inicial a remodelação encontra-se aumentada, diminui sua atividade com o envelhecimento, mas permanece mais elevada em mulheres pós-menopausadas idosas do que em mulheres pré-menopausadas (BONEWALD, JOHNSON, 2008; KARSENTY, KRONENBERG, SETTEMBRE, 2009) (Figura 1).

Figura 1 - Representação do ciclo de remodelamento ósseo. Fases do ciclo de remodelamento e atuação das células ósseas.



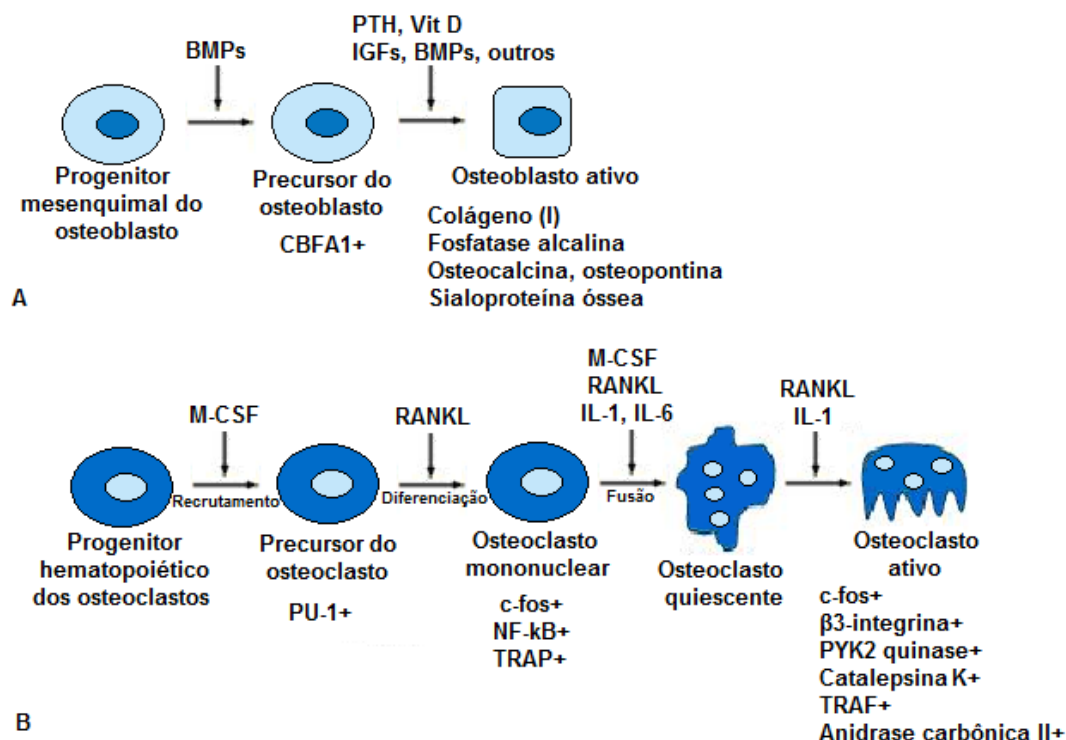
Fonte: Lajeunesse, D.; Martel-Pelletier, J.; Pelletier, J.P. Disponível em: <<https://www.medicographia.com/2011/05/osteoporosis-and-osteoarthritis-bone-is-the-common-battleground/>>. Acesso em: 11 dez. 2017.

2.2.1 Células do remodelamento ósseo

2.2.1.1 Osteoblasto

O osteoblasto, célula formadora de osso, desenvolve-se a partir das células mesenquimais pluripotentes. Essas células podem se diferenciar em uma variedade celular (adipócitos, miócitos, condrócitos e osteoblastos) a depender dos fatores de transcrição regulatórios que atuam sobre elas, conforme visualizado na figura 2 (CROCKETT, et al., 2011).

Figura 2 - Desenvolvimento dos osteoblastos e osteoclastos. Origem das células osteoblásticas a partir de precursores mesenquimais e das células osteoclásticas a partir de precursores hematopoiéticos.



Fonte: Arai, F.; Miyamoto, T.; Ohneda, O., 1999.

O osteoblasto produz osso por síntese e secreção do colágeno tipo I, principal proteína da matriz óssea, e auxilia a mineralização do osso recém-formado (ou osteoide). A mineralização ocorre com a deposição dos cristais de hidroxiapatita formados pela junção do fosfato liberado das vesículas dos osteoblastos no osteoide com o cálcio do fluido extracelular. A proporção correta entre as matrizes orgânica e mineral é crucial para assegurar o equilíbrio entre rigidez e flexibilidade do esqueleto. O osso humano adulto cortical contém cerca de 60% de minerais, 20% de material orgânico e 20% de água (CROCKETT, et al., 2011).

Várias proteínas e vias de sinalização são importantes na regulação, diferenciação e função dos osteoblastos. (CAO, CHEN, 2005).

A via de sinalização Wnt está envolvida na formação dos ossos de várias maneiras: seja durante a esquelétogênese, ou através dos seus efeitos nos osteoblastos maduros. Essa via Wnt canônica controla a diferenciação e função dos osteoblastos através da ativação de β catenina a qual atua em fatores de transcrição cruciais para a diferenciação osteoblástica. Por outro lado, a via Wnt não canônica bloqueia a expressão de receptores necessários à diferenciação das células

mesenquimais em adipócitos. A redução dos estrogênios circulantes e o surgimento da osteoporose estão associados a uma diminuição da atividade dessas vias, à diminuição da atividade dos osteoblastos e a uma maior formação de adipócitos (CAO, CHEN, 2005; DAY, et al., 2005).

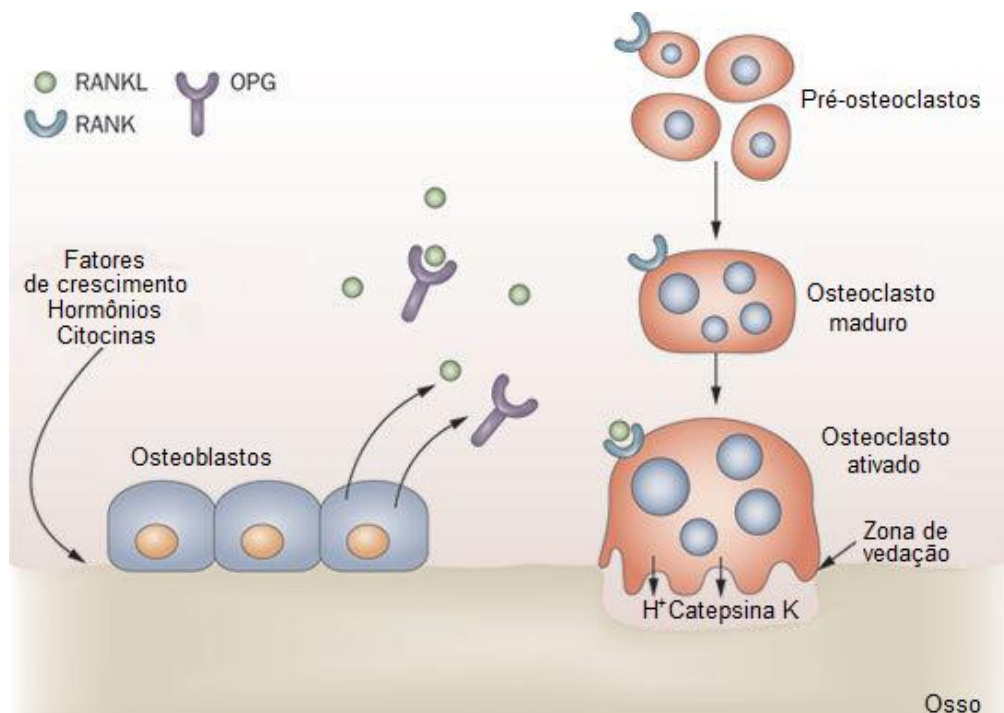
A sinalização Wnt também está associada aos mecanismos envolvidos nos efeitos anabolizantes do paratormônio (PTH) na formação óssea. A principal função do PTH é regular os níveis de cálcio plasmático através de sua ação nos osteoclastos. Por outro lado, seus efeitos anabolizantes englobam a diminuição da apoptose dos osteoblastos e dos osteócitos através da ativação de receptores específicos nessas células que leva à estabilização de β catenina com consequente diferenciação celular (DAY, et al., 2005; GUO, et al., 2010).

Além disso, a sinalização Wnt possui proteínas inibidoras como a Dickkopf1 (DKK1) que impede ações excedentes do PTH sobre a via. A sinalização Wnt canônica também estimula a expressão de osteoprotegerina (OPG) e do ligante ativador do receptor NF- κ B (RANKL) pelos osteoblastos, regulando a atividade dos osteoclastos. Finalmente, a função dos osteoblastos também é regulada através do sistema nervoso simpático: os osteoblastos possuem receptores β -adrenérgicos em suas superfícies que, quando estimulados, inibem a formação óssea (GUO, et al., 2010).

2.2.1.2 Osteoclasto

Osteoclastos são grandes células multinucleadas derivadas de precursores celulares mononucleares da linhagem dos macrófagos e monócitos. São as únicas células conhecidas capazes de reabsorver osso. A diferenciação, expansão e sobrevivência dessas células tanto *in vitro* como *in vivo* são dependentes das ações de citocinas como fator estimulador de colônia 1, (também conhecido como fator estimulador de colônia de macrófagos (MCSF) e do RANKL (Figura 2). A OPG é um receptor solúvel para RANKL, ligando-se a ele com alta afinidade e inibindo sua ação no receptor RANK do osteoclasto. A razão da expressão RANKL / OPG determina o grau de diferenciação e função dos osteoclastos. Quanto mais RANKL, maior a atividade osteoclastogênica de reabsorção óssea; quanto mais OPG, menor essa atividade (HADJIDAKIS, ANDROULAKIS, 2006; CROCKETT, et al., 2011) (Figura 3).

Figura 3 - Modulação da atividade osteoclástica pelos osteoblastos. A produção de RANKL e OPG modula a atividade e a diferenciação dos osteoclastos.



Fonte: Lewiecki, E.M., 2011.

A quantidade e a atividade dos osteoclastos aumentam em condições inflamatórias, como artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, e outras, através da ação sinérgica de citocinas pró-inflamatórias circulantes, como o RANKL, e das células dendríticas sobre os osteoclastos (WEITZMANN, PACIFICI, 2007).

Para que os osteoclastos sejam ativados e a reabsorção óssea se inicie, as células maduras devem se unir à matriz óssea, tornando-se polarizadas com a formação de podosomas. Os podosomas são formados por um núcleo de actina rodeado por um anel de integrinas e de proteínas do citoesqueleto. Nos domínios da membrana dos osteoclastos, temos zona de vedação (ZV), borda pregueada (BP) e domínio funcional secretor (DFS). A BP forma-se entre o osteoclasto e a região da matriz óssea mineralizada, local bem delimitado que será reabsorvido. Se a BP ou a ZV estiverem comprometidas, a reabsorção óssea será bloqueada. Vesículas acidificadas contendo metaloproteinases e catepsina K (catK) são transportadas através de microtúbulos para se fundirem com a membrana e, posteriormente, sofrerem exocitose na borda pregueada (LUXENBURG, et al., 2007; COXON, TAYLOR, 2008).

Quando o osteoclasto entra em contato com a matriz óssea, o citoesqueleto de actina organiza-se formando uma zona de vedação, que isola o compartimento de reabsorção acidificado da superfície óssea circundante. Após a reabsorção óssea, os fragmentos de colágeno, bem como o cálcio e o fosfato, são endocitados pelos osteoclastos, transportados através da célula e lançados no DFS antes de serem liberados para a corrente sanguínea. Durante esse processo de transcitose, os fragmentos de colágeno sofrem degradação por enzimas proteolíticas como a catK. Os processos envolvidos na reabsorção óssea são regulados por pequenas GTPases, que para serem funcionais, devem ser submetidas a uma modificação pós-tradução por isoprenilação. Se as enzimas envolvidas na isoprenilação forem comprometidas pela ação de drogas antiosteoporóticas como os bisfosfonatos, a reabsorção óssea é inibida (LUXENBURG, et al., 2007; COXON, TAYLOR, 2008).

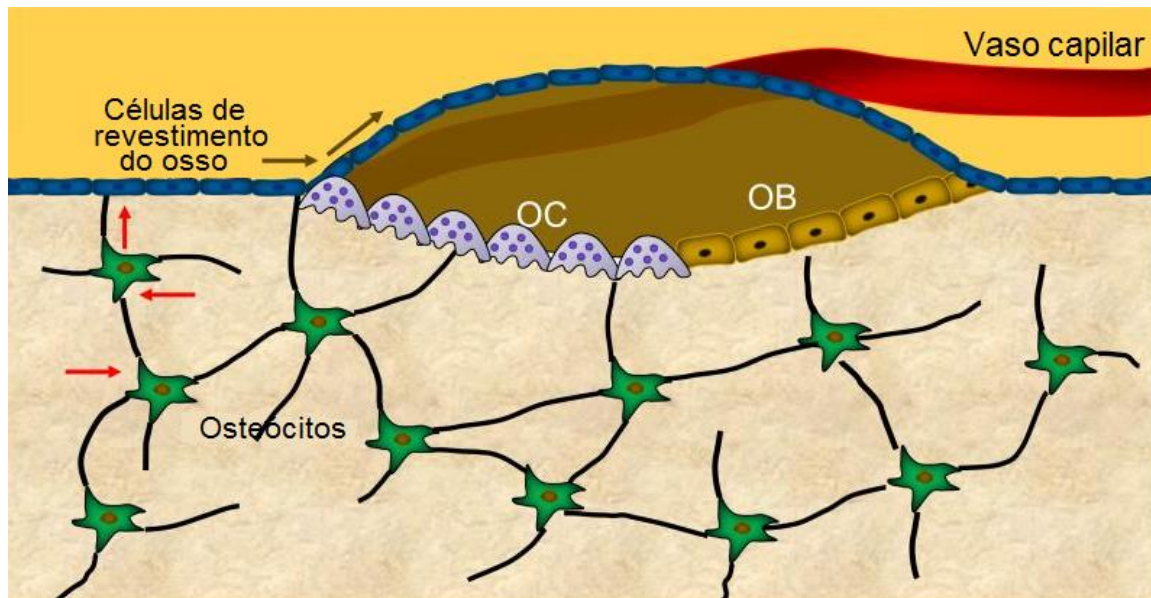
2.2.1.3 Osteócito

Os osteócitos são o tipo celular mais abundante no osso, representando cerca de 95% de todas as células ósseas. São originários dos osteoblastos que sofreram diferenciação terminal durante a formação óssea e posteriormente foram envolvidos pela matriz osteoide; sendo encontrados dentro do osso mineralizado. Os osteócitos apresentam uma morfologia diversa da dos osteoblastos. Após a célula osteoblástica ser envolvida pela matriz óssea, ela perde mais de 70% de suas organelas e o citoplasma adquire prolongamentos dendríticos, conferindo-lhe uma aparência em estrela. Os processos dendríticos se estendem por todos os canais dentro da matriz óssea, interagindo com outros osteócitos ou com os osteoblastos na superfície óssea, formando uma rede lacunar-canalicular. Esse sistema transmite sinais do ponto de origem ao local efetor (BONEWALD, JOHNSON, 2008).

Forças mecânicas que atuam no osso podem produzir microdanos ósseos (fraturas microscópicas dentro do osso mineralizado) que são detectados pelos osteócitos, os quais respondem inicializando o processo de remodelação naquele local. Além de estímulos mecânicos, os osteócitos também são sensíveis a alterações metabólicas. A perda de estrogênio e o envelhecimento aumentam a apoptose dessas células, desequilibrando a remodelação com consequentemente perda de massa óssea. Por outro lado, as células osteocíticas exercem ação sobre os osteoblastos seja estimulando-os através da produção de óxido nítrico e de prostaglandina E2 ou

inibindo-os através da secreção de esclerostina (HADJIDAKIS, ANDROULAKIS, 2006; BONEWALD, JOHNSON, 2008; DALLAS, BONEWALD, 2010) (Figura 4).

Figura 4 - Comunicação entre as células ósseas. Os prolongamentos celulares dos osteócitos estabelecem uma rede de comunicação entre eles e as células de revestimento ósseo, osteoblastos e osteoclastos.

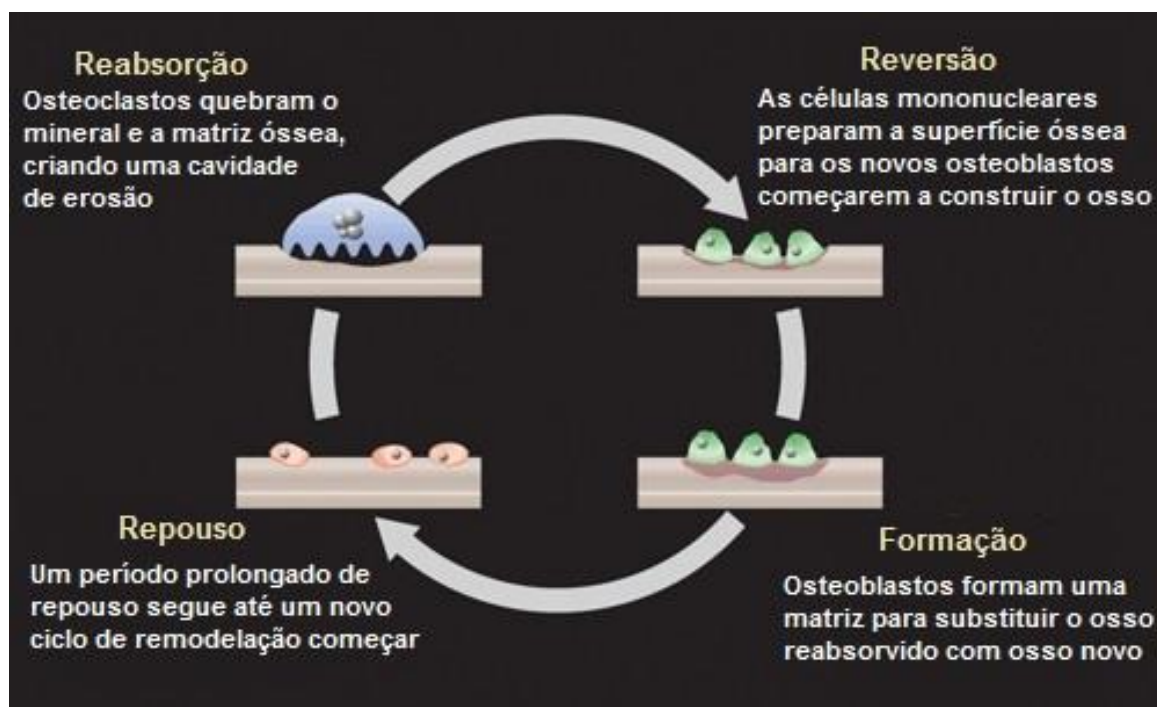


Fonte: Khosla, S.; Oursler, M.J.; Monroe, D.G., 2012.

2.2.2 Fases do ciclo de remodelamento ósseo

O ciclo de remodelamento ósseo consiste em cinco estágios: ativação, reabsorção, reversão, formação e finalização do ciclo, que ocorrem ao longo de várias semanas (Figura 5). Os aglomerados de osteoclastos e osteoblastos envolvidos na reabsorção e na formação do osso, estão dispostos em estruturas anatômicas temporárias conhecidas como "unidades multicelulares básicas" (BMU). Cada BMU está recoberta por células ósseas de revestimento que criam um ambiente único para a reabsorção acoplada à formação. Durante o remodelamento ósseo fisiológico, o volume ósseo não se altera (CROCKETT, et al., 2011; KATSIMBRI, 2017).

Figura 5 - Fases do ciclo de remodelamento ósseo. Reabsorção com intensa atividade osteoclástica. Reversão com recrutamento de pré-osteoblastos. Formação com síntese da matriz osteoide pelos osteoblastos. Repouso onde ocorre o processo de mineralização.



Fonte: Biology of Bone Disease in Cancer. Medscape. Disponível em <https://www.medscape.org/viewarticle/520178_2>. Acesso em: 17 fev. 2018.

A BMU ativa consiste em osteoclastos que recobrem a superfície óssea recém exposta, preparando-a para a deposição de osso de reposição; e em osteoblastos segregando e depositando osso não-mineralizado osteoide. O arranjo ordenado das células dentro da BMU é importante para assegurar a sequência correta das fases da remodelação óssea (KATSIMBRI, 2017).

2.2.2.1 Ativação

A ativação é o estágio inicial da remodelação óssea. Antes disso, o osso encontra-se em um estado quiescente. O sinal inicial para a remodelação é detectado pelo osso e pode ser hormonal ou mecânico. As forças físicas que produzem tensão mecânica e microdano no esqueleto são traduzidas em sinais biológicos pelos osteócitos. Iniciada a sinalização, as células do revestimento ósseo se retraem, a membrana endosteal é digerida pela ação das collagenases e os precursores dos osteoclastos são recrutados da circulação e ativados, tornando-se grandes células

multinucleadas. Os osteoclastos ativos migram e se ligam à superfície óssea para que a reabsorção se inicie através da liberação de íons de hidrogênio e enzimas, em particular catK de modo a degradar a matriz óssea (BONEWALD, JOHNSON, 2008).

O PTH é secretado pela paratireoide em resposta a níveis reduzidos de cálcio sérico e atua diretamente sobre os ossos e os rins, e indiretamente no intestino. Nos ossos, o PTH liga-se ao seu receptor na superfície dos osteoblastos e das células estromais, as quais ativam a expressão de MCSF e RANKL, induzindo a diferenciação e a ativação dos osteoclastos que favorecem a reabsorção óssea. Nos rins, aumenta a absorção de cálcio e estimula a produção de 1,25-dihidroxitamina D₃ (1,25(OH)₂D) ou calcitriol. Nos intestinos, o calcitriol aumenta a absorção de cálcio através do seu receptor de vitamina D (VDR), (HADJIDAKIS, ANDROULAKIS, 2006; GUO, et al., 2010).

O estrogênio atua como um hormônio poupador de osso no processo de remodelação. Os receptores de estrogênio estão expressos nos osteoclastos e nos osteoblastos. É um importante hormônio no controle da vida útil dessas células, pois aumenta a apoptose de células osteoclásticas e inibe a apoptose de osteoblastos e osteócitos. Assim, evita-se uma reabsorção óssea excessiva. O estrogênio, através da inibição do RANKL e do aumento da OPG, diminui a formação e a diferenciação dos osteoclastos. Dessa forma, após a menopausa, quando os níveis de estrogênio caem, há um aumento na atividade das células reabsortivas e uma redução das células formadoras de osso, com incremento da reabsorção óssea (WEITZMANN, PACIFICI, 2007).

2.2.2.2 Reabsorção

Mediada pelos osteoclastos a reabsorção óssea dura aproximadamente de 2 a 4 semanas para cada ciclo de remodelação. A célula osteoclástica secreta íons hidrogênio que reduzem o pH até 4,5 dentro do compartimento de reabsorção para mobilizar o mineral ósseo; e secreta enzimas como metaloproteinases e catK que degradam o componente orgânico da matriz óssea. Essa atividade dos osteoclastos produz a formação de cavidades conhecidas como lacunas de Howship na superfície óssea. Os osteoclastos multinucleados sofrem apoptose e se encerra essa fase (CROCKETT, et al., 2011).

2.2.2.3 Reversão

Após a reabsorção óssea, as cavidades contêm uma variedade de células, incluindo monócitos, osteócitos e pré-osteoblastos os quais são recrutados para começar uma nova formação óssea. Os sinais de acoplamento que unem o fim da reabsorção e o início da formação ainda não são bem esclarecidos. Uma variedade desses sinais foi proposta. Porém, os fatores derivados da matriz óssea, como o fator de transformação do crescimento beta ($TGF\beta$) parece ser um dos mais importantes. As concentrações de $TGF\beta$ na matriz óssea correlacionam-se com os índices de remodelamento e com os marcadores do metabolismo ósseo (osteocalcina, fosfatase alcalina e com os pró-peptídeos de colágeno tipo I). O $TGF\beta$ também inibe a produção de RANKL pelos osteoblastos, diminuindo a reabsorção osteoclástica. Os osteoclastos são substituídos por células da linhagem osteoblástica que iniciarão a formação óssea (HADJIDAKIS, ANDROULAKIS, 2006; CROCKETT, et al., 2011).

2.2.2.4 Formação

A fase de formação de novo osso compreende um período de 4 a 6 meses. Os osteoblastos sintetizam uma nova matriz proteica, chamada de osteoide, que preenche as cavidades deixadas pelos osteoclastos. Essa matriz óssea, formada por proteínas como o colágeno tipo I, será lentamente mineralizada e responde por cerca de 50% do volume ósseo e 40% do peso ósseo. Os osteoblastos continuam com sua função até se transformarem em células de revestimento quiescente que recobrem a superfície óssea recém-formada. Outros osteoblastos permanecem dentro da matriz óssea tornando-se osteócitos, cujas expansões citoplasmáticas formam uma rede canalicular que se conecta com as células de revestimento da superfície óssea, outros osteoblastos e osteócitos. Após o término da fase de formação, entre 50% e 70% dos osteoblastos sofrem apoptose e o remanescente transforma-se em osteócitos ou em células de revestimento ósseo. Essas células de revestimento mantêm a capacidade de se tornarem osteoblastos (“de novo”) sob certos estímulos, além de regulamentar a troca de material iônico dentro e fora do líquido extracelular do osso atuando como uma barreira cérebro espinhal (BONEWALD, JOHNSON, 2008; DALLAS, BONEWALD, 2010; CROCKETT, et al., 2011).

2.2.2.5 Finalização do ciclo

A finalização do ciclo de remodelação é caracterizada pela mineralização (ou calcificação) e se inicia 30 dias após a formação da matriz osteoide. Nos ossos trabeculares, esse processo se conclui 90 dias após a deposição do osteoide; enquanto nos ossos corticais, completa-se aos 120 dias. Após a mineralização, o osso entra numa fase quiescente (HADJIDAKIS, ANDROULAKIS, 2006).

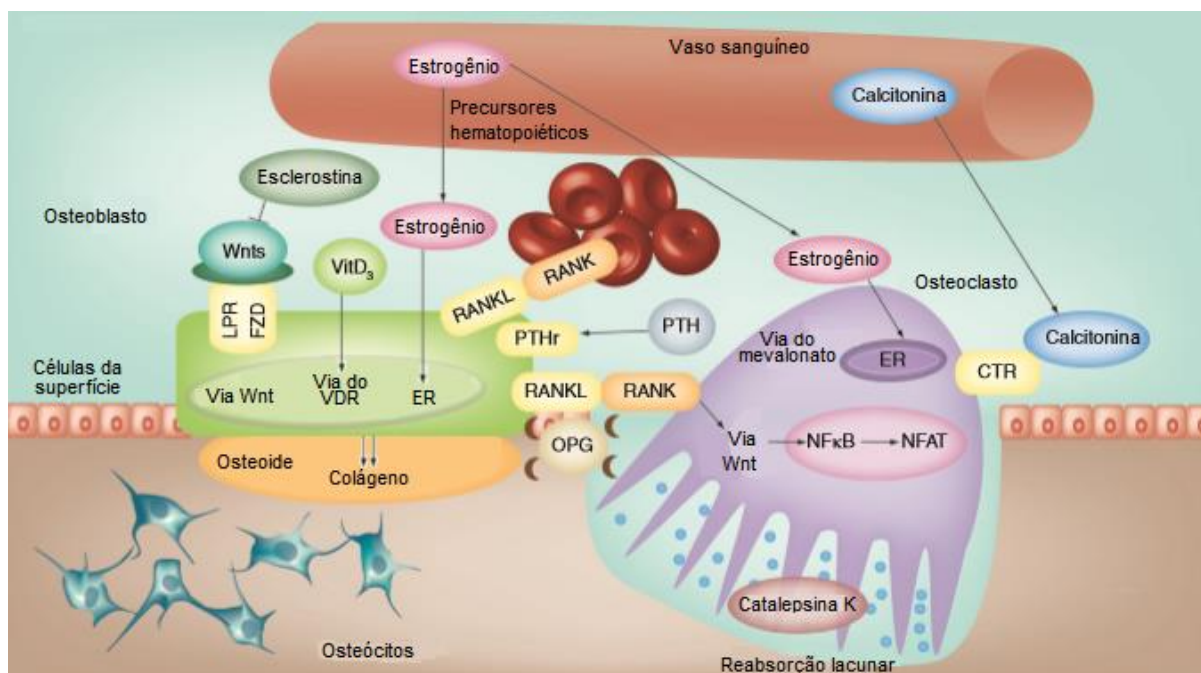
O conteúdo mineral ósseo é composto principalmente pelos cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, bem como por quantidades menores de carbonato, magnésio e fosfato. Tal composição fornece a rigidez e a força mecânica necessárias enquanto que a matriz orgânica colagenosa confere flexibilidade e elasticidade. O processo de mineralização é regulado pelas fosfoproteínas quinases e pela fosfatase alcalina. A vitamina D estimula indiretamente a mineralização da matriz osteoide (ANDERSON, 2003).

O remodelamento ósseo é importante para preservar a força mecânica dos ossos, substituindo-os por elementos mais novos e saudáveis, bem como é essencial para preservar a homeostase do cálcio e do fosfato. O remodelamento do osso cortical adulto ocorre a um percentual de 2% a 3% ao ano, considerado adequado para manter a força óssea biomecânica. A taxa de remodelamento do osso trabecular é maior, indicando que é o mais importante para o metabolismo mineral. O osso trabecular é o mais metabolicamente ativo, uma vez que apresenta maior quantidade de células ósseas por superfície quadrada. Quando as solicitações de cálcio ou fósforo aumentam, há incremento do número de unidades de remodelação óssea especialmente nos ossos trabeculares (ANDERSON, 2003; CROCKETT, et al., 2011).

O osso recém-formado tem um baixo conteúdo mineral e é capaz de trocar íons mais facilmente com o fluido extracelular. O balanço ósseo periosteal (quantidade de novo osso formado menos o osso reabsorvido) é levemente positivo, enquanto que o balanço ósseo endosteal e trabecular são levemente negativos na vida adulta; levando a um desgaste cortical e trabecular com o envelhecimento. Essas alterações ocorrem porque a reabsorção endosteal excede à formação periosteal (KATSIMBRI, 2017).

A Figura 6 representa a interação entre as células ósseas e as diversas proteínas presentes durante o ciclo de remodelamento ósseo.

Figura 6 - Interações entre células ósseas e proteínas envolvidas no ciclo de remodelamento. Participação das proteínas da via Wnt e da via OPG/RANK/RANKL. Hormônios como PTH, estrogênio, calcitonina e vitamina D controlam o ciclo. Síntese do colágeno tipo I pelos osteoblastos. Ação da catepsina K, importante enzima na reabsorção osteoclástica do tecido ósseo.



Fonte: Riancho, J.A.; Hernández, J.L, 2012.

2.3 VIA DE SINALIZAÇÃO WNT E CÉLULAS ÓSSEAS

A família Wnt, formada por 19 glicoproteínas, tem um papel fundamental na formação do ser humano e ao longo da vida. Em particular, a sinalização Wnt é necessária ao desenvolvimento esquelético, à homeostase óssea adulta e à remodelação óssea. As proteínas Wnt participam de diversas vias de sinalização. Porém, a via de sinalização Wnt β catenina canônica é responsável pela maior parte dos efeitos da sinalização Wnt no esqueleto. Nessa via, as proteínas axina, adenomatosis polyposis coli (APC) e β catenina formam um complexo na ausência da proteína ativadora Wnt, levando à fosforilação e à degradação da β catenina por uma proteólise mediada por ubiquitina com consequente diminuição da atividade dos osteoblastos. Quando as proteínas Wnt ligam-se a receptores específicos transmembrana frizzled (Fz) e ao correceptor da proteína receptora de LDL

relacionado (LRP), LRP5 ou LRP6, a β catenina é liberada do complexo e não sofre degradação proteolítica. A estabilização da β catenina produz sua translocação para o núcleo celular, onde se associa com o fator de transcrição 4 (TCF4) ou com o fator potenciador linfóide de ligação 1 (LEF1) que regulam a transcrição de genes alvo, tais como o *WISP1* e o *RUNX2* responsáveis pelo aumento da atividade osteoblástica (KRAMER, HALLEUX, KELLER, 2010).

Em camundongos, a inativação do gene *CTNNB1* (gene que codifica a β catenina) em condrócitos e nos seus precursores demonstra que a sinalização da via Wnt canônica é necessária para a maturação dessas células e para o desenvolvimento adequado do esqueleto. Camundongos sem a β catenina apresentam alteração do desenvolvimento esquelético e retardo na maturação dos condrócitos, gerando malformações craniofaciais, caixa torácica pouco desenvolvida, fenda palatina e membros curtos (LIU, KOHLMEIER, WANG, 2008).

Por outro lado, em camundongos transgênicos com a expressão aumentada de β catenina, observa-se uma letalidade pré-natal, indicando que a sinalização da via Wnt deve ser rigorosamente controlada (OTERO, SHINOHARA, ZHAO, 2012).

A sinalização Wnt promove a osteogênese por aumentar a expressão de *RUNX2* e *osterix*, fatores de transcrição necessários à osteoblastogênese e ao desenvolvimento do esqueleto. Além disso, a atividade da via Wnt inibe fatores adipogênicos suprimindo a formação de células gordurosas. Essas observações indicam que a atividade Wnt orienta a diferenciação de precursores mesenquimais para a formação de osteoblastos, reduzindo simultaneamente o potencial adipogênico (LIU, KOHLMEIER, WANG, 2008).

A sinalização Wnt também inibe a osteoclastogênese e a reabsorção óssea. Tal ação é em parte favorecida pela produção de osteoprotegerina, proteína secretada pelos osteoblastos e osteócitos, que se liga ao RANKL, impedindo a ligação deste ao seu receptor nos osteoclastos e, assim, bloqueando a osteoclastogênese. A regulação negativa da β catenina em precursores dos osteoblastos, osteoblastos maduros e osteócitos gera um decréscimo na expressão da osteoprotegerina provocando osteopenia (KRAMER, HALLEUX, KELLER, 2010).

A via Wnt interage com outras vias de sinalização no ambiente ósseo celular. Um desses sinais é o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), que aumenta a estabilização da β catenina. Noutra via, a atividade dos receptores Notch,

uma família de receptores transmembranares, impede a sinalização Wnt por aumentar a disponibilidade ou a atividade da quinase β do glicogênio sintase (GSK3 β) que fosforila e degrada a β catenina e o TCF4. Além disso, a atividade de sinalização Wnt também é modulada por fatores intracelulares e extracelulares que se ligam às proteínas Wnt ou a vários componentes da via de sinalização (LIU, KOHLMEIER, WANG, 2008; KRAMER, HALLEUX, KELLER, 2010).

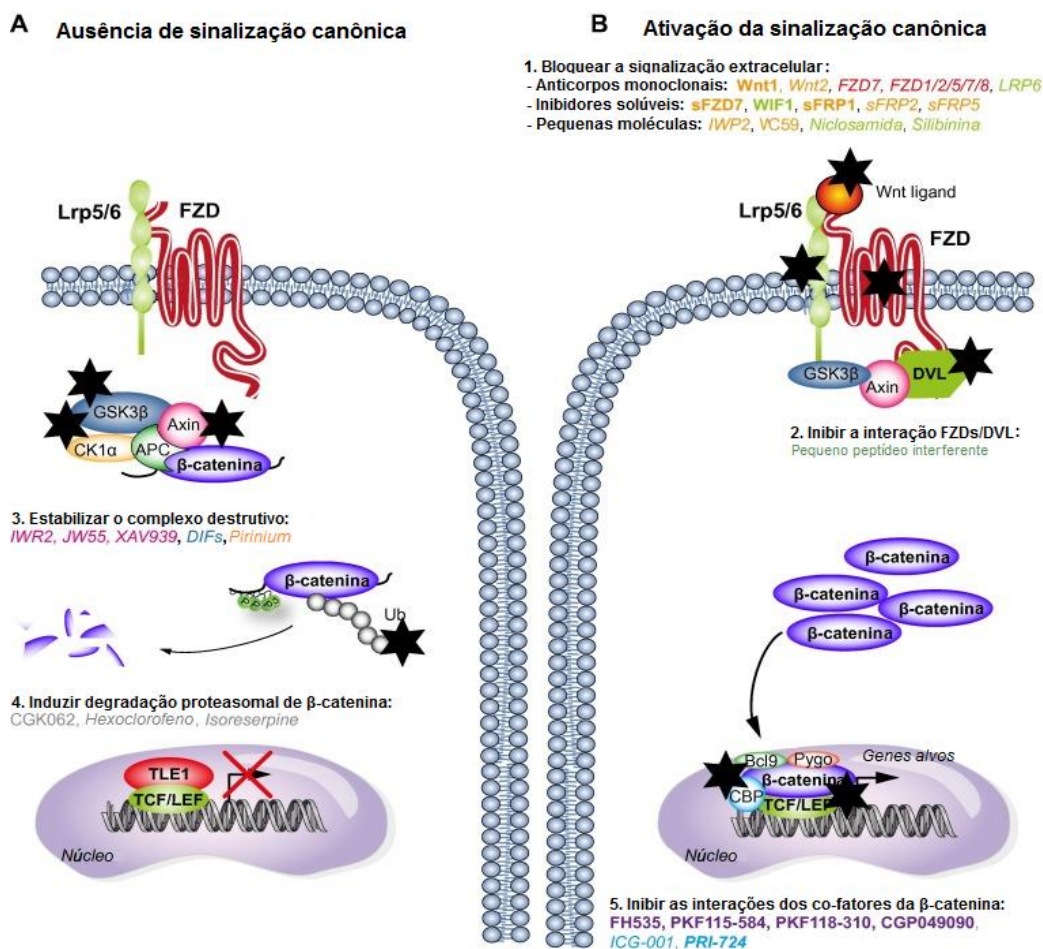
O estímulo mecânico ativa a sinalização Wnt em células da linhagem osteoblástica, sugerindo que a atividade da via responda pelo acoplamento entre as forças mecânicas e a resposta anabólica no esqueleto. O mecanismo que envolve a regulação negativa da esclerostina, um antagonista da via Wnt, é sobretudo expressa pelos osteócitos mecanossensores; e ocorre principalmente em zonas de tensão elevada do osso, locais onde há aumento da sinalização Wnt e formação óssea. Por outro lado, a esclerostina é regulada positivamente após uma “descarga do esqueleto” (quando uma pessoa passa muito tempo deitada), o que provoca a perda óssea devido ao aumento da reabsorção e diminuição da formação ósseas. Esses mecanismos podem ser relevantes para a patogênese da osteoporose de desuso, em que a imobilidade associada ao repouso prolongado geram uma perda de massa óssea. A osteoporose de desuso está relacionada com o aumento significativo no risco de fratura (BONEWALD, JOHNSON, 2008).

A atividade da via Wnt é modulada por proteínas que interagem diretamente com as da via Wnt ou com seus receptores. Além disso, a sinalização Wnt é regulada por moduladores transmembranares, tais como a proteína Kremen e LRP1 e proteínas quinases intracelulares, tais como GSK3 β e o domínio intracelular do Notch. A regulação da atividade celular das proteínas Wnt pelos seus antagonistas previne o excesso de exposição celular à sinalização da própria via (LIU, KOHLMEIER, WANG, 2008; KRAMER, HALLEUX, KELLER, 2010).

Os antagonistas que interagem com as proteínas Wnt incluem o fator de inibição da Wnt 1 (WIF1) e as proteínas secretadas frizzled relacionadas (sFRPs). Tais antagonistas atuam alterando a capacidade das proteínas Wnt em ligarem-se ao receptor do complexo Wnt. WIF1 é expresso na interface da cartilagem mesênquima e se opõe aos efeitos da WNT3a na condrogênese. Além disso, WIF1 é expresso durante a maturação e a diferenciação dos osteoblastos, possivelmente para regular a atividade da via enquanto que os osteoblastos completam sua diferenciação.

Curiosamente, *WIF1* é hipermetilado e consequentemente epigeneticamente silenciado em 75% do osteosarcoma humano, o que reforça a sinalização Wnt e o acúmulo intracelular de β catenina. Adicionalmente, em ratos nos quais o gene *WIF1* é inativado há desenvolvimento de osteosarcoma (LIU, KOHLMEIER, WANG, 2008; KRAMER, HALLEUX, KELLER, 2010; CRUCIAT, NIEHRS, 2013) (Figura 7).

Figura 7 - Via Wnt ativada e não sinalizada. Via Wnt ativada pelo seu ligante com a amplificação da β catenina e a via Wnt não sinalizada com a degradação da β catenina.



Fonte: Pez, F.; Lopez, A.; Kim, M.; et al., 2013.

As proteínas *sFRP1-sFRP5* podem interagir com as proteínas Wnt ou com o receptor frizzled para inibir a sinalização da via. Em ratos, *sFRP1* é um regulador negativo da formação óssea e a expressão transgênica excessiva de *sFRP4* em osteoblastos provoca osteopenia (LIU, KOHLMEIER, WANG, 2008; KRAMER, HALLEUX, KELLER, 2010; CRUCIAT, NIEHRS, 2013).

Os antagonistas que interagem com o correceptor Wnt LRP5-LRP6 incluem a esclerostina, a proteína Dickkopf-relacionada 1 (DKK1) e a ectodina. A esclerostina, codificada pelo gene *SOST*, é preferencialmente expressa por osteócitos e a sua função primária é a de inibir a sinalização Wnt por ligação ao correceptor LRP5-LRP6. Como consequência, a esclerostina inibe a osteoblastogênese e a formação óssea *in vitro* e *in vivo*. A expressão da esclerostina é regulada negativamente pela tensão mecânica e pelo PTH em osteócitos e osteoblastos (LIU, KOHLMEIER, WANG, 2008; KRAMER, HALLEUX, KELLER, 2010; CRUCIAT, NIEHRS, 2013).

O bloqueio total da atividade do gene *SOST* em ratos aumenta o número de osteoblastos, melhora a formação óssea e as propriedades biomecânicas dos ossos corticais e trabeculares. Inversamente, a hiperexpressão desse gene causa osteopenia secundária à diminuição do número de osteoblastos e redução da formação óssea (OTERO, SHINOHARA, ZHAO, 2012; CRUCIAT, NIEHRS, 2013). A ectodina apresenta estrutura semelhante à esclerostina e interage com LRP6. A ectodina é expressa durante o desenvolvimento ósseo, mas pouco se conhece sobre sua função. A família de glicoproteínas Dickkopf inclui DKK1, DKK2, DKK3 e DKK4 e a proteína relacionada Dickkopf-like 1 (DKKL1; também conhecida como proteína SOGGY1). Todas apresentam sequências semelhantes e são estruturalmente relacionadas, além de terem domínios ricos em cisteína e capacidade de se ligarem aos correceptores LRP5 e LRP6 (CRUCIAT, NIEHRS, 2013). Alguns estudos têm avaliado o DKK1 no desenvolvimento ósseo e nas manifestações esqueléticas de algumas doenças. DKK1 interage com o correceptor Wnt LRP5 -LRP6, bem como com as proteínas Kremen 1 e 2, formando um complexo ternário que prejudica a sinalização Wnt. Em ratos, a hiperexpressão de *DKK1*, no ambiente esquelético, inibe a sinalização Wnt e causa osteopenia. Ademais, a insuficiência de DKK1, em ratos, aumenta o número de osteoblastos, a formação óssea e o volume do osso. O bloqueio de esclerostina ou de DKK1 utilizando anticorpos neutralizantes está associado com o aumento da densidade mineral óssea, do volume de osso trabecular, do número de osteoblastos e da formação óssea em roedores, sugerindo que a regulação negativa da atividade dessas duas proteínas pode constituir uma abordagem anabólica para o tratamento da osteoporose (GLANTSCHNIG, et al., 2010).

2.4 GENÉTICA DA OSTEOPOROSE

Muitos fatores contribuem para o desenvolvimento da osteoporose. A idade, o sexo e a raça estão entre os principais determinantes da massa óssea e do risco de fraturas (HARRISON, et al., 2007; ROSENGREN, KARLSSON, 2014).

A osteoporose acomete preferencialmente indivíduos idosos, mais frequentemente mulheres acima de 45 anos de idade, embora o sexo masculino também possa ser acometido (KLOTZBUECHER, ROSS, LANDSMAN, 2000). As mulheres são mais suscetíveis à doença do que homens, pois apresentam menor pico de massa óssea, importante perda óssea durante a menopausa e, expectativa de vida crescente, portanto estão mais tempo sob risco para o desenvolvimento da patologia (SZEJNFELD, 2001).

Fatores genéticos também são responsáveis pelas variações na massa óssea em diferentes grupos étnicos e raciais. Indivíduos da raça negra possuem maior pico de massa óssea e, portanto, estão menos predispostos à osteoporose do que brancos e asiáticos (SZEJNFELD, 2001). Estima-se que 30% de todas as mulheres brancas pós-menopausadas terão pelo menos uma fratura osteoporótica durante a vida. A incidência de fraturas de fêmur em mulheres brancas é duas vezes maior do que em mulheres negras (KLOTZBUECHER, ROSS, LANDSMAN, 2000). A suscetibilidade à osteoporose também é, em parte, devida à hereditariedade. Mulheres jovens, filhas de pais ou mães com fratura vertebral associada à osteoporose possuem menor quantidade de massa óssea (ROSENGREN, KARLSSON, 2014).

A densidade mineral óssea (DMO) é uma característica quantitativa que parece ser geneticamente controlada, em 50 a 90% dos casos, de acordo com estudos em gêmeos e em famílias. Ao longo dos últimos 20 anos, a abordagem do gene candidato e os estudos de associação do genoma (GWAS) identificaram polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), que estão associados com baixa densidade mineral óssea, osteoporose e fraturas osteoporóticas. Estes SNPs foram mapeados próximo ou dentro de genes, incluindo aqueles que codificam receptores nucleares e proteínas de sinalização Wnt/ β catenina (URANO, INOUE, 2014).

Variações na DMO estão associados com polimorfismos em vários genes. Entre os vários candidatos, o gene do receptor de vitamina D (*VDR*), que codifica o receptor do hormônio, foi em 1994 o primeiro a ser proposto como um locus principal para o controle genético da DMO. O *VDR* desempenha um papel importante na

regulação da homeostase do cálcio através da ligação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, com consequente aumento da absorção desse mineral pelos intestinos (MORRISON, et al., 1994; THAKKINSTIAN, et al., 2004; GENNARI, et al., 2009).

A deficiência de estrogênio é outro fator de risco para osteoporose pós-menopausa. Dois receptores de estrogênio (ESRs), denominados ESR1 (ERa) e ESR2 (ERb), codificados por genes diferentes foram descritos. O receptor ERa é responsável principalmente pela ação do estrogênio no osso. A avaliação genética do locus do gene *ESR1* revelou a existência de vários locais polimórficos (GENNARI, et al., 2005). Em 1995 e 1996, confirmou-se a correlação entre DMO e os polimorfismos desse gene (SANO, et al., 1995; KOBAYASHI, et al., 1996; IWASHITA, KOYAMA, NAKAMURA, 2001; HERRINGTON, et al., 2002; GENNARI, et al., 2007).

Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), uma enzima importante no ciclo da metionina, que participa da remoção da homocisteína da circulação, é codificada em uma região de ligação no cromossomo 1p36 que está associada com a regulação da DMO (HERRMANN, et al., 2007; REILLY, et al., 2014). Um polimorfismo funcional foi identificado no exon 4 do gene *MTHFR* que resulta em níveis de homocisteína moderadamente elevados, fator de risco significativo para fraturas (LUBEC, et al., 1996; MCLEAN, et al., 2004).

2.4.1 As proteínas da via WNT

A importância da via Wnt de sinalização canônica na formação óssea é ressaltada pela observação de que vários distúrbios esqueléticos estão associados a alterações genéticas em componentes desta via. Por exemplo, as mutações no gene *SOST* resultam na esclerosteose e na síndrome de van Buchem, ambas caracterizadas por grande aumento da massa óssea. A esclerosteose é uma condição autossômica recessiva que ocorre principalmente na população africânder da África do Sul. Seus portadores apresentam grave displasia esquelética com grande crescimento ósseo, levando a desfiguração facial, alargamento do crânio com comprometimento neurológico e mortalidade elevada devido ao aumento da pressão intracraniana. Portadores heterozigóticos de mutações genéticas associadas com esclerosteose apresentam aumento da DMO. A Síndrome de van Buchem é prevalente em famílias holandesas e caracteriza-se por hiperostose endosteal do crânio e dos ossos longos. Pacientes acometidos têm queixo protuberante, testa alta,

e paralisia do nervo facial. Essa condição é provocada pela deleção de uma região de 52 kb que contém o elemento não-codificante ECR5, 35 kb adjacente da região esclerocodificante do *SOST*. A deleção de ECR5 em osteoblastos de ratos provoca uma regulação negativa da esclerostina e aumento da massa óssea (PETERS, et al., 2010; BHADADA, et al., 2013).

Mutações ativadoras em *LRP5* resultam em aumento da massa óssea, enquanto que mutações inativadoras no mesmo gene causam perda óssea. Elevada massa óssea é frequentemente secundária a mutações em *LRP5* em locais que codificam o primeiro domínio β propeller de *LRP5*. Essas mutações em *LRP5* produzem diminuição na afinidade para DKK1 ou esclerostina. Dessa forma, o correceptor *LRP5* em indivíduos acometidos é refratária às ações inibidoras desses antagonistas da via Wnt. Consistente com essas observações, os camundongos transgênicos que albergam mutações de ativação em *LRP5* exibem um elevado número de osteoblastos e aumento de massa óssea (WILLIAMS, INSOGNA, 2009).

LRP4, que também é expressa por osteoblastos, pode se ligar à esclerostina e ao DKK1. Estudos de associação identificaram que o locus *LRP4* relaciona-se com a DMO e que mutações em *LRP4* estão vinculadas com a sindactilia Cenani-Lenz, uma desordem caracterizada por desenvolvimento anormal do membro distal (LI, PAWLIK, ELCIOGLU, 2010).

Osteogênese imperfeita, uma doença hereditária caracterizada por fragilidade óssea, é frequentemente associada a mutações nos genes *COL1A1* ou *COL1A2*, que codificam as cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ do colágeno tipo I. Mutações em *WNT1* que resultam em proteínas não funcionais ou mesmo com função diminuída causam uma forma autossômica recessiva de osteogênese imperfecta associada ao início precoce da osteoporose e fraturas por fragilidade na infância (FAHIMINIYA, et al., 2013). Essas observações confirmam a importância da sinalização Wnt na manutenção da homeostase dos ossos e na integridade do esqueleto (LI, PAWLIK, ELCIOGLU, 2010; FAHIMINIYA, et al., 2013).

Em 2001, Gong e colaboradores demonstraram que a via de sinalização Wnt / β catenina desempenha um papel fundamental na regulação da densidade óssea por meio de *LRP5*. Os autores mostram que mutações que inativam o gene *LRP5* diminuem a massa óssea e causam uma doença autossômica recessiva chamada de síndrome osteoporose-pseudoglioma. Por outro lado, em 2008, Ezura e colaboradores demonstraram que mutações ativadoras no *LRP5* geram traços autossômicos

dominantes de massa óssea elevada, sugerindo que LRP5 controla o metabolismo do osso *in vivo* em seres humanos.

Além do SNP A1330V no gene *LRP5*, duas variantes não sinônimas, Q89R e V667M, estão também relacionadas ao metabolismo ósseo. Na população caucasiana, o polimorfismo V667M está fortemente associado com a DMO. Estudos do V667M na população asiática nunca foram relatados, possivelmente devido à baixa frequência do alelo menor deste SNP nesta população. Por outro lado, o polimorfismo Q89R foi estudado apenas na população Asiática, provavelmente devido a sua baixa frequência em outros grupos étnicos. Q89R está associado à DMO do colo femoral em jovens coreanos e de mulheres chineses na pós-menopausa. Na população coreana e chinesa, foi observada forte desequilíbrio de ligação entre os SNPs Q89R e o A1330V. Por outro lado, não se observou desequilíbrio de ligação entre estes dois SNPs na população japonesa ($D0 = 0,65$, $r^2 = 0,08$) (KOH, et al., 2004).

Os resultados de procedimentos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a ativação da via de sinalização Wnt canônica acomete toda a linhagem osteoblástica e aumenta a formação de osso. A sinalização Wnt / β catenina em osteoblastos e em osteócitos reprime indiretamente a diferenciação de osteoclastos e conseqüentemente a reabsorção óssea. Estes dados sugerem que a variação A1330V no gene *LRP5* pode atuar na patogênese da osteoporose através da diminuição da atividade Wnt (KOH, et al., 2004).

Estudo por meta-análise avaliou os efeitos da mutação do correceptor LRP5 da via Wnt e identificou que os portadores de rs3736228 C> T no gene *LRP5* foram associados com um risco aumentado de desenvolver osteoporose e fraturas em quatro modelos genéticos, mas não sob o modelo dominante ($OR = 1,19$, $95\% CI = 0,97\text{--}1,46$ e $P = 0,103$). Análise do subgrupo de etnia implicou que os portadores asiáticos e caucasianos da mutação *LRP5* rs3736228 C>T apresentam maior probabilidade de desenvolver osteoporose e fraturas (XU, QIU, MAO, 2014).

Avaliação de 425 mulheres mexicanas pós-menopausadas investigou a associação de SNPs localizados nos genes da via Wnt com a massa óssea. O SNP rs752107 do gene codificante da *WNT3A* foi fortemente associado com a diminuição da DMO em quadril total (VELÁZQUEZ-CRUZ, et al., 2014).

Análise realizada em 399 mulheres coreanas pós-menopausadas sugere que polimorfismos do gene codificante da proteína relacionada ao receptor frizzled (sFRP),

sFRP3 c.970C> G e sFRP4 c.958C> A podem ser fatores genéticos associados com a prevalência de osteoporose do colo femoral (LEE, et al., 2014). Estudo com 1.385 mulheres espanholas avaliou a relação entre massa óssea e polimorfismos relacionados ao gene que codifica a proteína relacionada ao receptor frizzled (sFRP) e identificou associação entre o rs4666865 do gene *sFRP* e a DMO da coluna lombar no subgrupo da região de Cantabria ($P = 0,008$) (VALERO, et al., 2011).

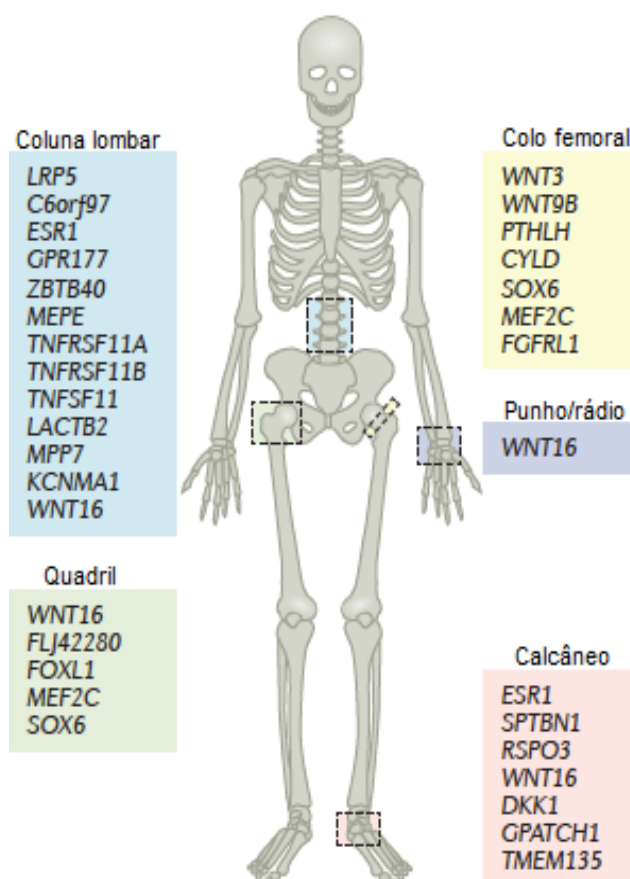
As R-espondinas (Rspo's) são um recém-descoberto grupo de proteínas compostas por 4 membros (Rspo1-4). Recentemente, as Rspo's foram implicadas como moduladores da via de sinalização Wnt. Elas regulam positivamente a via Wnt através da estabilização citosólica da β catenina. Isso é conseguido pela ligação da Rspo ao LRP6 que altera o complexo LRP6-DKK; e, conseqüentemente a sinalização da via Wnt canônica. Todos os membros da família Rspo tem organização estrutural comum e compartilham cerca de 60% de sequência homóloga. Recentemente, alguns estudos relataram que Rspo modula a via de sinalização Wnt através de receptores acoplados à proteína G (KHAN, et al., 2012; SHARMA, et al., 2015).

Quatrocentas mulheres mexicanas pós-menopausadas foram incluídas em estudo que avaliou a associação de SNPs na MEF2C, genes *SOST* e *JAG1* com a densidade mineral óssea. Na análise de regressão linear ajustada por idade, índice de massa corporal e ascendência, mostrou que cinco SNPs no gene *SOST* foram significativamente associados com a DMO no quadril total e no colo do fêmur ($p < 0,0012$). Não foi estabelecida associações significativas entre a DMO e variantes genéticas / *JAG1* MEF2C [rs1366594 "A" alelo: $\beta = 0,001$ (IC 95% -0,016; 0,017), $P = 0,938$; rs2273061 "L" alelo: β IC = 0,007 (95% -0,007;0,023), $p = 0,409$] (VELÁZQUEZ-CRUZ, et al., 2014).

Embora a genética da osteoporose tenha sido avaliada através de vários estudos de associação, os principais genes de suscetibilidade e os mecanismos moleculares responsáveis por essa doença permanecem pouco claros. A identificação de novos genes candidatos que contribuem para a suscetibilidade osteoporótica terá impacto sobre o diagnóstico e o tratamento dessa patologia. Os rápidos avanços tecnológicos têm facilitado o desenvolvimento de estudos do genoma de associação. Vários GWAS descobriram novos SNPs associados com doenças incluindo osteoporose e a baixa DMO em populações caucasianas e asiáticas (RALSTON, UITTERLINDEN, 2010).

Para a osteoporose, os GWAS identificaram os seguintes genes candidatos na via de sinalização Wnt / β catenina: catenina b1 (*CTNNB1*), esclerostina (*SOST*), *LRP4*, *LRP5*, *GPR177*, *WNT4*, *WNT5B*, *WNT16*, Dickkopf1 (*DKK1*), o gene para a proteína secretada Frizzled relacionada 4 (*sFRP4*), Jagged 1 (*JAG1*), *MEF2C* e *AXIN1*. Entre estes, a função de ativadores para *WNT4*, *WNT5B*, e *WNT16* enquanto *SOST*, *DKK1* e *sFRP4* suprimem a via de sinalização Wnt / β catenina, inibindo a interação entre os membros da família Frizzled, LRP5 e Wnt. *MEF2C* potencializa a expressão *SOST*; e *JAG1* é alvo de controle da transcrição β catenina (RALSTON, UITTERLINDEN, 2010). Além desses genes descritos, outros, como demonstrado na Figura 8 estão relacionados com a densidade mineral óssea.

Figura 8 - Os mais importantes genes relacionados à densidade mineral óssea. Representam os principais genes identificados nos estudos de genoma de associação relacionados com a DMO.



2.5 TRATAMENTO DA OSTEOPOROSE

Os medicamentos antiosteoporóticos que atuam no metabolismo ósseo são classificados como antirreabsortivos (anticatabólicos) ou formadores de osso (anabólicos). As drogas antirreabsortivas atuam bloqueando a atividade osteoclástica, reduzindo o remodelamento ósseo. Por outro lado, as drogas formadoras estimulam a osteoblastogênese, aumentando a formação da matriz óssea (KANIS, MCCLOSKEY, JOHANSSON, 2013).

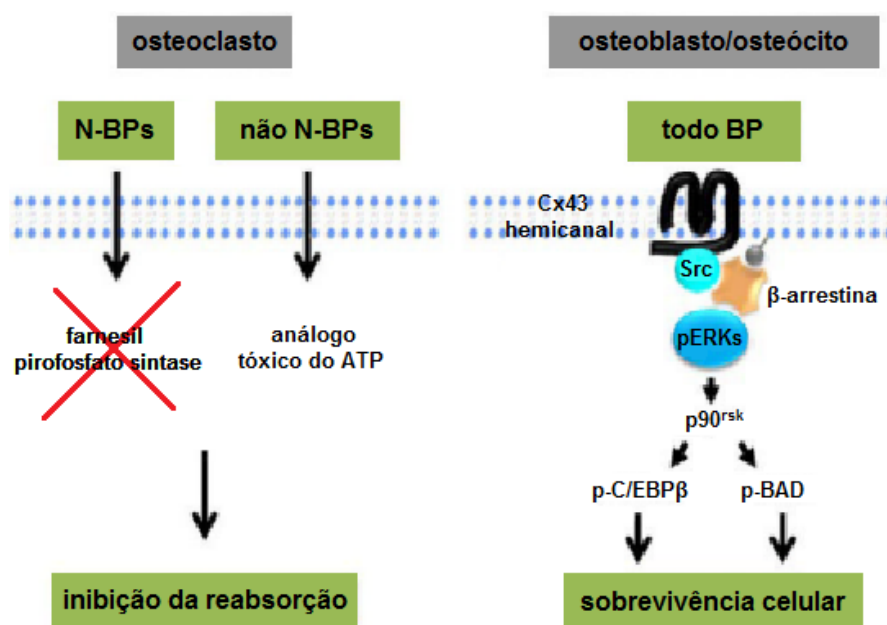
Os bisfosfonatos são considerados a terapêutica farmacológica de primeira linha no tratamento da osteoporose para a maioria das mulheres na pós-menopausa com alto risco de fratura. De ação antirreabsortiva, são eficientes e acessíveis, e os dados de segurança a longo prazo estão disponíveis para a maioria dos compostos (MCCLUNG, et al., 2013; PAVONE, et al., 2017).

Essas drogas atuam interferindo em vias intracelulares específicas nos osteoclastos que culmina na apoptose da célula. Nos ossos, ligam-se especificamente à hidroxiapatita. (PAZIANAS, ABRAHAMSEN, 2016; PAVONE, et al., 2017). Comprometem a reabsorção óssea osteoclástica de várias formas: produzem lesão citotóxica nos osteoclastos maduros, impedem a ligação dos osteoclastos ao osso, inibem a diferenciação ou recrutamento de osteoclastos e interferem na formação dos componentes do citoesqueleto necessária à reabsorção óssea (NAYAK, GREENSPAN, 2016).

Entretanto, estudos mais recentes têm demonstrado ação dos bisfosfonatos em linhagem de osteoblastos e osteócitos. Estudos com culturas celulares demonstraram que os bisfosfonatos induzem a ativação por fosforilação de quinases regulatórias de sinal extracelular (ERKs), de células osteocíticas e osteoblásticas inibindo a apoptose celular. O aumento dos níveis das ERKs fosforiladas também foi encontrado em ossos de animais que receberam uma única injeção de zolendronato. A ação antiapoptótica dos bisfosfonatos não requer fatores de transcrição dependentes da ERK, mas sim, a atividade quinase do alvo citoplasmático da ERK, a p90^{RSK}; que por sua vez fosforila a proteína pró-apoptótica BAD e C / EBPβ. A fosforilação da BAD torna-a inativa, enquanto que a fosforilação de C / EBPβ leva à ligação de pró-caspases, que inibem a apoptose celular. No caso dos bisfosfonatos, nenhum receptor, até o momento, foi identificado. Portanto, essas drogas ativam ERKs por alteração da permeabilidade de canais formados pela conexina (Cx) 43. Os

hexâmeros de conexina formam canais na membrana plasmática, chamados hemicanais, os quais podem se alinhar para formar um canal de “junção gap”. A comunicação intercelular entre osteócitos e osteoblastos é realizada através dessas junções, cuja abertura permite a troca de conteúdo citoplasmático com o fluido extracelular. Possivelmente, os bisfosfonatos, devido ao seu pequeno tamanho molecular, penetram nas células osteoblásticas após induzir a abertura dos hemicanais de conexina de acordo com a figura 9 (BELLIDO, PLOTKIN, 2011; SADR-ESHKEVARI, et al., 2014; XU, et al., 2015).

Figura 9 - Bisfosfonatos evitam a apoptose de osteoblastos e osteócitos. Os bisfosfonatos mantêm os canais de Cx43 abertos favorecendo a fosforilação das ERKs e a sobrevivência celular.



Fonte: Bellido, T.; Plotkin, L., 2011.

Existem duas subclasses de bisfosfonatos (BPs): bisfosfonatos contendo nitrogênio (BPNs), como o alendronato, o ibandronato, o pamidronato, o risedronato e o zoledronato ou ácido zoledrônico, que são os bisfosfonatos mais comuns; e os que não contêm nitrogênio (BPNNs), como o etidronato. Os BPNs inibem a via do mevalonato, uma via metabólica importante na formação do colesterol e na função da membrana celular. Por outro lado, os BPNNs atuam através da formação de metabólitos que geram análogos tóxicos de ATP e induzem à apoptose celular (PAZIANAS, ABRAHAMSEN, 2016).

A primeira escolha de terapia com bisfosfonatos é geralmente um regime oral de alendronato ou risedronato, tomado uma vez por semana. E por serem pobremente absorvidos, devem ser ingeridos com o estômago vazio, na primeira hora da manhã com pelo menos 240 mL de água. Após a administração, o paciente deve ficar em pé por pelo menos 30 a 45 minutos e abster-se de consumir alimentos, bebidas, medicamentos ou suplementos durante esse período. Assim, a assimilação da droga no trato gastrointestinal é potencializada (MCCLUNG, et al., 2013; NAYAK, GREENSPAN, 2016).

A dosagem típica é de 70 mg de alendronato sódico ou 35 mg de risedronato sódico, semanalmente, ou 150 mg de ibandronato sódico, uma vez por mês, em forma de comprimido para o tratamento e prevenção da osteoporose. A administração intravenosa de ácido zoledrônico realizada a cada 12 meses e a de ibandronato sódico venoso, a cada 3 meses, é sugerida em pacientes nos quais o uso de bisfosfonato oral é contraindicado, como naqueles indivíduos com baixa tolerância ou doença gastrointestinal (PAZIANAS, ABRAHAMSEN, 2016).

Os eventos adversos mais comuns, particularmente para os bisfosfonatos orais, são os distúrbios gastrointestinais, como dispepsia, esofagite e ulcerações gástricas. Raramente pode ocorrer fibrilação atrial ou insuficiência renal, e não devem ser utilizados em pacientes com doença renal crônica ou com taxa de filtração glomerular estimada <30 a 35 mL / min (MCCLUNG, et al., 2013).

Além disso, as fraturas atípicas do fêmur, especialmente as fraturas subtrocantéricas e diafisárias, foram associadas ao uso de bisfosfonatos, provavelmente devido a uma excessiva supressão do remodelamento ósseo que acarreta acúmulo de microfissuras. Tais microfissuras representam uma característica normal do tecido ósseo, surgem em consequência do estresse e atuam como estímulo para a remodelação óssea (JIN, et al., 2017).

A osteonecrose da mandíbula, uma complicação oral que pode surgir em pacientes, especialmente naqueles com cirurgia maxilo-facial ou oral recentes, também está relacionada ao uso de bisfosfonatos (CONSOLARO, 2014).

Um elevado número de indivíduos recebe terapia com bisfosfonatos. Em 2008, pelo menos 4 milhões de mulheres americanas trataram de osteoporose com essa classe de drogas. Além disso, muitos homens com osteoporose e indivíduos que utilizam glicocorticoides também receberam essa terapêutica. Com uma quantidade significativa de pacientes recebendo tal tratamento e com durações cada vez mais

longas, há um crescente questionamento sobre seu uso a longo prazo e o surgimento de efeitos indesejáveis; de forma que, em indivíduos com menor risco de fratura, a suspensão temporária da droga tem sido utilizada em alguns protocolos de tratamento (RO, COOPER, 2014).

Outras medicações para o tratamento da osteoporose também se destacam. O denosumabe, primeiro anticorpo monoclonal totalmente humano, liga-se especificamente ao RANKL, inibindo a formação e a ativação dos osteoclastos. De ação antirreabsortiva, foi aprovado para o tratamento da osteoporose pós-menopausa devido à sua forte eficácia na redução das fraturas da coluna vertebral e do quadril. Pode ser administrado uma vez a cada 6 meses e suprime a reabsorção óssea entre 80 e 90% (TAKEUCHI, et al., 2016; BONANI, et al., 2017; SUZUKI, NAKAMURA, KATO, 2017).

Os moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERMs) são compostos estruturalmente diferentes que interagem com receptores de estrogênio intracelular em órgãos alvo como agonistas ou antagonistas. Essas drogas têm sido intensamente estudadas na última década e provaram compor um grupo altamente versátil para o tratamento de diferentes condições associadas à saúde da mulher pós-menopausada, incluindo câncer responsivo à terapêutica hormonal e osteoporose. Dentre esses, destacam-se o raloxifeno e novas moléculas como o ospemifeno, lasofoxifeno, bazedoxifeno e arzoxifeno, com maior eficácia e potência do que o primeiro SERM (SILVERMAN, et al., 2012; MAXIMOV, LEE, JORDAN, 2013; ELLIS, et al., 2014; TABATABAEI-MALAZY, et al., 2017).

A teriparatida é um hormônio recombinante da paratireoide, único agente anabólico aprovado para o tratamento da osteoporose que estimula a formação óssea através da ativação dos receptores do PTH (PTHrP) nos osteoblastos. Induz a formação óssea em locais ativos de remodelação e em superfícies ósseas previamente inativas, além de iniciar novos sítios de remodelação. Um outro análogo sintético de PTHrP 1-34 humano (abaloparatida) está em avaliação como um novo tratamento para a osteoporose. Seus resultados demonstram uma atividade anabólica potente e rápida com efeitos reduzidos na reabsorção óssea em comparação com a teriparatida, além de uma melhor estabilidade à temperatura ambiente (AUGUSTINE, HORWITZ, 2013; TAMURA, KAJI, 2013; GONNELLI, CAFFARELLI, 2016; HATTERSLEY, et al., 2016; JIANG, et al., 2017).

O anticorpo antiesclerostina romosozumabe, é um anticorpo monoclonal humanizado que se liga à esclerostina e impede que a mesma exerça seus efeitos inibitórios na via de sinalização Wnt, levando à formação óssea e ganho de DMO (LI, et al., 2008; LI, et al., 2009; OMINSKY, et al., 2010; LIM, BOLSTER, 2017).

Na via de sinalização Wnt, o DKK1 forma um complexo ternário com os receptores LRP5, LRP6 e Kremen, resultando na supressão da sinalização Wnt e na diminuição da formação óssea. O anticorpo monoclonal antiDKK1 mostrou acelerar a formação do osso e aumentar a DMO em vários modelos animais e está em desenvolvimento como um agente anabolizante ósseo (BUTLER, et al., 2011; AHMED, FOUDA, ABBAS, 2013; TAI, INOUE, 2014; JIN, et al., 2015).

Odanacatib é um inibidor de catepsina K desenvolvido para o tratamento da osteoporose pós-menopausa. Os osteoclastos expressam várias enzimas para a degradação da matriz óssea, incluindo a catK, uma proteinase de cisteína lisossomal. Essa enzima exibe uma alta atividade de collagenase, especialmente no pH ácido, necessário à dissolução da matriz óssea. O uso de odanacatibe demonstrou aumento da DMO no quadril e na coluna lombar ao longo de 5 anos. A microarquitetura e a força ósseas também foram melhoradas em ensaios clínicos utilizando tomografia computadorizada quantitativa (QCT) para avaliação da coluna lombar e do quadril; e QCT periférica de alta resolução, para avaliação do raio distal e da tíbia. Entretanto, seus estudos foram descontinuados em setembro de 2016 devido ao aumento de incidência de acidente vascular cerebral (CHAPURLAT, 2015; MULLARD, 2016).

Na Tabela 1 está descrita a eficácia de alguns agentes antiosteoporóticos.

Tabela 1 - Eficácia de vários agentes antiosteoporóticos na prevenção de fraturas e ganho de DMO na coluna vertebral.

Medicamentos	Ganho de DMO na coluna (%) Redução de Fratura (%)
Bisfosfonatos:	
-Alendronato	5-7/30-45
-Ibandronato	4-6/32-43
-Risedronato	5-7/30-45
-Zoledronato	6-9/~70
Denosumabe	3-6/55-70
Raloxifeno (SERM)	1-3/30-40
Estrogênio	3-5/35
Calcitonina	1-1,5/20-30
Anabólicos:	
-Teriparatida	10u-15/50-65
-Ranelato de Estrôncio	2-4/20-35

Fonte: Khajuria, D.K.; Razdan, R.;Mahapatra, D.R., 2011.

2.6 FRAX® - FRACTURE RISK ASSESSMENT TOOL

A fratura por fragilidade, consequência da osteoporose, é a principal causa de diminuição da qualidade de vida, morbidade e mortalidade na pós-menopausa. Por isso, a seleção de mulheres com risco de fratura e que se beneficiarão do tratamento farmacológico é de grande importância. A definição da probabilidade de fratura em termos absolutos, utilizando fatores de risco clínicos e a avaliação da DMO, com

auxílio o de ferramentas clínicas, é a forma atual mais utilizada na seleção de indivíduos para tratamento da osteoporose (GEHLBACH, et al., 2012).

Os principais fatores de risco associados à perda de massa óssea são: idade avançada, sexo feminino, período de pós-menopausa, baixo índice de massa corpórea (IMC), fratura por fragilidade prévia, história familiar de fratura, vida sedentária, fumo e uso de glicocorticoides. Esses fatores de risco podem indicar a possibilidade de fratura de forma independente ou parcialmente dependente da DMO. Alguns fatores podem ser usados para a avaliação do risco de fratura mesmo na ausência de valores da DMO. Dessa forma, a determinação criteriosa e a validação dos principais fatores de risco para a osteoporose podem melhorar a predição de fraturas e permitir uma melhor seleção de pacientes para tratamento (ZERBINI, et al., 2015).

Com o objetivo de aperfeiçoar a identificação dos indivíduos com risco de fratura, foram criadas ferramentas clínicas que combinam a idade e o gênero com fatores de risco clínico para estimar o risco de fratura futura (JARVINEN, et al., 2015). Dentre as ferramentas, foi desenvolvido pela OMS o Fracture Risk Assessment Tool (FRAX) (KANIS, 2008). Esse modelo, disponível na internet, estima a probabilidade de fratura de quadril e de “fraturas maiores” (fraturas clínicas vertebrais, antebraço, quadril e ombro) num período de 10 anos. É individualizado e pode ajudar a identificar candidatos à farmacoterapia (KANIS, et al. 2011).

Os dados utilizados no FRAX são: idade ou data do nascimento, sexo, peso, altura, fatores de risco clínicos (Tabela 2) e o valor da DMO do colo femoral se disponível. Os modelos do FRAX são específicos para cada país e baseados em estudos epidemiológicos nacionais (ZERBINI, et al., 2015).

Diversos países utilizam essa ferramenta para decidir a conduta terapêutica (DAWSON-HUGHES, et al., 2008; ASCO, 2010; COMPSTON, et al., 2009; CZERWINSKI, et al., 2009; BADURSKI, et al., 2011; FUJIWARA, et al., 2008). Nos Estados Unidos, por exemplo, a National Osteoporosis Foundation indica tratamento farmacológico para mulheres com T-score inferior a -1,5 DP e superior a -2.5 DP (osteopenia) se a probabilidade de fratura nos próximos dez anos, determinada no FRAX, for igual ou superior a 3% no quadril ou; igual ou superior a 20% para “fraturas maiores”. Esses valores de corte indicativos de tratamento são baseados em análises de farmacoeconomia e nas taxas de fratura e mortalidade daquele país (COSMAN, et

al., 2014). A concepção dessa ferramenta e dos valores de corte terapêutico devem ser baseados em dados epidemiológicos próprios da população de cada país (PINHEIRO, et al., 2009).

No Brasil, o FRAX está disponível para uso clínico desde 2013 (ZERBINI, et al., 2015) e tem como base dados de prevalência de fratura de quadril e mortalidade de quatro estudos clínicos epidemiológicos realizados em Porto Alegre (SCHWARTZ, et al, 1999), Sobral (CASTRO DA ROCHA, RIBEIRO, 2003), Marília (KOMATSU, RAMOS, SZEJNFELD, 2004) e Fortaleza (SILVEIRA, et al., 2005). Existem, no entanto, questionamentos epidemiológicos relacionados sobretudo ao tamanho e à heterogeneidade dos quatro estudos que serviram como banco de dados para a sua concepção; não estando definido, até o momento, o valor da probabilidade no qual haveria indicação de intervenção, o que diminui a relevância dessa ferramenta na prática clínica em nosso país (ZERBINI, et al., 2015; URBANETZ, 2013). Por outro lado, deve-se considerar que a formatação do FRAX é dinâmica e evolutiva, sendo possível a posterior inclusão de novos estudos epidemiológicos ou fatores de risco que melhorem sua acurácia. Há ainda a expectativa de definição do valor de intervenção específico para a população brasileira. Ressalta-se que o FRAX tem a função primordial de auxiliar e não de abolir ou se sobrepor ao julgamento clínico na decisão terapêutica (ZERBINI, et al., 2015).

Tabela 2 - Fatores de risco clínico utilizados na ferramenta FRAX.

Idade
Gênero
Peso
Altura
País com fratura de quadril
Tabagismo atual
DMO do colo do fêmur (g/cm²)
Artrite reumatoide
Osteoporose secundária: ocorre quando o paciente tem uma doença fortemente associada à osteoporose, como o diabetes tipo I (insulina dependente), a osteogênese imperfeita, o hipertireoidismo não tratado, o hipogonadismo ou a menopausa precoce (< 45 anos), a má nutrição crônica, as síndromes de má absorção ou a doença hepática crônica.
Uso de álcool (ingesta de 3 ou mais doses/dia): uma unidade de álcool varia pouco entre os diferentes países e está entre 8 e 10 g de álcool. Isso equivale a um copo de cerveja (285 ml), uma medida de drinque (30 ml), um copo médio de vinho (120 ml) ou uma medida de aperitivo (60 ml).
Uso de glicocorticoides: como a prednisolona em dose diária igual ou maior a 5 mg (ou outros glicocorticoides em doses equivalentes) por mais de 3 meses.

Observação: Há fatores de risco como o tabagismo, o uso de álcool ou de glicocorticoides, que parecem ter um efeito dose dependente, ou seja, maior a exposição, maior o risco. Tais fatores não são considerados e a ferramenta assume a média de exposição. Portanto, o julgamento clínico deve ser utilizado para alta ou baixa exposição a esses fatores.

3 HIPÓTESE

As proteínas que compõem a via de sinalização Wnt apresentam importante papel na modulação da resposta metabólica óssea, na formação e homeostase do tecido ósseo. Sabendo-se que modificações na função dessas proteínas podem gerar alterações na massa óssea e que a terapêutica de primeira linha no tratamento da osteoporose é representada pelos bisfosfonatos de ação classicamente antiosteoclástica, investigamos a possibilidade de atuação do alendronato de sódio na expressão dos genes *SOST*, *LRP5*, *DKK1*, *WNT2*, *WNT16* e *BMP2* da via Wnt de sinalização em pacientes osteoporóticos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de expressão gênica de proteínas da via Wnt codificadas pelos genes *SOST*, *LRP5*, *DKK1*, *WNT2*, *WNT16* e *BMP2* e sua relação com o uso oral de alendronato de sódio em pacientes portadores de osteoporose e de osteopenia no estado de Pernambuco.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estabelecer características sócio epidemiológicas da população estudada (como idade, idade de menarca, idade de menopausa, informações sobre tabagismo e comorbidades, consumo de álcool, prática de exercícios físicos, peso, IMC, uso de medicações, diagnóstico de osteoporose em parentes de primeiro grau) e suas possíveis relações com a baixa DMO.

2. Estabelecer parâmetros laboratoriais do metabolismo ósseo da população estudada (como dosagens de cálcio, fósforo, magnésio, fosfatase alcalina, PTH, 25-hidroxivitamina D₃ (25(OH)D), calciúria de 24H) e suas possíveis relações com a baixa DMO.

3. Avaliar o perfil de expressão dos genes *SOST*, *LRP5*, *DKK1*, *WNT2*, *WNT16* e *BMP2* em pacientes com osteoporose e com osteopenia, comparando com mulheres pós-menopausadas saudáveis.

4. Avaliar uma possível função anabólica do alendronato de sódio através da sua atuação na expressão de proteínas da via Wnt.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Neste trabalho, foram selecionadas 695 mulheres em período de pós-menopausa atendidas na Divisão de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) no período de 2011 até 2017. Esse conjunto é denominado Grupo Clínico, cujos indivíduos foram classificados em 3 subgrupos: portadoras de osteopenia (OPN), portadoras de osteoporose (OP) e controle saudável (CT), de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (KANIS, et al., 2008).

Para a realização dos ensaios de expressão, foram selecionadas 30 mulheres de cada subgrupo do Grupo Clínico: OP, OPN e CT. Esse novo conjunto foi denominado Grupo Expressão, cujas pacientes deveriam estar, por pelo menos 1 ano, em uso regular de alendronato de sódio (70 mg por semana) e sem uso (continuado ou intermitente) de suplementos de cálcio e/ou vitamina D.

Foram excluídas do estudo mulheres portadoras de doenças reumatológicas autoimunes e as que não concordaram em participar da pesquisa. As participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A) e, posteriormente, o formulário de acompanhamento de pacientes (Apêndice B) foi preenchido para registro de dados clínicos, laboratoriais e das características sócio epidemiológicas. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFPE - parecer número 1.888.047 (Anexo A) e encontra-se de acordo com a Declaração de Helsinki. A análise genética das amostras coletadas (5 ml de sangue das pacientes e controles) foi realizada no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA.

5.2 ISOLAMENTO DE RNAm E SÍNTESE DE cDNA

Para os ensaios de expressão, foi inicialmente realizada a extração do RNA total a partir de $1-5 \times 10^6$ linfócitos de 30 pacientes de cada subgrupo estudado (CT, OPN e OP), com o uso de Trizol® de acordo com as instruções do fabricante. Apenas as amostras que exibiram os fragmentos 28S e 18S no gel de agarose e valores de absorbância OD 260/280 (1000 spectrophotometer - Nanodrop Technologies Inc, Delaware, USA) entre 1,8 a 2,0, foram incluídas na análise. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total para cada tubo de 40 µl de reação, padronizando assim, a concentração de RNA para a quantificação da expressão gênica. O kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) foi utilizado para a conversão do RNA em cDNA de acordo com as instruções do fabricante.

5.3 ENSAIOS DE EXPRESSÃO

Os ensaios de expressão gênica foram realizados em triplicata, para os genes *LRP5*, *DKK1*, *SOST*, *WNT2*, *WNT16* e *BMP2*, selecionados por expressarem as proteínas chaves e regulatórias da via Wnt de sinalização. A tecnologia utilizada foi o sistema de detecção Real-Time PCR ABI 7500 (Thermo Fisher, Foster City, USA). O gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), proteína ribossomal P0 (RPLP0) e beta-2-microglobulina (B2M) foram utilizados como genes de referência previamente validados para normalização dos dados. O número do ciclo em que a transcrição dos genes passou a ser detectada (Cq) foi normalizada com o número do ciclo de detecção dos genes de referência, gerando o denominado delta Cq (ΔCq). A diferença de expressão do gene de interesse em relação aos subgrupos estudados foi expressa em $2^{-\Delta\Delta Cq}$, na qual $\Delta\Delta Cq$ corresponde ao ΔCq dos subgrupos OPN e OP menos ΔCq do subgrupo controle saudável. Dessa forma, conseguimos detectar quantas vezes o gene de interesse se encontra mais ou menos expresso em relação ao grupo controle estudado.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise das variáveis categóricas, seja das características sócio epidemiológicas, seja das clínicas e laboratoriais, foi utilizado o teste de regressão logística binária com correção para os fatores estudados, quando necessário. Na análise da diferença de médias dos parâmetros avaliados foram realizados os testes T ou Mann Whitney (comparações pareadas), ANOVA ou Kruskal-Wallis (comparações múltiplas). Os testes de Tukey ou Dunn foram utilizados como *post hoc*. Para amostras de correlação, foram realizados os testes de Pearson ou Spearman, quando apropriado. Em todas as análises, foram utilizadas o Software estatístico SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e os respectivos gráficos foram gerados no GraphPad Prism (versão 7.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p\text{-value} < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1. CARACTERIZAÇÃO SÓCIO EPIDEMIOLÓGICA

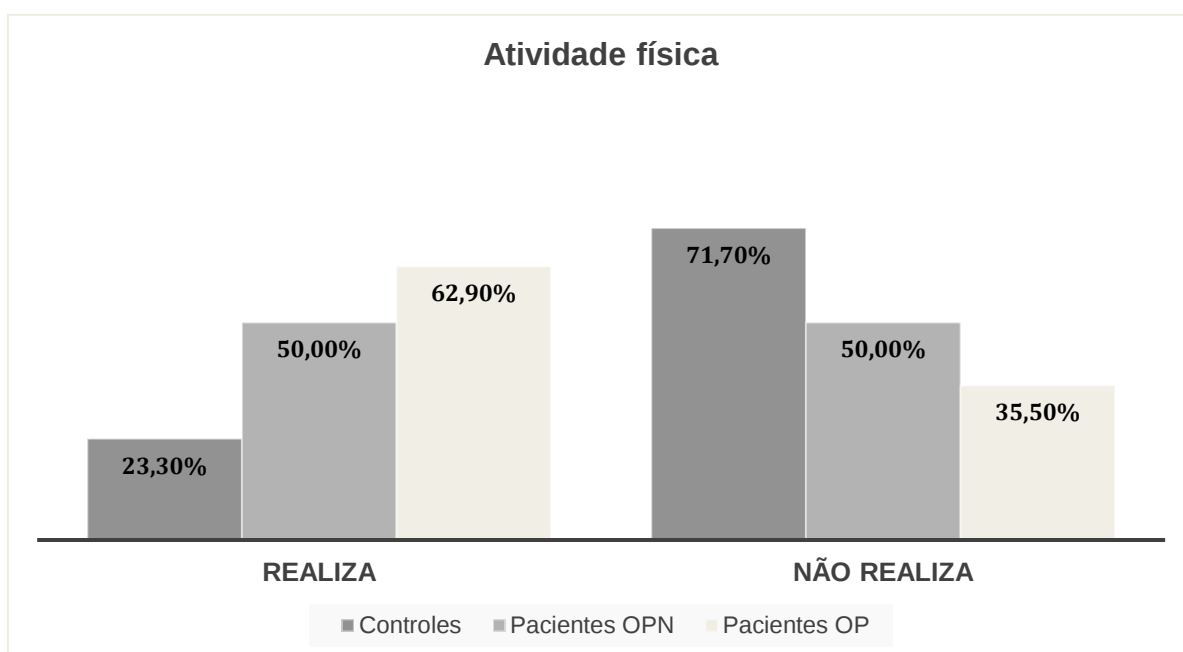
Das 695 mulheres em pós-menopausa estudadas (Grupo Clínico), 120 (17,3%) foram classificadas como subgrupo controle saudável (CT), 44 (6,3%) como osteopênicas (OPN) e 531 (76,4%) como osteoporóticas (OP) de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS (Kanis, et al., 2008).

Os parâmetros de idade, idade de menarca e idade de menopausa das mulheres, no subgrupo controle saudável, foram de (média de anos $\pm$ DP): $61,11 \pm 5,13$; $13,52 \pm 1,81$; e $44,48 \pm 7,49$ respectivamente. Para o subgrupo osteopênico, as idades foram de $62,33 \pm 7,77$; $13,30 \pm 1,86$ e $47,51 \pm 5,94$ respectivamente. E no subgrupo osteoporótico, as pacientes apresentaram as idades de $66,83 \pm 9,80$; $13,62 \pm 2,20$ e $45,26 \pm 0,10$ respectivamente.

No subgrupo controle saudável, 106 (88,3%) mulheres declararam-se como não consumidoras de bebidas alcólicas e 28 (23,3%) como praticantes de atividade física. No subgrupo de mulheres osteopênicas, 42 (95,5%), declararam-se como não consumidoras de bebidas alcólicas e 22 (50%) como praticantes de atividades físicas. Já no subgrupo de mulheres com osteoporose, os números foram de 481 (84,2%) não consumidoras de álcool e 334 (62,9%) praticantes de atividades físicas.

Embora as características analisadas tenham apresentado diferença de frequência entre os subgrupos, apenas o fator realização de atividade física apresentou diferença estatisticamente significativa, com maior frequência no subgrupo de pacientes com baixa DMO - osteopênicos e osteoporóticos ($p=0,02$) (Figura 10). Todos os resultados da caracterização sócio epidemiológica do Grupo Clínico podem ser visualizados na Tabela 3.

Figura 10 - Realização de atividade física no Grupo Clínico. Comparação entre os subgrupos Controle, OPN e OP quanto à realização de atividades físicas.



Fonte: O Autor, 2017.

Tabela 3 - Características sócio epidemiológicas do Grupo Clínico: idade, idade de menarca, idade de menopausa, consumo de álcool e prática de atividade física.

CARACTERÍSTICAS SÓCIO EPIDEMIOLÓGICAS	CONTROLES N=120			PACIENTES OPN N=44			PACIENTES OP N=531		
	Média (anos) ± DP			Média (anos) ± DP			Média (anos) ± DP		
IDADE	61,11± 5,13			62,33± 7,77			66,83± 9,80		
IDADE DE MENARCA	13,52 ± 1,81			13,30 ± 1,86			13,62 ± 2,20		
IDADE DE MENOPAUSA	44,48 ± 7,49			47,51 ± 5,94			45,26 ± 0,10		
	SIM N(%)	NÃO N(%)	NR N(%)	SIM N(%)	NÃO N(%)	NR N(%)	SIM N(%)	NÃO N(%)	NR N(%)
CONSUMO DE ÁLCOOL (1 und álcool/semana)*	8 (6,7%)	106 (88,3%)	6 (5%)	2 (4,5%)	42 (95,5%)	--	41 (7,2%)	481 (84,2%)	9 (1,6%)
PRÁTICA DE ATIVIDADE FÍSICA	28 (23,3%)	86 (71,7%)	6 (5%)	22 (50%)	22 (50%)	--	334 (62,9%)	188 (35,5%)	9 (1,6%)

OPN: Osteopenia; OP: Osteoporose; DP: Desvio padrão; N: Número total; NR: Não respondeu ao questionário. * Uma unidade de álcool varia pouco entre os diferentes países e está entre 8-10 g de álcool. Isso equivale a um copo padrão de cerveja (285 ml), uma medida de drinque (30 ml), um copo médio de vinho (120 ml) ou uma medida de aperitivo (60 ml) (Kanis, et al., 2011).

Fonte: O Autor, 2017.

Durante a realização das análises laboratoriais das 90 amostras do Grupo Expressão, uma amostra do subgrupo osteopenia e três amostras do subgrupo controle não expressaram, de forma que o Grupo Expressão foi redimensionado para 27 mulheres (31,4%) classificadas como subgrupo controle saudável, 29 (33,7%) como osteopênicas (OPN) e 30 (34,9%) como osteoporóticas (OP) de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (Kanis, et al., 2008). Os

resultados da caracterização sócio epidemiológica do Grupo Expressão podem ser vistos na Tabela 4.

Tabela 4 - Características sócio epidemiológicas do Grupo Expressão: idade, idade de menarca, idade de menopausa, consumo de álcool e prática de atividade física.

CARACTERÍSTICAS SÓCIO EPIDEMIOLÓGICAS	CONTROLES N=27			PACIENTES OPN N=29			PACIENTES OP N=30		
	Média (anos) ± DP			Média (anos) ± DP			Média (anos) ± DP		
IDADE	61,48 ± 7,09			63,21 ± 7,34			69,80 ± 8,26		
IDADE DE MENARCA	13,22 ± 1,91			13,41 ± 1,52			13,80 ± 2,04		
IDADE DE MENOPAUSA	51,63 ± 1,88			50,79 ± 2,78			50,57 ± 2,03		
	SIM N(%)	NÃO N(%)	NR N(%)	SIM N(%)	NÃO N(%)	NR N(%)	SIM N(%)	NÃO N(%)	NR N(%)
CONSUMO DE ÁLCOOL (1 und álcool/semana)*	1 (3,7%)	26 (96,3%)	--	2 (6,9%)	27 (93,1%)	--	0	29 (96,7%)	1 (3,3%)
PRÁTICA DE ATIVIDADE FÍSICA	8 (29,6%)	18 (66,7%)	1 (3,7%)	12 (41,4%)	17 (58,6%)	--	12 (40%)	18 (60%)	--

OPN: Osteopenia; OP: Osteoporose; DP: Desvio padrão; N: Número total; NR: Não respondeu ao questionário. * Uma unidade de álcool varia pouco entre os diferentes países e está entre 8-10 g de álcool. Isso equivale a um copo padrão de cerveja (285 ml), uma medida de drinque (30 ml), um copo médio de vinho (120 ml) ou uma medida de aperitivo (60 ml) (Kanis, et al., 2011).

Fonte: O Autor, 2017.

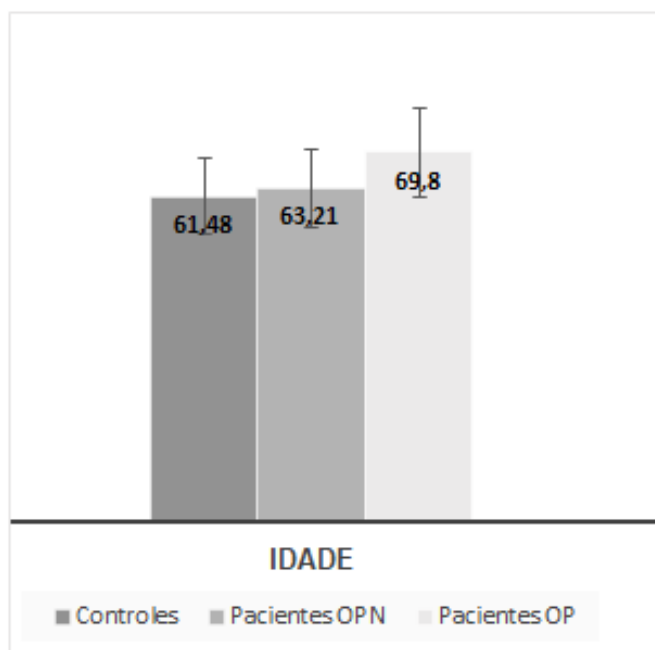
No subgrupo controle saudável, a idade, idade de menarca e idade de menopausa das mulheres foi de (média em anos ± DP): 61,48 ± 7,09; 13,22 ± 1,91 e 51,63 ± 1,88 respectivamente. Da mesma forma, para o subgrupo osteopênico, as idades foram de 63,21 ± 7,34; 13,41 ± 1,52 e 50,79 ± 2,78 respectivamente. E no

subgrupo osteoporótico, as pacientes apresentaram as idades de $69,80 \pm 8,26$; $13,80 \pm 2,04$ e $50,57 \pm 2,03$ respectivamente.

Dentro do subgrupo controle saudável, 26 mulheres (96,3%) declararam-se como não consumidoras de bebidas alcóolicas e 8 (29,6%) como praticantes de atividade física. No subgrupo de mulheres osteopênicas, 27 (93,1%) declararam-se como não consumidoras de bebidas alcóolicas e 12 (41,4%) como praticantes de atividades físicas. Já no subgrupo de mulheres com osteoporose, os números foram de 29 mulheres (96,7%) não consumidoras de álcool e 12 mulheres (40%) praticantes de atividades físicas.

Embora as características analisadas tenham apresentado diferença de frequência entre os subgrupos, apenas o fator idade demonstrou valores estatisticamente significativos. O subgrupo OP apresentou a maior faixa etária quando comparado com o subgrupo controle ($p = 6 \times 10^{-4}$) e OPN ($p = 0,02$) (Figura 11).

Figura 11 - Média de idade do Grupo Expressão. Comparação entre as idades médias dos subgrupos Controle, OPN e OP.



Fonte: O Autor, 2017.

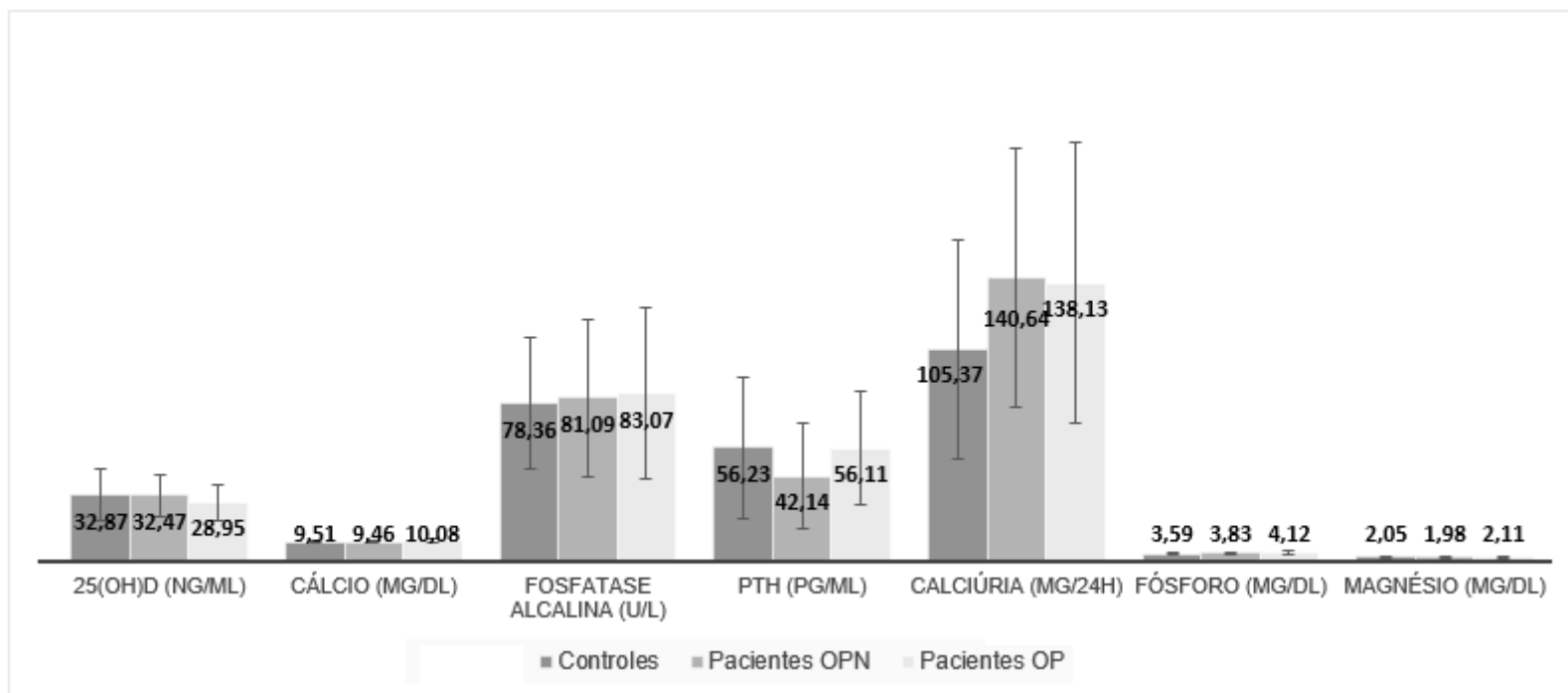
6.2 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA / LABORATORIAL

Dos 3 subgrupos estudados no Grupo Clínico, o subgrupo OPN foi o que apresentou maior taxa de comorbidades (88,1%), presença de tabagismo (40,9%) e presença de hereditariedade para osteoporose (34,1%). Para o consumo de outros medicamentos, exceto os referentes aos de metabolismo ósseo, o subgrupo controle foi o que apresentou maior frequência (61,7%), bem como demonstrou maior frequência de indivíduos não fumantes (87,5%). Os subgrupos OPN e controle também apresentaram os maiores valores de peso (média $\pm$ DP: 60,98 $\pm$ 11,46 e 60,73 $\pm$ 11,34 respectivamente) e de IMC (média $\pm$ DP: 26,42 $\pm$ 5,03 e 26,26 $\pm$ 4,32 respectivamente).

Na verificação dos parâmetros bioquímicos, o subgrupo OP apresentou os valores mais baixos de 25(OH)D (28,95 ng/mL $\pm$ 9,06) e de cálcio (10,08 mg/dL $\pm$ 7,18) e os maiores valores de calciúria (138,13 mg/24h $\pm$ 99,94). O subgrupo controle saudável demonstrou os menores valores para fósforo (3,85 $\pm$ 2,50) e magnésio (2,05 mg/dL $\pm$ 0,42) e registrou maiores valores de PTH (56,11 pg/mL; $\pm$ 27,90), enquanto que o subgrupo OPN exibiu os menores valores para fosfatase alcalina (81,09 U/L $\pm$ 39,24), sendo inclusive inferiores aos do subgrupo OP (83,07 U/L $\pm$ 42,33).

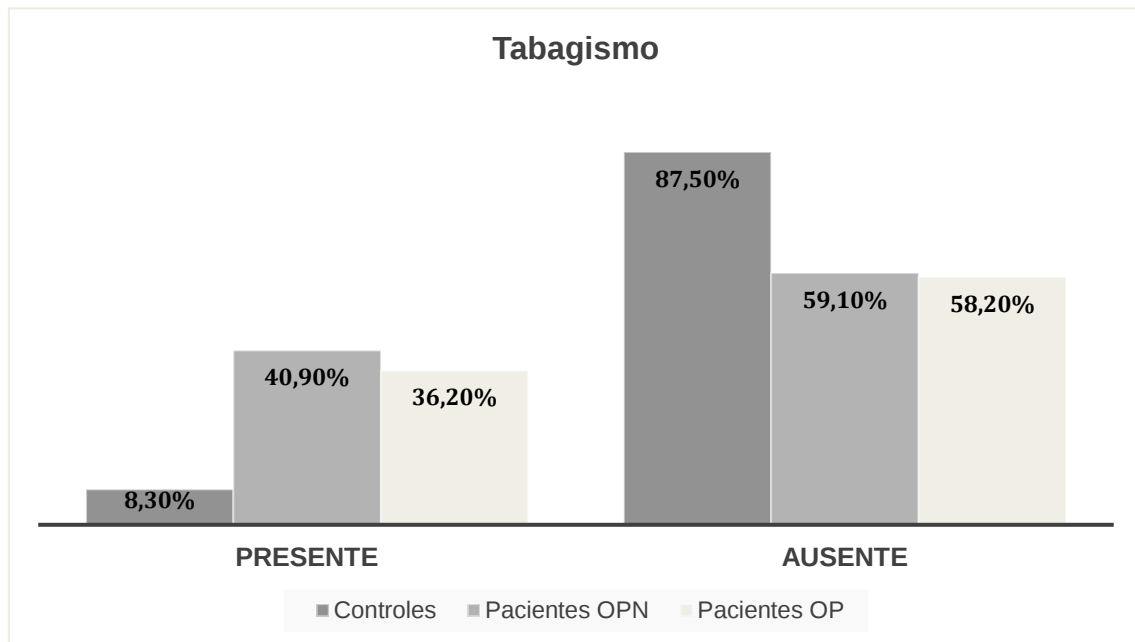
A despeito das diferenças encontradas em relação às características clínicas e laboratoriais entre os subgrupos estudados, apenas os parâmetros 25(OH)D (entre os controles e OP, $p = 0,05$); PTH (entre os subgrupos controle e OPN, $p = 0,013$) foram estatisticamente significativos (Figura 12). Além disso, os fumantes apresentaram 8,455 mais chances de desenvolverem baixa DMO ($p=0,001$) (Figura 13). Todos os resultados da caracterização clínica e laboratorial do Grupo Clínico podem ser visualizados na Tabela 5.

Figura 12 - Avaliação de parâmetros laboratoriais do Grupo Clínico. Comparação entre os valores médios de 25(OH)D, cálcio, fosfatase alcalina, PTH, calciúria, fósforo e magnésio entre os subgrupos Controle, OPN e OP.



Fonte: O Autor, 2017.

Figura 13 - Avaliação de tabagismo no Grupo Clínico. Avaliação quanto a presença de tabagismo entre os indivíduos dos subgrupos Controle, OPN e OP.



Fonte: O Autor, 2017.

Tabela 5 - Características clínicas/laboratoriais do Grupo Clínico: peso, IMC, parâmetros laboratoriais, comorbidades, tabagismo, uso de outros medicamentos não associados ao metabolismo ósseo e hereditariedade.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS/LABORATORIAS	CONTROLES N=120			PACIENTES OPN N=44			PACIENTES OP N=531		
	Média ± DP			Média ± DP			Média ± DP		
Peso	60,73 ± 11,34			60,98 ± 11,46			61,29 ± 12,03		
IMC	26,26 ± 4,32			26,42 ± 5,03			25,89 ± 4,76		
25-hidroxivitamina D₃ (ng/dL)	32,87 ± 13,15			32,47 ± 10,81			28,95 ± 9,06		
Cálcio (mg/dL)	9,50 ± 0,81			9,46 ± 0,58			10,08 ± 0,7		
Fosfatase alcalina (U/L)	78,36 ± 32,72			81,09 ± 39,24			83,07 ± 42,33		
PTH (pg/mL)	56,23 ± 35,01			42,14 ± 26,18			56,11 ± 27,90		
Calciúria (mg/24H)	105,37 ± 54,44			140,00 ± 64,61			138,13 ± 69,94		
Fósforo (mg/dL)	3,59 ± 0,54			3,83 ± 0,62			4,12 ± 0,99		
Magnésio (mg/dL)	2,05 ± 0,42			1,98 ± 0,29			2,11 ± 0,24		
	SIM N (%)	NÃO N (%)	NR N (%)	SIM N (%)	NÃO N (%)	NR N (%)	SIM N (%)	NÃO N (%)	NR N (%)
COMORBIDADES	102 (85%)	11 (9,2%)	7 (5,8%)	34 (88,1%)	10 (11,9%)	--	391 (73,6%)	101 (19%)	39 (7,4%)
TABAGISMO	10 (8,3%)	105 (87,5%)	5 (4,2%)	18 (40,9%)	26 (59,1%)	--	192 (36,2%)	309 (58,2%)	30 (5,6%)
OUTROS MEDICAMENTOS	74 (61,7%)	46 (38,3%)	--	27 (61,4%)	17 (38,6%)	--	290 (54,6%)	204 (38,4%)	37 (7%)
HEREDITARIEDADE	34 (28,3%)	46 (38,3%)	40 (33,4%)	15 (34,1%)	29 (65,9%)	--	158 (29,8%)	226 (42,6%)	147 (27,6%)

OPN: Osteopenia; OP: Osteoporose; DP: Desvio padrão; N: Número total; NR: Não respondeu ao questionário

Fonte: O Autor, 2017.

Para o Grupo Expressão, dos 3 subgrupos estudados, o subgrupo controle registrou a maior taxa de comorbidades (88,9%) e de consumo de outros medicamentos, exceto os referentes ao metabolismo ósseo (100%); e maior frequência de indivíduos não fumantes (96,3%). O subgrupo OPN apresentou maior presença de hereditariedade para osteoporose (31%). A frequência de tabagismo foi semelhante entre os subgrupos OP e OPN (30% e 31% respectivamente). Os subgrupos controle e OPN também apresentaram os maiores valores de IMC (média $\pm$ DP: $27,68 \pm 3,40$ e $26,42 \pm 5,28$ respectivamente). Por outro lado, o subgrupo OPN apresentou o menor peso (média $\pm$ DP) ($62,08 \pm 11,77$).

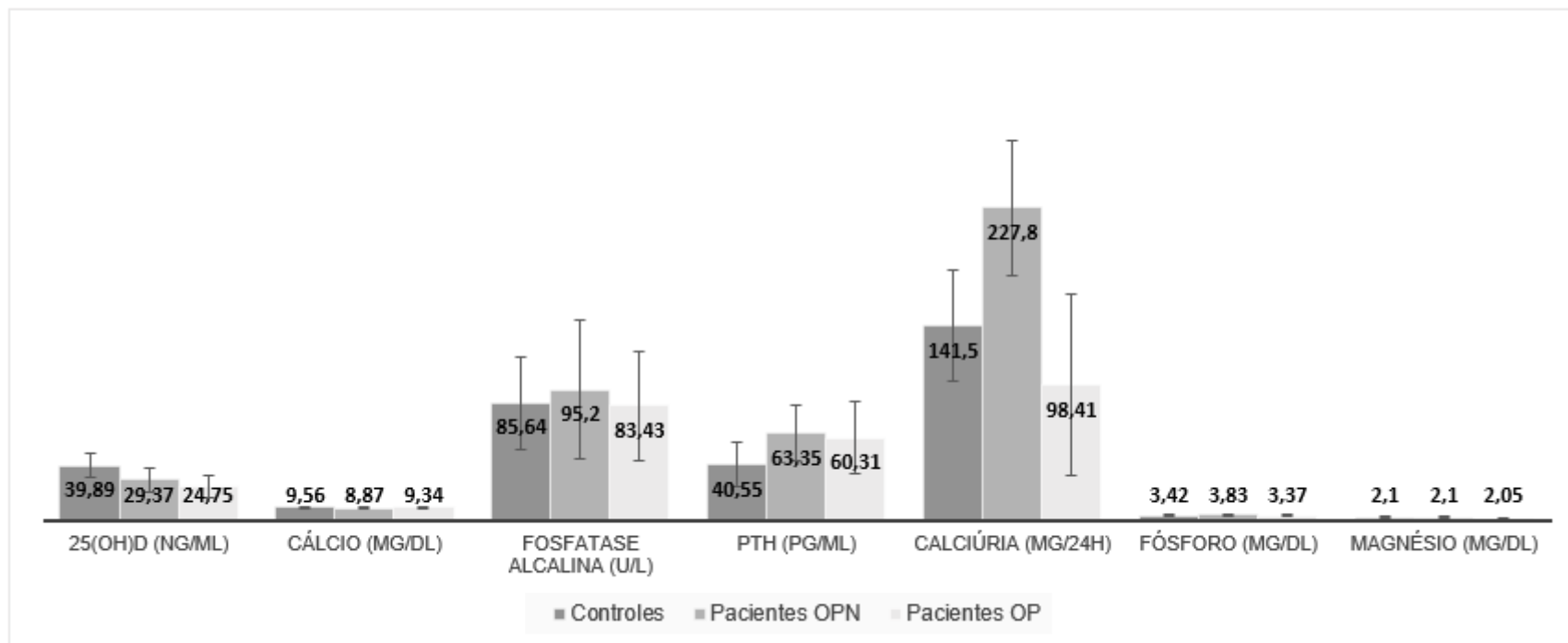
Na verificação dos parâmetros bioquímicos, o subgrupo OP apresentou os valores mais baixos de 25(OH)D ($26,65 \text{ ng/mL}$; $\pm 7,63$), fosfatase alcalina ($92,88 \text{ U/L}$ $\pm 60,53$), fósforo ($3,37 \text{ mg/dL}$ $\pm 0,56$) e magnésio ($2,05 \text{ mg/dL}$ $\pm 0,26$), enquanto OPN exibiu os menores valores para cálcio ($8,87 \text{ mg/dL}$ $\pm 0,66$), maiores valores de PTH ($63,35 \text{ pg/mL}$ $\pm 20,25$) e calciúria ($227,8 \text{ mg/24h}$ $\pm 49,24$).

Embora as características analisadas tenham apresentado diferença de frequência entre os subgrupos, apenas os parâmetros níveis de 25(OH)D, PTH e calciúria demonstraram valores estatisticamente significativos (Figura 14).

O subgrupo controle (CT) apresentou os maiores níveis de 25(OH)D quando comparado aos subgrupos de baixa massa óssea (CT X OP, $p = 10^{-4}$; CT X OPN, $p = 3 \times 10^{-4}$).

Para os níveis de PTH e calciúria, o subgrupo OPN exibiu os maiores valores quando comparados com o subgrupo CT ($p = 0.036$) e com o subgrupo OP ($p = 0.044$) respectivamente. Todos os resultados da caracterização clínica e laboratorial do Grupo Expressão podem ser visualizados na Tabela 6.

Figura 14 - Avaliação de parâmetros laboratoriais do Grupo Expressão. Comparação entre os valores médios de 25(OH)D, cálcio, fosfatase alcalina, PTH, calciúria, fósforo e magnésio entre os subgrupos Controle, OPN e OP.



Fonte: O Autor, 2017.

Tabela 6 - Características clínicas/laboratoriais do Grupo Expressão: peso, IMC, parâmetros laboratoriais, comorbidades, tabagismo, uso de outros medicamentos não associados ao metabolismo ósseo e hereditariedade.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS/LABORATORIAS	CONTROLES N=27			PACIENTES OPN N=29			PACIENTES OP N=30		
	Média ± DP			Média ± DP			Média ± DP		
Peso	66,40 ± 11,53			62,08 ± 11,77			64,88 ± 10,09		
IMC	27,68 ± 3,40			26,42 ± 5,28			24,30 ± 6,54		
25-hidroxivitamina D₃ (ng/dL)	39,89 ± 9,97			29,37 ± 9,31			24,75 ± 7,62		
Cálcio (mg/dL)	9,56 ± 0,61			8,87 ± 0,66			9,34 ± 0,70		
Fosfatase alcalina (U/L)	85,64 ± 34,02			95,20 ± 50,47			83,43 ± 39,93		
PTH (pg/mL)	40,55 ± 16,55			63,35 ± 20,25			60,31 ± 26,16		
Calciúria (mg/24H)	141,5 ± 40,56			227,8 ± 49,24			98,41 ± 66,35		
Fósforo (mg/dL)	3,42 ± 0,50			3,83 ± 0,62			3,37 ± 0,56		
Magnésio (mg/dL)	2,10 ± 0,53			2,10 ± 0,3			2,05 ± 0,26		
	SIM	NÃO	NR	SIM	NÃO	NR	SIM	NÃO	NR
COMORBIDADES	24 (88,9%)	3 (11,1 %)	--	18 (62,1%)	11 (37,9%)	--	24 (80%)	6 (20%)	--
TABAGISMO	1 (3,7%)	26 (96,3%)	--	9 (31%)	20 (69%)	--	9 (30%)	21 (70%)	--
OUTROS MEDICAMENTOS	27(100%)	--	--	19 (65,5%)	10 (34,5%)	--	20 (66,7%)	10 (33,3%)	--
HEREDITARIEDADE	7 (25,9%)	20(74,1%)	--	9 (31%)	20(69%)	--	6 (20%)	12 (40%)	12 (40%)

OPN: Osteopenia; OP: Osteoporose; DP: Desvio padrão; N: Número total; NR: Não respondeu ao questionário

Fonte: O Autor, 2017.

Em relação ao FRAX, uma vez que não o utilizamos em pacientes diagnosticados e em tratamento para a osteoporose, os valores encontrados para os indivíduos osteopênicos do Grupo Expressão podem ser visualizados nas Figuras 15

e 16. Um indivíduo osteopênicos com $\text{FRAX} \geq 3\%$ para fratura de quadril iniciou tratamento com bisfosfonatos

Figura 15 - Valores do FRAX para fratura maior em indivíduos osteopênicos do Grupo Expressão. Considera-se para tratamento valores de $\text{FRAX} \geq 20\%$ (KANIS, 2008).



Fonte: O Autor, 2017.

Figura 16 - Valores do FRAX para fratura de quadril em indivíduos osteopênicos do Grupo Expressão. Considera-se para tratamento valores de $\text{FRAX} \geq 3\%$ (KANIS, 2008).



6.3

Fonte: O Autor, 2017.

6.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

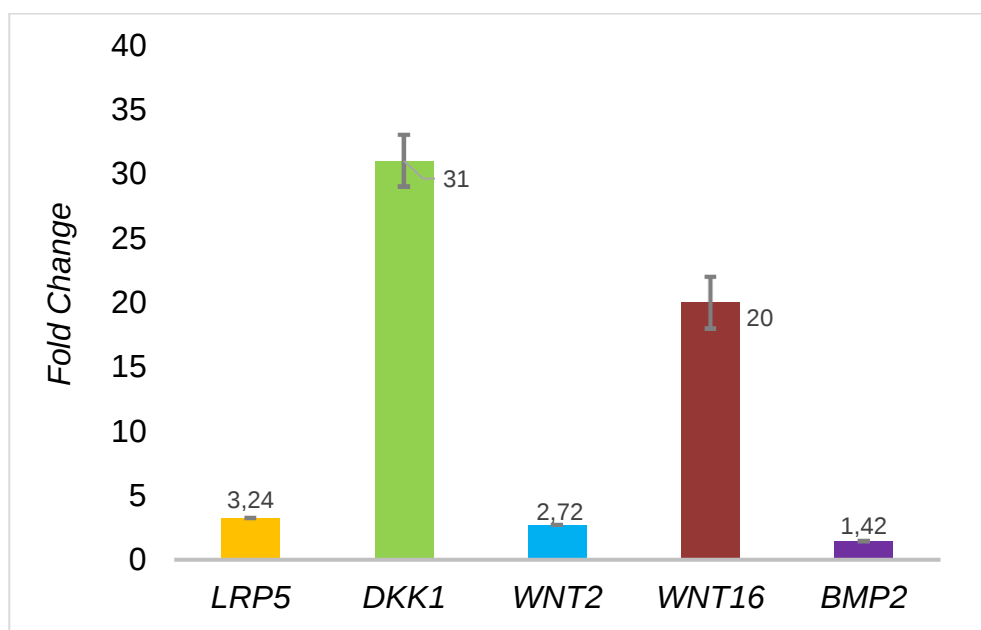
Entre os genes da via Wnt estudados, todos encontraram-se mais expressos nos subgrupos OPN e OP em relação ao subgrupo controle (Figuras 17 e 18). Apenas o gene *SOST* não apresentou níveis de expressão detectáveis em nenhuma das amostras analisadas.

Quando comparada a expressão gênica entre indivíduos osteopênicos e controles, observou-se que os genes *LRP5*, *DKK1*, *WNT2*, *WNT16* e *BMP2* foram mais expressos nos pacientes osteopênicos que nos controles, com destaque para os valores de *Fold Change* (FC) dos genes *DKK* (FC = 31) e *WNT16* (FC = 20) (Figura 17).

Quando comparada a expressão gênica entre pacientes osteoporóticos e controles, também se observou que os genes *LRP5*, *DKK1*, *WNT2*, *WNT16* e *BMP2* foram mais expressos nos indivíduos osteoporóticos que nos controles, destacando-se os genes *WNT2* (FC = 5,89) e *WNT16* (FC = 90,32) (Figura 18).

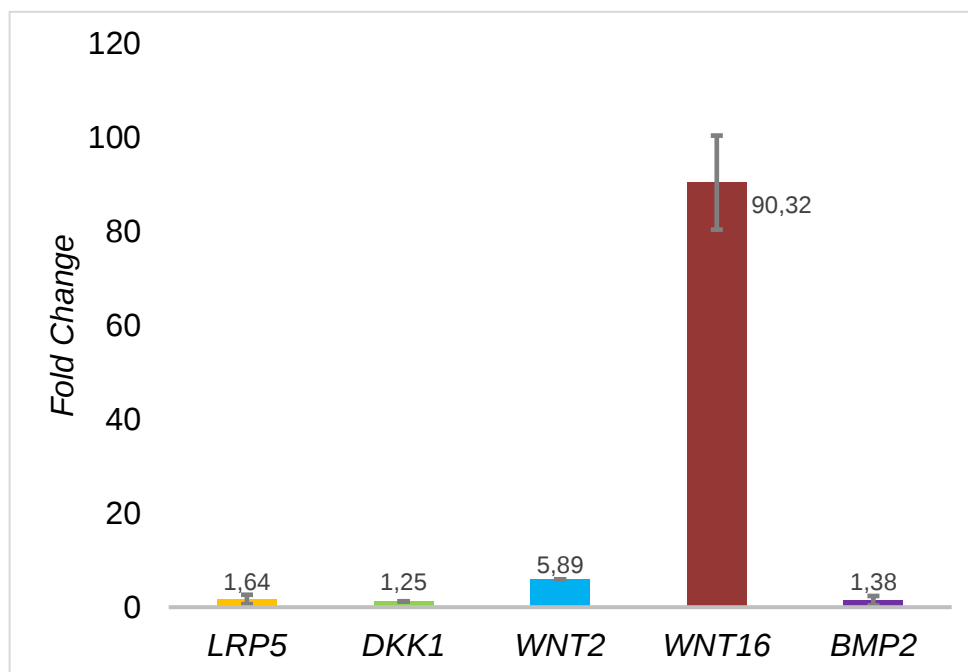
Por outro lado, quando comparada a expressão gênica entre pacientes osteopênicos e osteoporóticos, observou-se que os genes *WNT2* (FC = -2,17) e *WNT16* (FC = -4,54) estavam menos expressos nos indivíduos osteopênicos, enquanto que os genes *DKK1* (FC = 24,98), *LRP5* (FC = 1,98) e *BMP2* (FC = 1,03) estavam mais expressos (Figura 19).

Figura 17 - Expressão gênica dos genes *LRP5*, *DKK1*, *WNT2*, *WNT16* e *BMP2* no subgrupo de mulheres osteopênicas em relação ao subgrupo controle saudável. Destacando os genes *DKK* (FC= 31), *WNT2* (FC = 2,72) e *WNT16* (FC = 20).



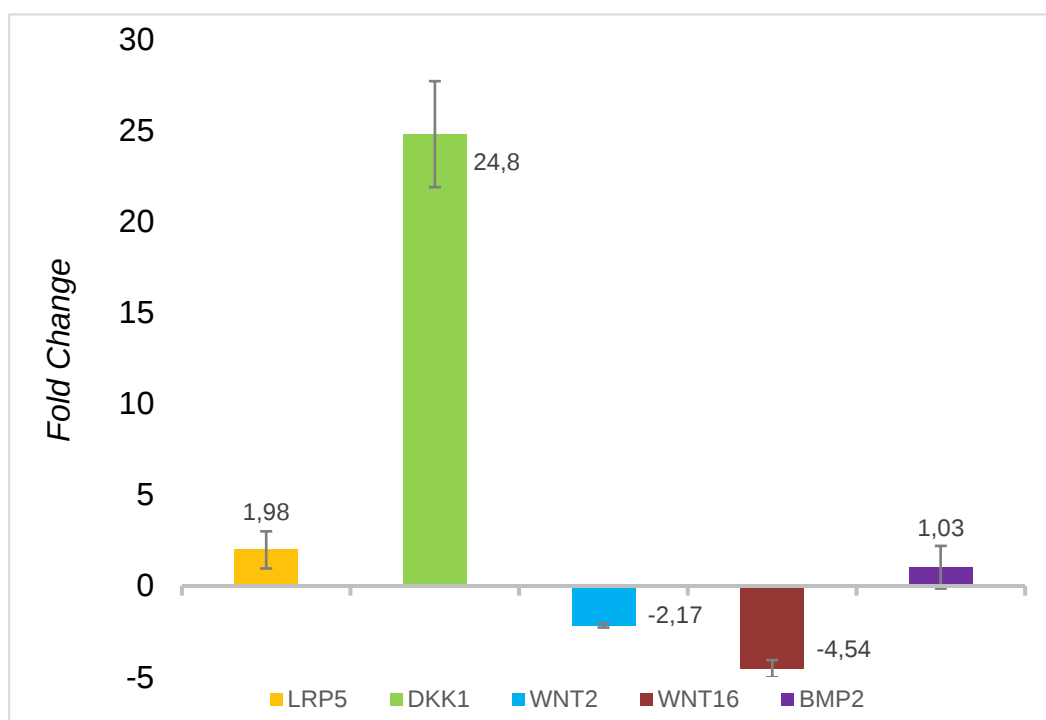
Fonte: O Autor, 2017.

Figura 18 - Expressão gênica dos genes *LRP5*, *DKK1*, *WNT2*, *WNT16* e *BMP2* no subgrupo de mulheres osteoporóticas em relação ao subgrupo controle saudável. Destacando os genes *DKK* (FC= 1,25), *WNT2* (FC = 5,89) e *WNT16* (FC = 90,32).



Fonte: O Autor, 2017.

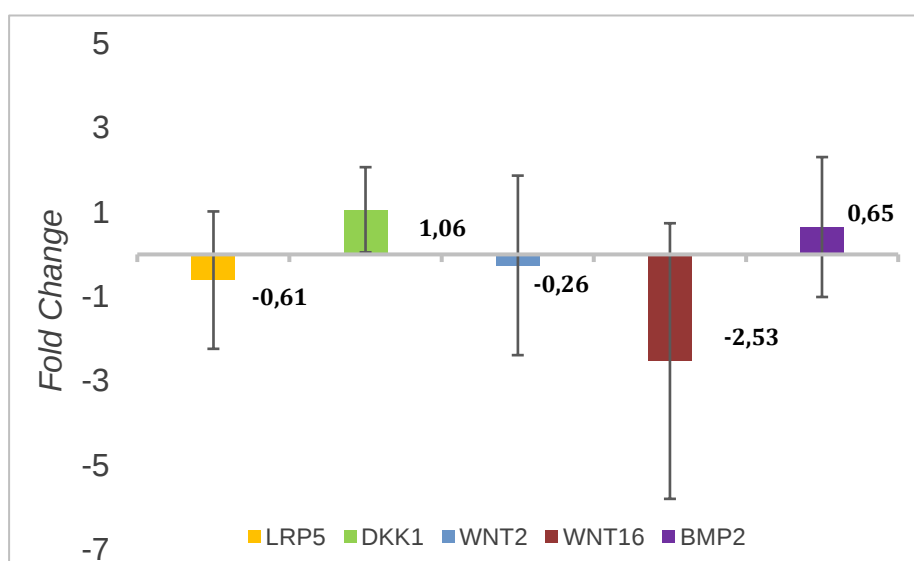
Figura 19 - Expressão gênica dos genes *LRP5*, *DKK1*, *WNT2*, *WNT16* e *BMP2* no subgrupo de mulheres osteopênicas em relação ao subgrupo osteoporótico. Destaque para o gene *DKK1* que apresentou FC = 24,8 mais expresso nos pacientes OPN do que nos pacientes OP. Já os genes *WNT2* e *WNT16* mostraram-se menos expressos nos pacientes OPN do que nos pacientes OP, com FC = -2,17 e -4,54.



Fonte: O Autor, 2017.

Ainda, foi realizada uma comparação entre os pacientes osteoporóticos já fraturados com os que não tinham sofrido nenhuma fratura (não fraturados). Embora possamos observar que os genes *LRP5*, *WNT2* e *WNT16* estavam reprimidos e os genes *DKK1* e *BMP2* estavam induzidos nos pacientes osteoporóticos já fraturados, a análise não apresentou diferença estatisticamente significativa, o que torna os dados não confiáveis (Figura 20).

Figura 20 - Expressão gênica dos genes *LRP5*, *DKK1*, *WNT2*, *WNT16* e *BMP2* entre os indivíduos que sofreram fratura e os não fraturados do subgrupo osteoporótico.



Fonte: O Autor, 2017.

7 DISCUSSÃO

7.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA

As pacientes do Grupo Clínico apresentaram média de idade de menarca de 13,30 anos no subgrupo OPN e de 13,62 anos no subgrupo OP; enquanto que as do Grupo Expressão demonstraram idade média de menarca de 13,41 anos no subgrupo OPN e de 13,8 anos no subgrupo OP. Um estudo de revisão literária mostra que a faixa etária em que ocorre a menarca no Brasil é, em média, dos 11 aos 12 anos (BRÊTAS, et al., 2012). Entretanto, no período de 1960-1970, época de início da puberdade das pacientes do estudo, a idade em que ocorria a menarca era em torno dos 13-14 anos. A idade em que ocorre a menarca vem diminuindo ao longo dos anos devido a alterações ambientais, socioeconômicas, nutricionais e prevalência crescente de sobrepeso e obesidade (CARVALHO, FARIAS, GUERRA-JÚNIOR, 2007).

As idades médias de surgimento da menopausa nas pacientes do Grupo Clínico (47,51 anos nas osteopênicas e 45,26 anos nas osteoporóticas) e nas pacientes do Grupo Expressão (50,79 anos nas osteopênicas e 50,57 anos nas

osteoporóticas) encontram-se no padrão consensual da literatura cuja definição é a ausência de menstruação por 12 meses em mulher com idade acima de 45 anos na ausência de outras causas biológicas, em consequência da falência ovariana fisiológica (GIACOMINI, MELLA, 2006).

Quando avaliada a presença de tabagismo no Grupo Clínico, os fumantes apresentaram maior probabilidade de desenvolverem baixa DMO ($p=0,001$). Resultados corroborados pelas publicações dos últimos anos. O fumo está associado à fragilidade do tecido ósseo, à baixa DMO, retardo na cicatrização de fraturas sendo considerado um importante fator de risco para o desenvolvimento da osteoporose e de fraturas por fragilidade (TRUNTZER, J.; et al., 2015). O RUNX₂ é um importante regulador transcricional na diferenciação das células formadoras de osso, os osteoblastos. A ligação do RUNX₂ a elementos nucleares específicos nos osteoblastos regula os genes que promovem o desenvolvimento do fenótipo característico dessas células e sua capacidade de sintetizar colágeno. Muitas das vias de sinalização e fatores transcricionais que influenciam a osteoblastogênese atuam alterando a produção ou a atividade do RUNX₂. O FOXO₁ representa um desses fatores e atua como um regulador negativo do fator de transcrição óssea RUNX₂ em osteoblastos. Células osteoblásticas tratadas com extrato de nicotina apresentaram aumento dos níveis de FOXO₁ e diminuição da atividade do gene *RUNX2* com consequente inibição da diferenciação de células osteoblásticas (SUNG, et al., 2015). Além disso, a nicotina tem a capacidade de atuar diretamente sobre os precursores de osteoclastos, através do aumento dos níveis de RANKL intensificando a diferenciação osteoclastogênica (COSTA-RODRIGUES, ROCHA, FERNANDES, 2018). Em modelos animais, a exposição à fumaça de cigarro aumentou os níveis séricos de fosfatase alcalina, diminuiu o volume ósseo trabecular e induziu osteopenia em sítio femoral (KO, et al., 2016).

Na avaliação do item prática de atividade física, os resultados foram contraditórios, uma vez que os indivíduos do Grupo Clínico, portadores de baixa DMO, apresentaram risco aumentado para o desenvolvimento de osteoporose. A prática de exercício físico é uma estratégia importante que minimiza a deterioração do sistema músculo esquelético, melhora o desempenho físico, a força e o equilíbrio prevenindo contra quedas e sarcopenia (CHAN, et al., 2017). A atividade física bloqueia a diferenciação adipogênica através da inibição de FOXO₁ com consequente aumento

dos níveis de β catenina. Dessa forma, a prática de exercícios favorece a osteoblastogênese, inibe a apoptose de osteócitos e diminui a perda óssea relacionada à idade (SANTOS, ELLIOTT-SALE, SALE, 2017). Durante a realização de exercícios físicos, o tecido ósseo sofre microdeformidades que desencadeiam uma cascata de sinalização inicializada pelos osteócitos e complementada pelos osteoblastos através da via Wnt / β catenina com a reparação final do dano ósseo (MCMILLAN, et al., 2017). Assim, possivelmente, as pacientes não realizam na prática diária as atividades citadas nos formulários de avaliação, ou não as praticam continuamente.

No Grupo Expressão, o fator idade registrou diferença estatisticamente significativa a favor do subgrupo osteoporótico em relação aos subgrupos osteopênico e controle. Os componentes do osso são mantidos em equilíbrio para resistir à fratura e otimizar o peso do corpo. Com o aumento da idade, ocorrem mudanças do conteúdo mineral que comprometem a rigidez óssea, bem como alterações na estrutura do colágeno que prejudicam a capacidade de absorver a energia das cargas de impacto. Alterações ósseas dependentes da idade foram associadas com aumento na porosidade cortical, alterações nas ligações das proteínas de colágeno e diminuição do conteúdo de colágeno e de proteínas não-colágenas atuantes no processo de mineralização (Boskey; Coleman, 2010). Além disso, há aumento da apoptose dos osteoblastos e osteócitos e aumento de fatores ativadores da osteoclastogênese como o estresse oxidativo. Com o avançar da idade, a quantidade de osso diminui devido a redução do número de precursores celulares de osteoblastos, redução do número de células-tronco a partir das quais esses precursores são derivados, ou ainda redução na vida útil dos osteoblastos. O resultado é uma diminuição da quantidade de osso (DEMONTIERO; VIDAL; DUQUE, 2012).

Dentre as características clínicas dos subgrupos avaliados no estudo, os parâmetros 25-hidroxivitamina D₃ e PTH apresentaram resultados significativamente estatísticos: a 25(OH) D com maior frequência nos controles dos Grupos Clínico e Expressão, e o PTH com maior frequência nos indivíduos de baixa massa óssea no Grupo Expressão. A vitamina D participa da regulação dos níveis plasmáticos de cálcio e fosforo, atuando nos intestinos, nos rins e nos ossos a fim de manter a normocalcemia e a normofosfatemia, permitindo assim, uma adequada mineralização óssea. No intestino, através do VDR, a vitamina D atua regulando a absorção

intestinal de cálcio. Quando há diminuição dos níveis de cálcio no soro, a secreção de PTH é estimulada e ativa a síntese de vitamina D ativa. Tanto o PTH quanto o calcitriol estimulam a reabsorção de cálcio nos ossos, bem como a mobilização renal de cálcio nos túbulos distais, diminuindo sua excreção. Por outro lado, se os níveis séricos de cálcio aumentarem, a secreção de PTH diminui levando a uma diminuição da mobilização da vitamina D e do cálcio. Entretanto, se os níveis séricos de cálcio se tornarem elevados, as células parafoliculares da tireoide secretam a calcitonina, que bloqueia a mobilização de cálcio a partir do osso a fim de manter os níveis de cálcio dentro do intervalo de normalidade. (GIL; PLAZA-DIAZ; MESA, 2018). No osso, o VDR é expresso, principalmente nos osteoblastos e nos osteócitos, com a função de estimular a reabsorção óssea através do RANKL e da osteoprotegerina para promover a osteoclastogênese. E, assim, contribuir para a regulação da homeostase do cálcio. A hipovitaminose D resulta em hipocalcemia, osteomalácia e estimula a secreção de PTH levando a um hiperparatireoidismo secundário o qual representa o principal raciocínio para o uso de vitamina D no tratamento da osteoporose (REID, 2017).

Apesar de termos encontrado frequência estatística significativa no item calciúria para os indivíduos OPN do Grupo Expressão, não podemos considerar como hipercalciúria, uma vez que esta entidade é definida como excreção renal de cálcio igual ou maior que 4mg/Kg/24H (CARVALHO; KULAK; BORBA, 2012). Baseado no peso médio das pacientes do Grupo Expressão temos os seguintes valores limites de calciúria: 259,52 mg/24H para OP; 248,32 mg/24H para OPN e 265,60 mg/24H para CT. O aumento da excreção de cálcio renal nos indivíduos OPN pode estar favorecendo o aumento dos níveis de PTH para manter a normocalcemia (8,87 mg/dL) que se encontra menor quando comparado com os níveis de cálcio dos subgrupos CT= 10,50 mg/dL e OP 9,34 mg/dL.

7.2 EXPRESSÃO DOS GENES DA VIA WNT

Nos últimos anos surgiram novos modelos terapêuticos para o tratamento da osteoporose baseados na inibição seletiva de proteínas regulatórias da via Wnt (TABATABAEI-MALAZY, et al., 2017; LIM, BOLSTER, 2017; TAI, INOUE, 2014). Entretanto, drogas já bem estabelecidas no tratamento da osteoporose, como os

bisfosfonatos, parecem atuar também nesse sistema de sinalização (BELLIDO, PLOTKIN, 2011; SADR-ESHKEVARI, et al., 2014; XU, et al., 2015).

De acordo com os resultados obtidos de expressão gênica, nas pacientes osteoporóticas em uso de alendronato de sódio, as concentrações do gene *DKK1*, de ação inibitória da via Wnt, foram menos expressos que no subgrupo osteopenia, o qual não utilizava essa classe de drogas. Os membros da família DKK inibem a via Wnt de sinalização pela interação com os correceptores LRP5 e LRP6 prejudicando a ativação do sistema e consequentemente comprometendo a atividade dos osteoblastos (CRUCIAT; NIEHRS, 2013).

Na osteoporose induzida por glicocorticoides (Gcs), o aumento na concentração de *DKK1* representa, além do aumento das concentrações da proteína SOST, também inibitória da via Wnt, uma das principais formas de atuação direta dessas drogas sobre os osteoblastos. Em estudo de cultura celular e de avaliação sorológica em humanos o *DKK1* foi um dos genes mais estimulados pelos Gcs (GUAÑABENS; GIFRE; PERIS, 2015). Em outro trabalho, o uso de anticorpo antiDKK suprimiu o efeito dos Gcs sobre os osteoblastos com menor expressão da proteína DKK (FRENKEL; WHITE, 2015).

Entretanto os dados da literatura sobre o bloqueio da expressão de *DKK1* pelos bisfosfonatos são escassos e contraditórios. Estudo realizado por Göbel e colaboradores em 2015 evidenciou que o bloqueio da via do mevalonato utilizando amino-bisfosfonatos (ácido zoledrônico) e estatinas suprimiu *DKK1* significativamente a ponto de não poder mais inibir a diferenciação de osteoblastos mediada pela via Wnt em lesões ósseas induzidas por câncer de mama. Da mesma forma, em outro estudo realizado por Anastasilakis e colaboradores em 2013, a análise de 92 mulheres gregas pós-menopausadas e com baixa massa óssea que utilizaram ácido zoledrônico ou denosumabe, demonstrou que no grupo que utilizou ácido zoledrônico, os níveis de *DKK1* também diminuiram.

Por outro lado, o estudo publicado por Gatti e colaboradores em 2014 analisou o uso de ácido zoledrônico e clodronato (outro antirreabsortivo da classe dos bisfosfonatos) em 74 mulheres com osteoporose pós-menopausadas que participaram simultaneamente de dois ensaios multicêntricos controlados por placebo, evidenciou um aumento dos níveis de *DKK1* naquelas pacientes tratadas com zoledronato.

Não encontramos em nossa revisão literária dados sobre a atuação do alendronato de sódio sobre a expressão de proteínas da via Wnt.

Dessa forma, os resultados demonstram uma menor expressão do *DKK1* em pacientes osteoporóticas em uso de alendronato de sódio, contribuindo com o entendimento de que essas drogas podem atuar na via Wnt de sinalização e reduzir a expressão de proteínas inibidoras como a *DKK1*, favorecendo a atuação dos osteoblastos.

Outro gene importante da via de sinalização Wnt é o que codifica a expressão da proteína WNT16, a qual está fortemente associada às características específicas do osso cortical (como espessura e porosidade) e à diminuição do risco de fratura (GORI, LERNER, OHLSSON, 2015). O papel da WNT16 na regulação da massa e força do osso cortical foi confirmada em estudos de GWAS, os quais contribuíram para esclarecer a função dessa proteína na homeostase óssea, como também forneceram novos conhecimentos sobre a biologia deste ligante e sua atuação na regulação da homeostase de osso cortical. (MEDINA-GOMEZ, et al., 2012; ZHENG, et al., 2012). Apesar da sua atuação nesse tipo ósseo, a supressão do gene *WNT16* em estudo em ratos não comprometeu a massa óssea trabecular, sugerindo que o WNT16 é um forte determinante da massa óssea cortical, mas não é necessário à homeostase trabecular; provavelmente devido ao fato de que outras WNTs podem compensar a falta dele, sugerindo que a regulação óssea trabecular e cortical são diferentes. Estudo em ratos com deficiência de WNT16 demonstrou o surgimento de fraturas espontâneas como resultado da baixa espessura e alta porosidade cortical, sem alteração do volume ósseo trabecular (MOVÉRARE-SKRTIC, et al., 2014). Porém, em outro trabalho com ratos transgênicos que hiperexpressaram a WNT 16, o volume ósseo trabecular estava aumentado. (ALAM, et al., 2016). Dessa forma, poder-se-ia justificar a atuação diferente de drogas antiosteoporóticas sobre os ossos corticais e trabeculares, e consequentemente, na prevenção de risco de fraturas vertebrais e não vertebrais (Caires, et al., 2017). As medicações antiosteoporóticas apresentam ações diferentes sobre esses tipos ósseos. O ibandronato de sódio e a teriparatida possuem indicação apenas para prevenção de fratura vertebral (sítio rico em osso trabecular). Por outro lado, o alendronato, o risedronato de sódio e o ácido zoledrônico apresentam indicação para prevenção de fraturas tanto vertebrais como não-vertebrais, inclusive

as de quadril (rico em osso cortical) (KANIS, et al., 2013; MCCLUNG, et al., 2013; CAIRES, et al., 2017).

Nos resultados, encontrou-se aumento da expressão do gene *WNT16* em indivíduos osteoporóticos em uso de alendronato de sódio em relação aos indivíduos osteopênicos quando comparados com os controles saudáveis (FC= 90,32 e 20 respectivamente).

Possivelmente essa ação diferenciada no modo de atuação desses medicamentos frente aos ossos trabecular e cortical está relacionada com a atuação dessas drogas na expressão de proteínas *WNT16*. Assim, os achados sugerem que o uso de bisfosfonatos, no caso alendronato de sódio, aumente a expressão do gene *WNT16*, fato esse que corrobora a ação desse tipo de droga em sítio ósseo cortical e na prevenção de fraturas de quadril.

A proteína *WNT2* ativa a sinalização da via Wnt, aumenta a regulação dos genes alvo de β catenina e participa de papéis importantes na autorrenovação e diferenciação de células-tronco mesenquimais em células miocárdicas, ou mesmo no desenvolvimento de órgãos como os pulmões; além de atuar na inibição da adipocitogênese (SHEN, GLOWACKI, ZHOU, 2011; ONIZUKA, et al., 2012; HRYCAJ, et al., 2015).

Os resultados demonstraram aumento da expressão do gene *WNT2* em pacientes osteoporóticos em uso de alendronato de sódio em relação aos osteopênicos quando ambos foram comparados com controles saudáveis (FC= 5,89 e 2,72 respectivamente). Possivelmente, a medicação favorece a expressão de proteínas da via Wnt, como a *WNT2*, contribuindo ainda mais para a homeostase mineral óssea através da inibição da adipocitogênese e favorecimento da osteoblastogênese a partir de células-tronco mesenquimais.

Por outro lado, o uso de alendronato sódio parece interferir na expressão dos genes *LRP5* e do *BMP2*, uma vez que está diminuída a expressão nos pacientes osteoporóticos em relação aos osteopênicos 1,98 e 1,03 vezes respectivamente.

O correceptor *LRP5* juntamente com o correceptor *LRP6* e receptor Frizzled são responsáveis pela ativação da via Wnt e conduzem à estabilização da β catenina citoplasmática (KRAMER, HALLEUX, KELLER, 2010). Já a proteína morfogênica óssea 2 (*BMP2*) é um fator de crescimento que direciona a diferenciação dos osteoblastos e a formação óssea. A sinalização de *BMP2* induz células precursoras

mesenquimatosas a se diferenciarem em osteoblastos maduros através da regulação de sinais que estimulam a expressão de genes específicos necessários à formação óssea. Há uma interação entre a ação da BMP2 e o sistema de sinalização Wnt, uma vez que essa proteína regula a expressão de fatores transcricionais comuns aos da β catenina, favorecendo a expressão de genes alvo relacionados com o desenvolvimento e ação dos osteoblastos (ZHANG; et al., 2013).

Dessa forma, podemos inferir que medicações de uso já bem estabelecido dentro da terapêutica médica para o tratamento da osteoporose, como o alendronato de sódio, pode exercer uma ação anabólica nos osteoblastos através do aumento da expressão dos genes que codificam proteínas ativadoras da via Wnt, como a WNT2 e WNT16; ou ainda, através da diminuição da expressão de genes de proteínas inibidoras dessa via, como a DKK1, favorecendo assim a osteoblastogênese e consequentemente impedindo a perda de massa óssea.

8 CONCLUSÕES

- No Grupo Clínico, não foi observada associação estatisticamente significativa entre baixa DMO e parâmetros sócio epidemiológicos (como idade, idade de menarca, idade de menopausa, comorbidades, consumo de álcool, peso, IMC, uso de medicações e diagnóstico de osteoporose em parentes de primeiro grau) nos indivíduos pesquisados. Por outro lado, foi observada diferença estatisticamente significativa, com maior frequência no subgrupo de pacientes com baixa DMO (OP e OPN) em relação aos controles para os parâmetros atividade física e tabagismo.

- No Grupo Expressão, não foi observada associação estatisticamente significativa entre baixa DMO e parâmetros sócio epidemiológicos (como idade de menarca, idade de menopausa, tabagismo, comorbidades, consumo de álcool, prática de exercícios físicos, peso, IMC, uso de medicações, diagnóstico de osteoporose em parentes de primeiro grau) nos indivíduos pesquisados. Por outro lado, foi observada diferença estatisticamente significativa, com maior frequência no subgrupo de pacientes com osteoporose em relação aos outros subgrupos no parâmetro idade.

- No Grupo Clínico, não foi observada associação estatisticamente significativa entre os parâmetros de cálcio, fósforo, magnésio, fosfatase alcalina, calciúria nos indivíduos analisados e baixa DMO. Por outro lado, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros 25-hidroxivitamina D₃ com maior frequência nos controles em relação ao subgrupo OP; e PTH com maior frequência nos controles em relação ao subgrupo OPN.

- No Grupo Expressão, não foi observada associação estatisticamente significativa entre os parâmetros cálcio, fósforo, magnésio, fosfatase alcalina nos indivíduos analisados e baixa DMO. Por outro lado, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros 25-hidroxivitamina D₃ com maior frequência nos controles em relação aos portadores de baixa massa óssea; PTH com maior frequência no subgrupo OPN em relação aos controles; e, calciúria com maior frequência no subgrupo OPN em relação ao subgrupo OP.

- Na análise de expressão, observamos um aumento da expressão dos genes *LRP5*, *DKK1*, *WNT2*, *WNT16* e *BMP2* nos subgrupos OP e OPN, quando estes foram comparados ao subgrupo controle. Além disso, o gene *DKK1* apresentou maior nível de expressão no subgrupo OPN em relação ao subgrupo controle; e, os genes *WNT2* e *WNT16* apresentaram maiores níveis de expressão no subgrupo OP quando comparado ao subgrupo controle.
- Na análise da expressão gênica entre pacientes osteopênicos e osteoporóticos, observou-se que os genes *WNT2* e *WNT16* estavam menos expressos nos indivíduos osteopênicos, enquanto que os genes *DKK1*, *LRP5* e *BMP2* estavam mais expressos nesses mesmos indivíduos.
- Na análise de expressão entre os pacientes osteoporóticos já fraturados com os não fraturados observamos que os genes *LRP5*, *WNT2* e *WNT16* estavam reprimidos e os genes *DKK1* e *BMP2* estavam induzidos nos pacientes fraturados. Entretanto essa análise não apresentou diferença estatisticamente significativa.
- A terapêutica com bisfosfonatos, no caso alendronato de sódio, para o tratamento da osteoporose pode exercer uma ação anabólica nos osteoblastos modulando a expressão de genes envolvidos na ativação ou inibição da via Wnt, como *WNT2*, *WNT16* e *DKK1*.

Referências

Ahmed, S.F.; Fouda, N.; Abbas, A.A. Serum Dickkopf-1 level in postmenopausal females: correlation with bone mineral density and serum biochemical markers. **J Osteoporos**, v.2013, p.1-7, 2013.

Alam, I.; et al. Osteoblast-specific overexpression of human WNT16 increases both cortical and trabecular bone mass and structure in mice. **Endocrinology**, v.157, n.2, p.722-736, 2016.

Anastasilakis, A.D.; et al. Comparative effect of zoledronic acid versus denosumab on serum sclerostin and Dickkopf-1 levels of naive postmenopausal women with low bone mass: a randomized, head-to-head clinical trial. **J Clin Endocrinol Metab**, v.98, n.8, p 3206-3212, 2013.

Anderson, H. C. Matrix vesicles and calcification. **Curr Rheumatol Rep**, v.5, n.3, p.222-226, 2003.

Andrade, S.A.F. Osteoporose: um problema de saúde pública. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, v.12, n.28, 2015.

Arai, F.; Miyamoto, T.; Ohneda, O. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-fms and receptor activator of nuclear factor kb (rank) receptors. **J Exp Med**, v.190, n.12, p.1741-1754, 1999.

Association Suisse contre l'Ostéoporose. **Recommandations de l'ASCO1 pour la prise en charge des patients avec osteoporose: REVUE MÉDICALE SUISSE, 2010**. Disponível em: <<https://www.revmed.ch/RMS/2013/RMS-390/Recommandations-de-l-ASCO1-pour-la-prise-en-charge-des-patients-avec-osteoporose>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

Augustine, M.; Horwitz, M.J. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein analogs as therapies for osteoporosis. **Curr Osteoporos Rep**, v.11, n.4, p.1-11, 2013.

Badurski, J.E.; et al. The application of FRAX® to determine intervention thresholds in osteoporosis treatment in Poland. **Pol Arch Med Wewn**, v.121, n.5, p.148-155, 2011.

Bellido, T.; Plotkin, L. Novel actions of bisphosphonates in bone: Preservation of osteoblast and osteocyte viability. **Bone**, v.49, n.1, p.50-55, 2011.

Bhadada, S.K.; et al. Novel SOST gene mutation in a sclerosteosis patient and her parents. **Bone**, v.52, n.2, p.707-710, 2013.

Bonani, M.; et al. Infections in de novo kidney transplant recipients treated with the RANKL inhibitor denosumab. **Transplantation**, v.101, n.9, p.2139-2145, 2017.

Bonewald, L.F.; Johnson, M.L. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. **Bone**, v.42, n.4, p.606-615, 2008.

Boskey, A.L.; Coleman, R. Aging and Bone. **J Dent Res**, v.12, n.89, p.1333-1348, 2010.

Brêtas, J.R.S.; et al. Significado da menarca segundo adolescentes. **Acta Paul Enferm**, v.25, n.2, p.249-255, 2012.

Butler, J.S.; et al. The role of Dkk1 in bone mass regulation: correlating serum Dkk1 expression with bone mineral density. **J Orthop Res**, v.29, n.3, p.414-418, 2011.

Caires, E.L.P; et al. Tratamento da osteoporose pós-menopáusia: um algoritmo baseado na literatura para uso no sistema público de saúde. **Rev Bras Reumatol**, v.57, n.3, p.254-263, 2017.

Cao, X.; Chen, D. The BMP signalling and in vivo bone formation. **Gene**, v.357, n.1, p.1-8, 2005.

Carvalho, M.; Kulak, C.A.M.; Borba, V.Z.C. Prevalência de hipercalcúria em mulheres na pós-menopausa com osteoporose. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.56, n.1, p.1-5, 2012.

Carvalho, W.R.G.; Farias, E.S.; Guerra-Júnior, G. A idade da menarca está diminuindo? **Rev Paul Pediatria**, v.25, n.1, p.76-81, 2007.

Castro da Rocha, F.A.; Ribeiro, A.R. Low incidence of hip fractures in an equatorial area. **Osteoporos Int**, v.14, n.6, p.496-499, 2003.

Chan, D.C.; et al. Effects of exercise improves muscle strength and fat mass in patients with high fracture risk: A randomized control trial. **J Formos Med Assoc**, v.17, p.1-11, 2017.

Chapurlat, R.D. Odanacatib: a review of its potential in the management of osteoporosis in postmenopausal women. **Ther Adv Musculoskelet Dis**, v.7, n.3, p.103-109, 2015.

Compston, J.; et al. Guideline for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women and men from the age of 50 years in the UK. **Maturitas**, v.62, n.2, p.105-108, 2009.

Consolaro, A. The use of bisphosphonates does not contraindicate orthodontic and other types of treatment! **Dental Press J Orthod**, v.19, n.4, p.18-26, 2014.

Cosman, F.; et al. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. **Osteoporos Int**, v.25, n.10, p.2359-2381, 2014.

Costa-Rodrigues, J.; Rocha, I.; Fernandes, M.H. Complex osteoclastogenic inductive effects of nicotine over hydroxyapatite. **J Cell Physiol**, v.233, n.2, p.1029-1040, 2018.

Coxon, F.P.; Taylor, A. Vesicular trafficking in osteoclasts. **Semin Cell Dev Biol**, v.19, n.5, p.424-433, 2008.

Crockett, J.C.; et al. Bone remodelling at a glance. **J Cell Sci**, v.124, n.7, p.991-998, 2011.

Crockett, J.C.; et al. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK / RANKL axis. **Osteoporos Int**, v.22, n.1, p.1-20, 2011.

Cruciat, C. M.; Niehrs, C. Secreted and transmembrane Wnt inhibitors and activators. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v.5, n.3, p.1-26, 2013.

Czerwinski, E.; et al. The incidence and risk of hip fracture in Poland. **Osteoporos Int**, v.20, n.8, p.1363-1367, 2009.

Dallas, S.L.; Bonewald, L.F. Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. **Ann N Y Acad Sci**, v.1192, p.437-443, 2010.

Dawson-Hughes, B.; et al. Implications of absolute fracture risk assessment for osteoporosis practice guidelines in the USA. **Osteoporos Int**, v.19, n.4, p.449-458, 2008.

Day, T.F.; et al. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. **Develop Cell**, v.8, n.5, p.739–750, 2005.

Demontiero, O.; Vidal, C.; Duque, C. Aging and bone loss: new insights for the clinician. **Ther Adv Musculoskelet Dis**, v.4, n.2, p.61-76, 2012.

Ellis, A.G.; et al. Bazedoxifene versus oral bisphosphonates for the prevention of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis at higher risk of fracture: a network meta-analysis. **Value Health**, v.17, n.4, p.424-432, 2014.

Ezura, Y.; et al. Association of a single-nucleotide variation (A1330V) in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene (LRP5) with bone mineral density in adult Japanese women. **Bone**, v.40, n.4, p.997–1005, 2007.

Fahiminiya, S.; et al. Mutations in WNT1 are a cause of osteogenesis imperfecta. **J Med Genet**, v.50, n.5, p.345–348, 2013.

Frenkel, B.; White, W.; Tuckermann, J. Glucocorticoids inhibit Wnt Signaling in Osteoblasts. In: Wang, J.C.; Harris, C. **Glucocorticoid Signaling from molecules to mice to man**. 1^a Ed. Nova Iorque: Editora Springer, 2015. p.189-201.

Fujiwara, S.; et al. Development and application of a Japanese model of the WHO fracture risk assessment tool (FRAX). **Osteoporos Int**, v.19, n.4, p.429-435, 2008.

Gatti, D.; et al. Distinct effect of zoledronate and clodronate on circulating levels of DKK1 and sclerostin in women with postmenopausal osteoporosis. **Bone**, v.67, p.189-192, 2014.

Gehlbach, S.; et al. Previous fractures at multiple sites increase the risk for subsequent fractures: the global longitudinal study of osteoporosis in women. **J Bone Miner Res**, v.27, n.3, p.645-653, 2012.

Gennari, L.; et al. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of osteoporosis: a HuGE review. **Am J Epidemiol**, v.161, n.4, p.307–320, 2005.

Gennari, L.; et al. Steroid hormone receptor gene polymorphisms and osteoporosis: a pharmacogenomic review. **Expert Opin Pharmacother**, v.8, n.5, p.537–553, 2007.

Gennari, L.; et al. Update on the pharmacogenetics of the vitamin D receptor and osteoporosis. **Pharmacogenomics**, v.10, n.3, p.417–433, 2009.

Giacomini, D.R.; Mella, E.A.C. Reposição Hormonal: vantagens e desvantagens. **Semina: Ciências Biológicas e Saúde**, v.27, n.1, p.71-92, 2006.

Gil, A.; Plaza-Diaz, J.; Mesa, M.D. Vitamin D: Classic and Novel Actions. **Ann Nutr Metab**, v.72, n.2, p.87-95, 2018.

Glantschnig, H.; et al. Generation and selection of novel fully human monoclonal antibodies that neutralize Dickkopf-1 (DKK1) inhibitory function in vitro and increase bone mass in vivo. **J Biol Chem**, v.285, n.51, p.40135–40147, 2010.

Göbel, A.; et al. Potentiated suppression of Dickkopf-1 in breast cancer by combined administration of the mevalonate pathway inhibitors zoledronic acid and statins. **Breast Cancer Res Treat**, v.154, n.3, p.623-631, 2015.

Gonnelli, S.; Caffarelli, C. Abaloparatide. **Clin Cases Miner Bone Metab**, v.13, n.2, p.106-109, 2016.

Gori, F.; Lerner, U.; Ohlsson, C. A new WNT on the bone: WNT16, cortical bone thickness, porosity and fractures. **Bonekey Rep**, v.13, n.4, p.669, 2015.

Guañabens, N.; Gifre, L.; Peris, P. The role of Wnt signaling and sclerostin in the pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis. **Curr Osteoporos Rep**, v.12, n.1, p.90-97, 2014.

Guo, J.; et al. Suppression of Wnt signaling by Dkk1 attenuates PTH-mediated stromal cell response and new bone formation. **Cell Metab**, v.11, n.2, p.161-171, 2010.

Hadjidakis, D.J.; Androulakis, I.I. Bone remodeling. **Ann N Y Acad Sci**, v.1092, n.1, p.385-396, 2006.

Harrison, R.A.; et al. Osteoporosis-related kyphosis and impairments in pulmonary function: a systematic review. **J Bone Miner Res**, v.22, n.3, p.447-457, 2007.

Hattersley, G.; et al. Binding selectivity of abaloparatide for PTH-type-1 receptor conformations and effects on downstream signaling. **Endocrinology**, v.157, n.1, p.141-149, 2016.

Herrington, D.M.; et al. HERS study group, statin therapy, cardiovascular events, and total mortality in the heart and estrogen/progestin replacement study (HERS). **Circulation**, v.105, n.25, p.2962–2967, 2002.

Herrmann, M.; et al. The role of hyperhomocysteinemia as well as folate, vitamin B6 and B12 deficiencies in osteoporosis: a systematic review. **Clin Chem Lab Med**, v.45, n.12, p.1621– 1632, 2007.

Hrycaj, S.M.; et al. Hox5 Genes Regulate the Wnt2/2b-Bmp4-signaling axis during lung development. **Cell Rep**, v.12, n.6, p.903-912, 2015.

Iwashita, S.; Koyama, K.; Nakamura, Y. VNTR sequence on human chromosome 11p15 that affects transcriptional activity. **J Hum Genet**, v.46, n.12, p.717–721, 2001.

Jarvinen, T.L.N.; et al. Osteoporosis: the emperor has no clothes. **J Intern Med**, v.277, n.6, p.662-673, 2015.

Jiang, Z.; et al. Upregulation and biological function of transmembrane protein 119 in osteosarcoma. **Exp Mol Med**, v.49, n.5, p.1-12, 2017.

Jin, A.; et al. The effect of long-term bisphosphonate therapy on trabecular bone strength and microcrack density. **Bone Joint Res**, v.6, n.10, p.602-609, 2017.

Jin, H.; et al. Anti-DKK1 antibody promotes bone fracture healing through activation of β catenin signaling. **Bone**, v.71, p.63-75, 2015.

Kai, M.C.; Anderson, M.; Lau, E.M. Exercise interventions: defusing the world's osteoporosis time bomb. **Bull World Health Organ**, v.81, n.11, p.827-830, 2004.

Kanis, J.A.; et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. **Osteoporos Int**, v.19, n.4, p.399–428, 2008.

Kanis, J.A.; et al. Partial adherence: a new perspective on health economic assessment in osteoporosis. **Osteoporos Int**, v.22, n.10, p.2565-2573, 2011.

Kanis, J.A.; et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. **Osteoporos Int**, v.24, n.1, p.23-57, 2013.

Karasik, D.; Rivadeneira, F.; Johnson, M.L. The genetics of bone mass and susceptibility to bone diseases. **Nat Rev Rheumatol**, v.12, n.8, p.1-12, 2016.

Karsenty, G; Kronenberg, H.M.; Settembre, C. Genetic control of bone formation. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.25, p.629-648, 2009.

Katsimbri, P. The biology of normal bone remodelling. **Eur J Cancer Care**, v.26, n.6, p.1-5, 2017.

Khajuria, D.K.; Razdan, R.; Mahapatra, D.R. Medicamentos para o tratamento da osteoporose: revisão. **Rev. Bras. Reumatol**, v.51, n.4, p.365-382, 2011.

Khan, S.A.; et al. Osteoporosis follow up after wrist fractures following minor trauma. **Arch Intern Med**, v.161, n.10, p.1309-1312, 2001.

Khan, T. N.; et al. Novel missense mutation in the RSPO4 gene in congenital hyponychia and evidence for a polymorphic initiation codon (p.M1I). **BMC Medical Genetics**, v.13, n.120, p.1-5, 2012.

Khosla, S.; Oursler, M.J.; Monroe, D.G. Estrogen and the skeleton. **Trends Endocrinol Metab**, v.23, n.11, p.576-581, 2012.

Klotzbuecher, C. M.; Ross, P.D.; Landsman, P. B. Patients with prior fractures have an increased risk of future fractures: a summary of the literature and statistical synthesis. **J Bone Miner Res**, v.15, n.4, p.721-739, 2000.

Ko, C.H.; et al. Deteriorating effect on bone metabolism and microstructure by passive cigarette smoking through dual actions on osteoblast and osteoclast. **Calcif Tissue Int**, v.96, n.5, p.389-400, 2016.

Kobayashi, S.; et al. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. **J Bone Miner Res**, v.11, n.3, p.306–311, 1996.

Kobayashi, S.; et al. Trabecular mini modeling in human iliac bone. **Bone**, v.32, n.2, p.163-169, 2003.

Koh, J. M.; et al. Association between bone mineral density and LDL receptor-related protein 5 gene polymorphisms in young Korean men. **J Korean Med Sci**, v.19, n.3, p.407-412, 2004.

Komatsu, R.S.; Ramos, L.R.; Szejnfeld, V.L. Incidence of proximal femur fractures in Marilia, Brazil. **J Nutr Health Aging**, v.8, n.5, p.362-367, 2004.

Kramer, I.; Halleux, C.; Keller, H. Osteocyte Wnt / β catenin signaling is required for normal bone homeostasis. **Mol Cell Biol**, v.30, n.12, p.3071–3085, 2010.

Lajeunesse, D.; Martel-Pelletier, J.; Pelletier, J.P. Osteoporosis and osteoarthritis: bone is the common battleground. **Medicografia**, v. 32, n. 4, p. 391-398, 2010. Disponível em: <<https://www.medicographia.com/2011/05/osteoporosis-osteoarthritis-bone-is-the-common-battleground/>>. Acesso em: 01 set. 2017.

Lee, D.O.; et al. Association between polymorphisms in sclerostin, Dickkopf1 and secreted frizzled-related protein genes and bone mineral density in postmenopausal Korean women. **Gynecol Obstet Invest**, v.77, n.3, p.186-193, 2014.

Lewiecki, E.M. New targets for intervention in the treatment of postmenopausal osteoporosis. **Nat Rev Rheumatol**, v.7, n.11, p.631-638, 2011.

Li, X.; et al. Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. **J Bone Miner Res**, v.24, n.4, p.578-588, 2009.

Li, X.; et al. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. **J Bone Miner Res**, v.23, n.6, p.860-869, 2008.

Li, Y.; Pawlik, B.; Elcioglu, N. LRP4 mutations alter Wnt / β catenin signaling and cause limb and kidney malformations in Cenani–Lenz syndrome. **Am J Hum Genet**, v.86, n.5, p.696–706, 2010.

Lim, S.Y.; Bolster, M.B. Profile of romosozumab and its potential in the management of osteoporosis. **Drug Des Devel Ther**, v.11, n.1-11, p.1221-1231, 2017.

Liu, F.; Kohlmeier, S.; Wang, C.Y. Wnt signaling and skeletal development. *Cell Signal*, v.20, n.6, p.999–1009, 2008.

Lubec, B.; et al. Evidence for McKusick's hypothesis of deficient collagen cross-linking in patients with homocystinuria. **Biochim Biophys Acta**, v.1315, n.3, p.159-162, 1996.

Luxenburg, C.; et al. The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: From podosome formation to sealing zone assembly. **PLoS One**, v.2, n.1, p.1-8, 2007.

Maximov, P.Y.; Lee, T.M.; Jordan, V.C. The discovery and development of selective estrogen receptor modulators (SERMs) for clinical practice. **Curr Clin Pharmacol**, v.8, n.2, p.135-155, 2013.

McClung, M.; et al. Bisphosphonate therapy for osteoporosis: benefits, risks, and drug holiday. **Am J Med**, v.126, n.1, p.13-20, 2013.

McLean, R.; et al. Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. **N Engl J Med**, v.350, n.20, p.2042–2049, 2004.

McMillan, L.B.; et al. Prescribing physical activity for the prevention and treatment of osteoporosis in older adults. **Healthcare**, v.5, n.4, p.1-15, 2017.

Medina-Gomez, C.; et al. Meta-analysis of genome-wide scans for total body BMD in children and adults reveals allelic heterogeneity and age-specific effects at the WNT16 locus. **PLoS Genet**, v.8, n.7, p.e1002718, 2012.

Moraes, L.F.S.; Silva, E.N.; Silva, D.A.S. Gastos com o tratamento da osteoporose em idosos do Brasil (2008 - 2010): análise dos fatores associados. **Rev bras epidemiol**, v.17, n.3, p.719-734, 2014.

Morrison, N.A.; et al. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. **Nature**, v.367, n.6460, p.284–287, 1994.

Movérare-Skrtic, S.; et al. Osteoblast-derived WNT16 represses osteoclastogenesis and prevents cortical bone fragility fractures. **Nat Med**, v.20, n.11, p.1279-1288, 2014.

Mullard, A. Merck & Co. Drops osteoporosis drug odanacatib. **Nat Rev Drug Discov**, v.15, n.10, p.669, 2016.

Nayak, S.; Greenspan, S.L. Cost-effectiveness of osteoporosis screening strategies for men. **J Bone Miner Res**, v.31, n.6, p.1189–1199, 2016.

Oliveira, N. Expectativa de vida do brasileiro é de 75,8 anos, diz IBGE. **Agência Brasil**. Disponível em <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/pesquisa-e-inovacao/noticia/2017-12/expectativa-de-vida-do-brasileiro-e-de-758-anos-diz-ibge>>. Acesso em: 01 jul. 2017.

Ominsky, M.S.; et al. Two doses of sclerostin antibody in cynomolgus monkeys increases bone formation, bone mineral density, and bone strength. **J Bone Miner Res**, v.25, n.5, p.948-959, 2010.

Onizuka, T.; et al. Wnt2 accelerates cardiac myocyte differentiation from ES-cell derived mesodermal cells via non-canonical pathway. **J Mol Cell Cardiol**, v.52, n.3, p.650-659, 2012.

Otero, K.; Shinohara, M.; Zhao, H. TREM2 and β catenin regulate bone homeostasis by controlling the rate of osteoclastogenesis. **J Immunol**, v.188, n.6, p.2612–2621, 2012.

Paiva, L.C.; et al. Impact to degenerative radiographic abnormalities and vertebral fractures on spinal bone density of women with osteoporosis. **Sao Paulo Med J**, v.120, n.1, p.9-12, 2002.

Pavone, V.; et al. Pharmacological therapy of osteoporosis: a systematic current review of literature. **Front Pharmacol**, v.8, n.803, p.1-7, 2017.

Pazianas, M.; Abrahamsen, B. Osteoporosis treatment: bisphosphonates reign to continue for a few more years, at least ? **Ann N Y Acad Sci**, v.1376, n.1, p.5–13, 2016.

Pez, F.; et al. Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: molecular targets for the development of innovate anticancer drugs. **J Hepatol**, v.59, n.5, p.1107-1117, 2013.

Pinheiro, M.; Ciconelli, R.M.; Jacques, N.O. O impacto da osteoporose no Brasil: dados regionais das fraturas em homens e mulheres adultos - The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). **Rev Bras Reumatol**, v.50, n.2, p.113-127, 2010.

Pinheiro, M.M.; et al. FRAX: construindo uma ideia para o Brasil. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.53, n.6, p.783-790, 2009.

Piters, E.; et al. First missense mutation in the SOST gene causing sclerosteosis by loss of sclerostin function. **Hum Mutat**, v.31, n.7, p.1526–1543, 2010.

Queiroz, J. W. M.; Pereira, P.C.A.; Figueiredo, E.G. Fraturas Osteoporóticas da Coluna Vertebral. **Arq Bras Neurocir**, v.33, n.3, p.258-265, 2014.

Ralston, S.H.; Uitterlinden, A. G. Genetics of osteoporosis. **Endocr Ver**, v.31, n.5, p.629–662, 2010.

Reid, I. R. Vitamin D effect on bone mineral density and fractures. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v.46, n.4, p.935-945, 2017.

Reilly, R.; et al. MTHFR 677TT genotype and disease risk: is there a modulating role for B-vitamins ? **Proc Nutr Soc**, v.73, n.1, p.47–56, 2014.

Rennó, A.C.M.; et al. Consensus Development Conference: diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. **Am J Med**, v.94, n.6, p.646-650, 1993.

Riancho, J.A.; Hernández, J.L. Pharmacogenomics of osteoporosis: a pathway approach. **Pharmacogenomics**, v.13, n.7, p.815-829, 2012.

Richards J.B.; Zheng, H.F.; Spector, T.D. Genetics of osteoporosis from genomewide association studies: advances and challenges. **Nat Rev Genet**, v.13, n.8, p.576–588, 2012.

Ro, C.; Cooper, O. Bisphosphonate drug holiday: choosing appropriate candidates. **Curr Osteoporos Rep**, v.11, n.1, p.45-51, 2014.

Rosengren, B.E.; Karlsson, M.K. The annual number of hip fractures in Sweden will double from year 2002 to 2050: projections based on local and nationwide data. **Acta Orthop**, v.85, n.3, p.234-237, 2014.

Sadr-Eshkevari, P.; et al. Bisphosphonates and connexin 43: a critical review of evidence. **Cell Commun Adhes**, v.21, n.5, p.241-247, 2014.

Sano, M.; et al. Association of estrogen receptor dinucleotide repeat polymorphism with osteoporosis. **Biochem Biophys Res Commun**, v.217, n.1, p.378–383, 1995.

Santos, L.; Elliott-Sale, K.J.; Sale, C. Exercise and bone health across the lifespan. **Biogerontology**, v.18, n.6, p.931-946, 2017.

Schwartz, A.V.; et al. International variation in the incidence of hip fractures: cross-national project on osteoporosis for the World Health Organization Program for Research on Aging. **Osteoporos Int**, v.9, n.3, p.242-253, 1999.

Sharma, G.; et al. Genetic polymorphism in extracellular regulators of Wnt signaling pathway. **Biomed Res Int**, v.2015, p.1-9, 2015.

Shen, L.; Glowacki, J.; Zhou, S. Inhibition of adipocytogenesis by canonical WNT signaling in human mesenchymal stem cells. **Exp Cell Res**, v.317, n.13, p.1796-1803, 2011.

Silveira, V.A.; et al. Hip fracture incidence in an urban area in Northeast Brazil. **Cad Saude Publica**, v.21, n.3, p.907-912, 2005.

Silverman, S.L.; et al. Sustained efficacy and safety of bazedoxifene in preventing fractures in postmenopausal women with osteoporosis: results of a 5-year, randomized, placebo-controlled study. **Osteoporos Int**, v.23, n.1, p.351-363, 2012.

Sung, I.Y.; et al. FOX1 is involved in the effects of cigarette smoke extract on osteoblastic differentiation of cultured human periosteum-derived cells. **Int J Med Sci**, v.12, n.11, p.881-890, 2015.

Suzuki, T.; Nakamura, Y.; Kato, H. Changes of bone-related minerals during denosumab administration in postmenopausal osteoporotic patients. **Nutrients**, v.9, n.9, p.1-9, 2017.

Szejnfeld, V.L. Reumatologia. In: PRADO, F.C.; RAMOS, J.; VALLE, J.R. **Atualização terapêutica**. 20ªed. São Paulo: Artes Médicas, 2001. v.18, p.1434-1437.

Tabatabaei-Malazy, O.; et al. New horizons in treatment of osteoporosis. **Daru**, v. 25, n.2, p.1-16, 2017.

Tai, N.; Inoue, D. Anti-Dickkopf1 (Dkk1) antibody as a bone anabolic agent for the treatment of osteoporosis. **Clin Calcium**, v.24, n.1, p.75-83, 2014.

Takeuchi, T.; et al. Effect of denosumab on japanese patients with rheumatoid arthritis: a dose-response study of AMG 162 (Denosumab) in patients with rheumatoid arthritis on methotrexate to validate inhibitory effect on bone erosion (DRIVE)—a 12-month, multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial. **Ann Rheum Dis**, v.75, n.6, p.983-990, 2016.

Tamura, Y.; Kaji, H. Parathyroid hormone and Wnt signaling. **Clin Calcium**, v.23, n.6, p.847-852, 2013.

Thakkestian, A.; et al. Meta-analysis of molecular association studies: vitamin D receptor gene polymorphisms and BMD as a case study. **J Bone Miner Res**, v.19, n.3, p.419-428, 2004.

Truntzer, J.; et al. Smoking cessation and bone healing: optimal cessation timing. **Eur J Orthop Surg Traumatol**, v.25, n.2, p.211-215, 2015.

Urano, T.; Inoue, S. Genetics of osteoporosis. **Biochem Biophys Res Commun**, v.452, n.2, p.287-293, 2014.

Urbanetz, A.A. FRAX – Aplicação Prática. **Boletim SBRH**. Disponível em: <<http://www.sbrh.org.br/boletins/boletim-2013-ano11-n3.pdf>> Acesso em: 10 jan, 2018.

Valero, C.; et al. Relationship of sclerostin and secreted frizzled protein polymorphisms with bone mineral density: an association study with replication in postmenopausal women. **Menopause**, v.18, n.7, p.802-807, 2011.

Velázquez-Cruz, R.; et al. Analysis of association of MEF2C, SOST and JAG1 genes with bone mineral density in Mexican-mestizo postmenopausal women. **BMC Musculoskelet Disord**, v.15, p.1-8, 2014.

Velázquez-Cruz, R.; et al. WNT3A gene polymorphisms are associated with bone mineral density variation in postmenopausal mestizo women of an urban Mexican population: findings of a pathway-based high-density single nucleotide screening. **Age**, v.36, n.3, p.1483-1492, 2014.

Weitzmann, M.N.; Pacifici, R. T cells: Unexpected players in the bone loss induced by estrogen deficiency and in basal bone homeostasis. **Ann N Y Acad Sci**, v.1116, p.360–375, 2007.

Williams, B.O.; Insogna, K.L. Where Wnts went: the exploding field of Lrp5 and Lrp6 signaling in bone. **J Bone Miner Res**, v.24, n.2, p.171–178, 2009.

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

Xu, G.Y.; Qiu, Y.; Mao, H.J. Common polymorphism in the LRP5 gene may increase the risk of bone fracture and osteoporosis. **Biomed Res Int**, v.2014, p.1-13, 2014.

Xu, H.; et al. Connexin 43 channels are essential for normal bone structure and osteocyte viability. **Bone Miner Res**, v.30, n.3, p.550-562, 2015.

Zerbini, C.A.; et al. Incidence of hip fracture in Brazil and the development of a FRAX model. **Arch Osteoporos**, v.10, n.28, p.1-7, 2015.

Zhang, R.; et al. Wnt / β catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts. **Bone**, v.52, n.1, p.145-156, 2013.

Zheng, H.F.; et al. WNT16 influences bone mineral density, cortical bone thickness, bone strength, and osteoporotic fracture risk. **PLoS Genet**, v.8, n.7, p.1-13, 2012.

APÊNDICE A: TCLE PACIENTES E GRUPO CONTROLE

TCLE – PACIENTES COM OSTEOPOROSE

A Sra. está sendo convidada a participar como voluntária da pesquisa: "**Polimorfismos dos genes codificantes das proteínas da via Wnt: Associação com a suscetibilidade ao desenvolvimento de baixa massa óssea e à osteoporose**". Após ser esclarecida sobre as informações a seguir e, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma dessas vias será do voluntário e a outra será do pesquisador responsável. Em caso de recusa a Sra. não será penalizada de forma alguma e suas consultas no Hospital das Clínicas da UFPE não serão prejudicadas.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Título do projeto de pesquisa: "polimorfismos dos genes codificantes das proteínas da via wnt: associação com a suscetibilidade ao desenvolvimento de baixa massa óssea e à osteoporose".

Pesquisador Responsável: Alexandre Domingues Barbosa

Contato: - Alexandre Domingues Barbosa – Hospital das Clínicas da UFPE – Serviço de Reumatologia, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901 Fone: (81) 2126.3575 e-mail: domingues.reumato@gmail.com

Comitê de Ética do CCS/UFPE - Av Engenharia s/n, 1º andar - Cidade Universitária, Recife - CEP: 50740-600 Fone (81) 2126.8588

Objetivos: Estamos realizando uma pesquisa sobre a presença de uma alteração genética em algumas proteínas de um sistema de sinalização do tecido esquelético (chamado sistema de sinalização Wnt canônico) que são responsáveis pela manutenção da massa óssea (saúde óssea). A alteração genética pode prejudicar a função das proteínas desse sistema de sinalização do tecido ósseo fazendo com que a pessoa fique com ossos mais fracos. Essa pessoa pode ter massa óssea baixa ou osteoporose e pode também quebrar / fraturar os ossos com maior facilidade devido a uma simples queda ou escorregão. A pessoa pode também ter essa alteração genética e não sentir nada.

Aspectos Éticos: O seu anonimato será garantido de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa, ou seja, a sua participação terá sigilo completo, através da identificação da sua amostra numerada por códigos e assim sua participação estará protegida de qualquer exposição. Todo o material referente à pesquisa como resultado de exames, questionários e documentos ficarão armazenados no próprio ambulatório de reumatologia do HC / UFPE em espaço destinado ao arquivamento de documentação de

pesquisas clínicas realizadas pelo serviço, garantindo um adequado armazenamento de dados bem como o sigilo de seus participantes.

Riscos e Benefícios: A Sra. será submetida ao mesmo risco de se colher um exame de sangue (roncha ou inchaço ou dor no local em que foi coletado o sangue). Com a sua autorização, gostaríamos de utilizar uma pequena quantidade do seu sangue (5 mL) que será colhido hoje juntamente com seus exames de rotina que foram solicitados pelo seu médico, para realizar a avaliação genética. Solicitamos também a sua autorização para utilizar dados do seu prontuário como idade, sexo, idade que iniciou a doença, tempo de doença e os resultados dos últimos exames de rotina que foram realizados para avaliar o controle da sua doença. Caso seja encontrada alguma alteração no exame, a Sra. será comunicada e explicaremos os resultados dos exames. Caso não queira participar desta pesquisa, a Sra. continuará a receber o mesmo atendimento que sempre recebeu neste hospital. Embora, o projeto não apresente um benefício direto para o participante, estamos tentando descobrir se as mulheres que têm alterações genéticas dessas proteínas apresentam maior chance de ter baixa massa óssea ou osteoporose (ossos fracos). O estudo, portanto, pretende entender as causas da doença. E entender melhor as causas do problema pode ajudar a desenvolver novos tratamentos para cuidar e tratar melhor dos ossos, no futuro.

Custo/Reembolso: Não haverá nenhum gasto com a participação da Sra. nesta pesquisa. A Sra também não receberá nenhum pagamento com a sua participação.

CONSENTIMENTO

Eu, _____,
RG/CPF _____ declaro que entendi os objetivos da pesquisa e sem ter sido pressionada ou constrangida concordo em participar da pesquisa. Tenho consciência do meu direito de abandonar a pesquisa a qualquer momento e de que as informações colhidas serão mantidas em sigilo. Os resultados da pesquisa podem ser apresentados em congressos ou publicados em revistas de cunho técnico, sem que seja divulgado o meu nome.

Data: ____/____/____

Nome _____ do _____ doador

voluntário: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Assinatura: _____

Nome da 1º testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

Nome da 2º testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

TCLE – PACIENTES COM OSTEOPENIA

A Sra. está sendo convidada a participar como voluntária da pesquisa: " **Polimorfismos dos genes codificantes das proteínas da via Wnt: Associação com a suscetibilidade ao desenvolvimento de baixa massa óssea e à osteoporose** ". Após ser esclarecida sobre as informações a seguir e, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma dessas vias será do voluntário e a outra será do pesquisador responsável. Em caso de recusa a Sra. não será penalizada de forma alguma e suas consultas no Hospital das Clínicas da UFPE não serão prejudicadas.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Título do projeto de pesquisa: "polimorfismos dos genes codificantes das proteínas da via wnt: associação com a suscetibilidade ao desenvolvimento de baixa massa óssea e à osteoporose".

Pesquisador Responsável: Alexandre Domingues Barbosa

Contato: - Alexandre Domingues Barbosa – Hospital das Clínicas da UFPE – Serviço de Reumatologia, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901 Fone: (81) 2126.3575 e-mail: domingues.reumato@gmail.com

Comitê de Ética do CCS/UFPE - Av Engenharia s/n, 1º andar - Cidade Universitária, Recife - CEP: 50740-600 Fone (81) 2126.8588

Objetivos: Estamos realizando uma pesquisa sobre a presença de uma alteração genética em algumas proteínas de um sistema de sinalização do tecido esquelético (chamado sistema de sinalização Wnt canônico) que são responsáveis pela manutenção da massa óssea (saúde óssea). A alteração genética pode prejudicar a função das proteínas desse sistema de sinalização do tecido ósseo fazendo com que a pessoa fique com ossos mais fracos. Essa pessoa pode ter massa óssea baixa ou osteoporose e pode também quebrar / fraturar os ossos com maior facilidade devido a uma simples queda ou escorregão. A pessoa pode também ter essa alteração genética e não sentir nada.

Aspectos Éticos: O seu anonimato será garantido de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa, ou seja, a sua participação terá sigilo completo, através da identificação da sua amostra numerada por códigos e assim sua participação estará protegida de qualquer exposição. Todo o material referente à pesquisa como resultado de exames, questionários e documentos ficarão armazenados no próprio ambulatório de reumatologia do HC / UFPE em espaço destinado ao arquivamento de documentação de pesquisas clínicas realizadas pelo serviço, garantindo um adequado armazenamento de dados bem como o sigilo de seus participantes.

Riscos e Benefícios: A Sra. será submetida ao mesmo risco de se colher um exame de sangue (roncha ou inchaço ou dor no local em que foi coletado o sangue). Com a sua autorização, gostaríamos de utilizar uma pequena quantidade do seu sangue (5 mL) que será colhido hoje juntamente com seus exames de rotina que foram solicitados pelo seu médico, para realizar a avaliação genética. Solicitamos também a sua autorização para utilizar dados do seu prontuário como idade, sexo, idade que iniciou a doença, tempo de doença e os resultados dos últimos exames de rotina que foram realizados para avaliar o controle da sua doença. Caso seja encontrada alguma alteração no exame, a Sra. será comunicada e explicaremos os resultados dos exames. Caso não queira participar desta pesquisa, a Sra. continuará a receber o mesmo atendimento que sempre recebeu neste hospital. Embora, o projeto não apresente um benefício direto para o participante, estamos tentando descobrir se as mulheres que têm alterações genéticas dessas proteínas apresentam maior chance de ter baixa massa óssea ou osteoporose (ossos fracos). O estudo, portanto, pretende entender as causas da doença. E entender melhor as causas do problema pode ajudar a desenvolver novos tratamentos para cuidar e tratar melhor dos ossos, no futuro.

Custo/Reembolso: Não haverá nenhum gasto com a participação da Sra. nesta pesquisa. A Sra também não receberá nenhum pagamento com a sua participação.

CONSENTIMENTO

Eu, _____
 __, RG/CPF _____ declaro que entendi os objetivos da pesquisa e sem ter sido pressionada ou constrangida concordo em participar da pesquisa. Tenho consciência do meu direito de abandonar a pesquisa a qualquer momento e de que as informações colhidas serão mantidas em sigilo. Os resultados da pesquisa podem ser apresentados em congressos ou publicados em revistas de cunho técnico, sem que seja divulgado o meu nome.

Data: ____/____/____

Nome _____ do _____ doador
 voluntário: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Assinatura: _____

Nome da 1º testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

Nome da 2º testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

TCLE – GRUPO CONTROLE

A Sra. está sendo convidada a participar como voluntária da pesquisa: " **Polimorfismos dos genes codificantes das proteínas da via Wnt: Associação com a suscetibilidade ao desenvolvimento de baixa massa óssea e à osteoporose** ". Após ser esclarecida sobre as informações a seguir e, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma dessas vias será do voluntário e a outra será do pesquisador responsável. Em caso de recusa a Sra. não será penalizada de forma alguma e suas consultas no Hospital das Clínicas da UFPE não serão prejudicadas.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Título do projeto de pesquisa: "polimorfismos dos genes codificantes das proteínas da via wnt: associação com a suscetibilidade ao desenvolvimento de baixa massa óssea e à osteoporose".

Pesquisador Responsável: Alexandre Domingues Barbosa

Contato: - Alexandre Domingues Barbosa – Hospital das Clínicas da UFPE – Serviço de Reumatologia, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901 Fone: (81) 2126.3575 e-mail: domingues.reumato@gmail.com

Comitê de Ética do CCS/UFPE - Av Engenharia s/n, 1º andar - Cidade Universitária, Recife - CEP: 50740-600 Fone (81) 2126.8588

Objetivos: Estamos realizando uma pesquisa sobre a presença de uma alteração genética em algumas proteínas de um sistema de sinalização do tecido esquelético (chamado sistema de sinalização Wnt canônico) que são responsáveis pela manutenção da massa óssea (saúde óssea). A alteração genética pode prejudicar a função das proteínas desse sistema de sinalização do tecido ósseo fazendo com que a pessoa fique com ossos mais fracos. Essa pessoa pode ter massa óssea baixa ou osteoporose e pode também quebrar / fraturar os ossos com maior facilidade devido a uma simples queda ou escorregão. A pessoa pode também ter essa alteração genética e não sentir nada.

Aspectos Éticos: O seu anonimato será garantido de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa, ou seja, a sua participação terá sigilo completo, através da identificação da sua amostra numerada por códigos e assim sua participação estará protegida de qualquer exposição. Todo o material referente à pesquisa como resultado de exames, questionários e documentos ficarão armazenados no próprio ambulatório de reumatologia do HC / UFPE em espaço destinado ao arquivamento de documentação de pesquisas clínicas realizadas pelo serviço, garantindo um adequado armazenamento de dados bem como o sigilo de seus participantes.

Riscos e Benefícios: A Sra. será submetida ao mesmo risco de se colher um exame de sangue (roncha ou inchaço ou dor no local em que foi coletado o sangue). Com a sua autorização, gostaríamos de utilizar uma pequena quantidade do seu sangue (5 mL) que será colhido hoje juntamente com seus exames de rotina que foram solicitados pelo seu médico, para realizar a avaliação genética. Solicitamos também a sua autorização para utilizar dados do seu prontuário como idade, sexo e os resultados dos últimos exames de rotina que foram realizados. Caso seja encontrada alguma alteração no exame, a Sra. será comunicada e explicaremos os resultados dos exames. Caso não queira participar desta pesquisa, a Sra. continuará a receber o mesmo atendimento que sempre recebeu neste hospital. Embora, o projeto não apresente um benefício direto para o participante, estamos tentando descobrir se as mulheres que têm alterações genéticas dessas proteínas apresentam maior chance de ter baixa massa óssea ou osteoporose (ossos fracos). O estudo, portanto, pretende entender as causas da doença. E entender melhor as causas do problema pode ajudar a desenvolver novos tratamentos para cuidar e tratar melhor dos ossos, no futuro.

Custo/Reembolso: Não haverá nenhum gasto com a participação da Sra. nesta pesquisa. A Sra também não receberá nenhum pagamento com a sua participação.

CONSENTIMENTO

Eu,

_____,
 RG/CPF _____ declaro que entendi os objetivos da pesquisa e sem ter sido pressionada ou constrangida concordo em participar da pesquisa. Tenho consciência do meu direito de abandonar a pesquisa a qualquer momento e de que as informações colhidas serão mantidas em sigilo. Os resultados da pesquisa podem ser apresentados em congressos ou publicados em revistas de cunho técnico, sem que seja divulgado o meu nome.

Data: ____/____/____

Nome _____ do _____ doador
 voluntário: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Assinatura: _____

Nome da 1º testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

Nome da 2º testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

APÊNDICE B: FORMULÁRIO DE ACOMPANHAMENTO DE PACIENTES



Serviço de Reumatologia
Ambulatório de Osteometabolismo
Osteoporose
Data atendimento ____/____/____

Nome _____

Prontuário HC _____ Data nascimento: ____/____/____ Idade ____ anos

Endereço _____ Fone (____) _____ - _____

Menarca aos ____ anos. Menopausa aos ____ anos. Tempo de menopausa ____ anos

TRH ☐ sim ☐ não

Medicamento(s) utilizado(s) e período de uso _____

Passado de câncer ☐ sim ☐ não Sítio _____

Cirurgias prévias /ano de realização ☐ sim ☐ não

☐ ooforectomia/ ____ ☐ gastroplastia / ____ método _____ ☐ tireoidectomia/ ____

☐ vertebroplastia/ ____ local/is: _____

Comorbidades ☐ sim ☐ não

☐ DM ☐ HAS ☐ Hipertireoidismo ☐ Hipotireoidismo ☐ Hiperparatireoidismo
☐ Hiperprolactinemia ☐ Hipogonadismo ☐ Síndrome de Cushing
☐ Epilepsia ☐ Demência ☐ Trans. Humor
☐ Gastrite/DRGE ☐ DII ☐ Síndr. má absorção
☐ Doença Celíaca ☐ Doença auto-imune:
☐ AR ☐ Aps ☐ EA ☐ LES ☐ PM ☐ DPM ☐ EA ☐ Sjögren ☐ Vasculite _____

Medicamentos ☐ sim ☐ não

☐ corticoesteróides ☐ hormônio tireoideano ☐ heparina ☐ varfarina

☐ fenitoína ☐ fenobarbita ☐ ciclosporina ☐ hidróxido de alumínio

☐ resinas de troca iônica ☐ diuréticos do tipo tiazolidonas

Tabagismo ☐ sim ☐ não ☐ ex-tabagista Período e qtd. média de cigarros ao dia _____

Alcoólicos ☐ sim ☐ não Tipo: _____ Frequência: _____ Período _____

Atividade Física ☐ sim ☐ não Qual ? _____ Média de horas por semana: _____ h.

Inatividade / Restrição ao leito ☐ sim ☐ não

Ingestão média diária de cálcio na dieta (ver Tabela) _____

No.de xícaras de café/dia _____

Quedas no último ano? ☐ sim Quantas? _____ ☐ não

Quedas nos últimos 5 anos? ☐ sim Quantas? _____ ☐ não

Fratura por fragilidade ☐ sim ☐ não

Sítio: () colo de fêmur () D () E () coluna vértebra(s)____() punho____

Baixa DMO Data diagnóstico ____/____/____

Medicamentos utilizados/ tempo de uso:

() alendronato/____ () risedronato/____ () ibandronato/____ () ácido zolendônico/____

() raloxifeno/____ () estrôncio/____ () denosumabe____

() outro/____

() cálcio/____ () colecalciferol/____

História familiar de osteoporose ou de fratura por fragilidade

(parente de primeiro grau / sítio / idade quando do evento)

Exame Físico Peso: ____ Kg Altura: ____, ____ m IMC____ Perda de estatura () sim () não

Altura média aos 40 anos: ____, ____m Perda de estatura: ____, ____m

Presença de alterações do eixo vertebral: () escoliose () hipercifose

() hiperlordose lombar () deformidades torácicas

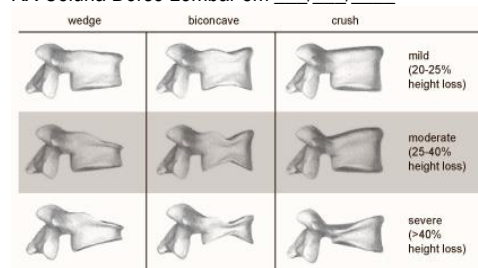
Densitometria Óssea ____/____/____

Equipamento____

	g/cm2	T-Score	Z-score
L1			
L2			
L3			
L4			
L1-L4			
Colo			
Fêmur Total			
Rádio 1/3			

Colapso/ fraturas vertebrais

RX Coluna Dorso Lombar em ____/____/____



	Leve	Moderado	Acentuado
Anterior			
Média			
Posterior			

Laboratório ____/____/____

Hemoglobina		cálcio	
Leucócitos		fósforo	
Plaquetas		magnésio	
TGO / TGP		25 - OH vit. D	
Ur		FA	
Cr		albumina	
Calciúria 24H		VSH	
fosfatúria 24H		PTH	
colesterol total		TSH	
HDL-c / LDL-c		CTX	
triglicerídeos		NTX urina	

Sumário de urina

Eletróforese de proteínas

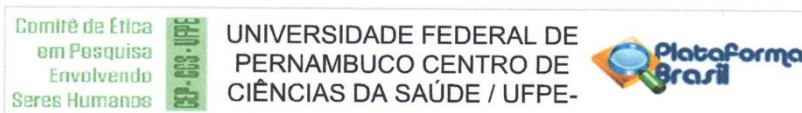
Parecer Cardiológico Data ____/____/____

Dr. _____ CRM _____

Conduta: _____

Lácteo	mg Ca
Leite (Copo 240 ml)	300
Iogurte (Copo 240 ml)	400
Queijo (Fatia 28,35 g)	200
Cálcio de Outras Fontes	150 mg
Total Geral	
Suplemento de Cálcio Recomendado (1200mg)	

ANEXO A: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.888.047

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoAlexandreCorrigido.docx	03/01/2017 11:13:17	Alexandre Domingues Barbosa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_maior_de_18_anosCorrigido.doc	23/12/2016 08:55:43	Alexandre Domingues Barbosa	Aceito
Outros	Anuencia_e_dados_HC.pdf	24/10/2016 09:09:07	Alexandre Domingues Barbosa	Aceito
Outros	Anuencia_e_dados_Reumatologia.pdf	24/10/2016 09:08:13	Alexandre Domingues Barbosa	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	24/10/2016 09:04:27	Alexandre Domingues Barbosa	Aceito
Outros	Lattes_Jaqueline_de_Azevedo_Silva.pdf	09/10/2016 23:46:38	Alexandre Domingues Barbosa	Aceito
Outros	Lattes_Paula_Sandrin_Garcia.pdf	09/10/2016 23:45:53	Alexandre Domingues Barbosa	Aceito
Outros	Lattes_Alexandre_Domingues_Barbosa.pdf	09/10/2016 23:44:27	Alexandre Domingues Barbosa	Aceito
Outros	Anuencia_e_dados_LIKA.pdf	09/10/2016 22:32:31	Alexandre Domingues Barbosa	Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso_e_Confidencialidade.pdf	09/10/2016 22:19:52	Alexandre Domingues Barbosa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 10 de Janeiro de 2017

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

ANEXO B: POLYMORPHISMS IN KEY BONE MODULATOR CYTOKINES GENES INFLUENCE BISPHOSPHONATES THERAPY IN POSTMENOPAUSAL WOMEN

Inflammopharmacol
DOI 10.1007/s10787-017-0322-7

Inflammopharmacology

ORIGINAL ARTICLE



Polymorphisms in key bone modulator cytokines genes influence bisphosphonates therapy in postmenopausal women

C. A. D. Lima^{1,2} · N. R. Javorski^{1,2} · A. P. O. Souza² · A. D. Barbosa^{2,3} ·
A. P. M. C. Valença⁴ · S. Crovella^{1,2} · P. R. E. Souza^{2,5} · J. De Azevedo Silva^{1,2} ·
P. Sandrin-Garcia^{1,2}

Received: 16 December 2016 / Accepted: 28 January 2017
© Springer International Publishing 2017

Abstract Osteoporosis is a multifactorial and debilitating disease resulting from decreased bone mineral density (BMD) and loss of tissue microarchitecture. Ineffective therapies may lead to bone fractures and subsequent death. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in key immune regulator genes have been associated with therapeutic response to bisphosphonates, which are the first therapeutic line of choice for osteoporosis. However, cytokine pathways and their relation with therapeutic adhesion remain to be fully elucidated. Aimed at better understanding these processes, we investigated the response to bisphosphonate therapy in postmenopausal women and four SNPs in key proinflammatory cytokines genes: IL23R +2284 (C>A) (rs10889677), IL17A +672 (G>A) (rs7747909), IL12B +1188 (T>G) (rs3212227) and INF- γ -1616 (G>A) (rs2069705). A total of 69 patients treated with bisphosphonate were followed for a period of 1 up to 4 years, genotyped and compared according to their changes in bone mineral density (BMD) and level of biochemical markers during their treatment. The INF- γ -1616 G/G associated with increased BMD values in femoral neck

(GG/AA, $p = 0.016$) and decreased BMD values in total hip (GG/GA, $p = 0.019$; GG/AA, $p = 0.011$). In relation to biochemical markers, INF- γ -1616 SNP associated with increased alkaline phosphatase (GG/AA; $p < 0.0001$) and parathyroid hormone levels (AA/GA; $p = 0.017$). Vitamin D values changes were related to IL17A +672 (GG/GA, $p = 0.034$) and to IL12B +1188 (TT/TG, $p = 0.046$) SNPs. Besides, significant differences in changes of calcium levels correlated with IL23R +2284 (CC/CA, $p = 0.016$) genotypes. Altogether, we suggest that these polymorphisms may play an important role for therapeutic decisions in osteoporosis treatment.

Keywords Osteoimmunology · Osteoporosis therapy · Bone mineral density · Bone biochemical markers · Genetics of osteoporosis

Introduction

Osteoporosis (OP) is a systemic disease characterized by the decrease of bone mineral density (BMD) and by loss of tissue microarchitecture. OP main clinical manifestations are fragility fracture and injuries related to bone break (Sun et al. 2014; Tella and Gallagher 2014; Drake et al. 2015; Tostan et al. 2016). According to World Health Organization (WHO), OP diagnosis is determined by BMD measures with T scores less than -2.5 (Kanis 2008). Despite being a major problem for global public health, osteoporosis is considered under diagnosed and, consequently, an undertreated disorder by health care systems (Kersch-Schindl 2016; Miller 2016). About half of fractures diagnosed in OP patients are due to unspecific or inefficient drug therapies, increasing morbidity and mortality rates, since about 20% of patients die during the first

✉ C. A. D. Lima
camilladelima@gmail.com

¹ Department of Genetics, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil

² Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil

³ Division of Rheumatology, Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil

⁴ Department of Oceanography, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil

⁵ Department of Genetics, Rural Federal University of Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brazil

ANEXO C: OSTEOPOROSE, SISTEMA IMUNE E GENÉTICA

Osteoporose, Sistema Imune e Genética

A Osteoporose é uma doença osteometabólica degenerativa e multifatorial, caracterizada por redução da densidade mineral óssea e deterioração da microarquitetura tecidual. Dos diversos fatores sistêmicos e locais envolvidos na etiopatogenia da doença, a associação entre componentes do sistema imune e o background genético tem se mostrado como peça chave na manutenção da homeostase do tecido ósseo. Como doença multifatorial, é fundamental que as suas principais causas sejam identificadas precocemente, impedindo assim a progressão da doença. Citocinas tem sido relatadas como participantes dessa homeostase atuando na alteração da reabsorção tecidual e controlando a proliferação das células ósseas. Polimorfismos em genes dessas citocinas, como os SNPs, podem interferir na suas estruturas e níveis de expressão, modificando mecanismos biológicos nos quais estão envolvidas. Desta forma, este livro teve como objetivo verificar o papel do IFN- γ nesse processo, através da análise do polimorfismo rs2069705, níveis de expressão gênica e atividade in vitro da proteína. Esperamos assim contribuir para o preenchimento de lacunas ainda presentes na área da Osteoimunologia no estudo da Osteoporose.

Doutora em Genética pela Universidade Federal de Pernambuco,
Mestre em Biologia Celular e Molecular pela Universidade de
Pernambuco, Especialista em Patologia Clínica pela Universidade de
Pernambuco e Graduada em Biomedicina, pela Universidade Federal de
Pernambuco. Atua principalmente na área de Genética Humana com
ênfase em Reumatologia.



978-620-2-17587-6



Camilla Albertina Dantas de Lima Alexandre D. Barbosa ·
Paula S. Garcia

Osteoporose, Sistema Imune e Genética

Uma nova abordagem para um velho conhecido

 Novas Edições
Acadêmicas