

THAMARA GONÇALVES REIS

Utilização dos fatores peptídicos de crescimento recombinantes humanos rhBMP7 (proteína morfogenética óssea 7) e rhPDGF-BB (fator de crescimento derivado de plaquetas BB) visando o tratamento da osteoporose em modelo de ratas ooforectomizadas

Dissertação apresentada ao Programa e Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar

Versão Corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2021

RESUMO

REIS, T. G. Utilização dos fatores peptídicos de crescimento recombinantes humanos rhBMP7 (proteína morfogenética óssea 7) e rhPDGF-BB (fator de crescimento derivado de plaquetas BB) visando o tratamento da osteoporose em modelo de ratas ooforectomizadas. 2021. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

A osteoporose é uma doença comum que afeta os ossos, tornando-os frágeis e sujeitos a fraturas, atingindo uma grande quantidade de pessoas no Brasil e no Mundo. É causada pelo desequilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea, o que acarreta na dificuldade de reparo e regeneração do tecido, causando forte impacto na morbidade e mortalidade dos pacientes. Entre as proteínas que atuam na regulação e estimulação da osteogênese, as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) desempenham um papel de suma importância na manutenção da homeostasia óssea e possuem atividade regenerativa no tecido sendo, por isso, candidatos com alto potencial para o tratamento da osteoporose. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é investigar os efeitos dos fatores peptídicos de crescimento humanos recombinantes da proteína morfogenética óssea 7 (rhBMP7) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (rhPDGF-BB) na osteoporose induzida por ooforectomia em ratas, visando a atenuação da doença. Para isso, ratas da linhagem Sprague-Dawley foram divididas em nove grupos experimentais recebendo diferentes produtos em uma ou duas doses por semana: controle cirúrgico (Sham), ooforectomia, ooforectomia + veículo (controle), ooforectomia + rhBMP7 (30µg/kg) 2x/semana, ooforectomia + rhBMP7 (30µg/kg) 1x/semana, ooforectomia + rhPDGF-BB (20µg/kg) 2x/semana, ooforectomia + rhPDGF-BB (20µg/kg) 1x/semana, ooforectomia +rhBMP7 (30µg/kg) e rhPDGF-BB (20µg/kg) 2x/semana, ooforectomia +rhBMP7 (30µg/kg) e rhPDGF-BB (20µg/kg) 1x/semana. O tratamento foi iniciado 100 dias após a cirurgia de ooforectomia. As injeções foram aplicadas de forma intravenosa pela veia do plexo ocular dos animais e o tratamento durou cinco semanas, com injeções uma ou duas vezes por semana. Após 15 dias do término do tratamento, os animais foram eutanasiados e seus tecidos foram coletados. Os testes de dosagem de fosfatase alcalina (ALP), análise de raio-X, micro-CT, histologia e imuno-histoquímica foram realizados. Após 100 dias da realização da cirurgia, foi observado aumento nas concentrações de ALP no sangue dos animais ooforectomizados. Além disso, o volume ósseo e a densidade óssea em todos os grupos apresentaram redução significativa em relação aos animais do grupo Sham, indicando que a osteoporose foi induzida nos animais. Quanto aos tratamentos, os mais promissores foram

BMP-7 e PDGF-BB+BMP-7 com duas aplicações semanais, totalizando, respectivamente, 22% e 26% de aumento da fração do volume ósseo. Dessa forma, conclui-se que as proteínas rhPDGF-BB e rhBMP-7 são capazes de induzir aumento de volume e densidade ósseos em modelos animais com osteoporose, sendo candidatos com potencial para o tratamento da doença.

Palavras-chave: Fator peptídico de crescimento. Modelo animal. Osteoporose. Ooforectomia.

ABSTRACT

REIS, T. G. **Use of recombinant human peptide growth factors rhBMP7 (bone morphogenetic protein 7) and rhPDGF-BB (platelet-derived growth factor BB) for the treatment of osteoporosis in an oophorectomized rat model.** 2021. 100 f. Masters thesis (Biotecnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Osteoporosis is a common disease that affects bones, rendering them fragile and subject to fractures. It affects a large number of people in Brazil and worldwide, being caused by an imbalance between bone resorption and formation, which hampers tissue repair and regeneration and has a strong impact on patient morbidity and mortality. Among the proteins which regulate and stimulate osteogenesis are the bone morphogenetic protein (BMP) and platelet-derived growth factor (PDGF), both play an important role in maintaining bone homeostasis and display regenerative activity in bone tissue, being worthy candidates with high potential for the treatment of osteoporosis. Therefore, the aim of the present study is to investigate the effects of recombinant human growth factors bone morphogenetic protein 7 (rhBMP7) and platelet derived growth factor (rhPDGF-BB) in rats subjected to oophorectomy-induced osteoporosis aiming disease attenuation. To this end, Sprague-Dawley rats were divided into nine groups, namely: sham, oophorectomy, oophorectomy + vehicle (Control), oophorectomy + rhBMP7 (30µg/kg) 2x/week, oophorectomy + rhBMP7 (30µg/kg) 1x/week, oophorectomy + rhPDGF-BB (20µg/kg) 2x/week, oophorectomy + rhPDGF-BB (20µg/kg) 1x/week, oophorectomy + rhBMP7 (30µg/kg) + rhPDGF-BB (20µg/kg) 2x/week, oophorectomy + rhBMP7 (30µg/kg) + rhPDGF-BB (20µg/kg) 1x/week. The treatments started at 100th day after oophorectomy surgery. Injections were applied intravenously through the animals' ocular plexus vein and the treatments lasted for five weeks, with injections once or twice week. After two weeks, the animals were euthanized and their tissues were collected. ALP, X-ray, micro-CT, Histology and Immunohistochemistry tests were performed. At 100th day after surgery, the animals' ALP blood concentration increased and their bone volume and

density significantly decreased, when compared to the Sham group. Indicating that they were osteoporotic. Regarding the treatments, the most promising ones are BMP-7 and PDGF-BB+BMP-7 with injections twice week, resulting in 22% e 26% increase in bone volume fraction, respectively. Consequently, we conclude that rhPDGF-BB and rhBMP-7 are capable of induce increase in bone volume and density on osteoporotic animal model, being good potential candidates for treatment of this disease.

Keywords: growth factor, animal model, osteoporosis, oophorectomy.

INTRODUÇÃO

1.1 Osteoporose

A osteoporose é uma doença degenerativa que tem como principal característica a perda de massa óssea e degeneração da microarquitetura do tecido, gerando um aumento no risco de fraturas e sendo considerada um grande problema de saúde pública devido ao envelhecimento da população (VESTERGAARD; REJNMARK; MOSEKILDE, 2007; YAACOBI et al., 2017).

É uma das principais enfermidades que afetam os ossos, atingindo cerca de 200 milhões de pessoas no mundo, entre as quais estão, principalmente, mulheres na pós-menopausa e homens idosos (QASEEM et al., 2017). A osteoporose é a causa de mais de 8,9 milhões de fraturas anualmente no mundo, resultando uma fratura osteoporótica a cada 3 segundos, e são previstos cerca de 18 milhões de fraturas em 2040 (YAACOBI et al., 2017). Além disso, estimativas demonstram que fraturas vertebrais decorrentes da osteoporose ocorrem a cada 22 segundos em homens e mulheres acima dos 50 anos. Na Europa, a doença causa mais debilidade que tumores, com exceção do câncer de pulmão, e é comparável a doenças crônicas como artrite reumatoide e asma (JOHNELL; KANIS, 2006).

Estimativas apontam que após os 50 anos de idade, uma a cada três mulheres e um a cada cinco homens sofrerão ao menos uma fratura em suas vidas. Ademais, aproximadamente 50% dos pacientes que já sofreram uma fratura em decorrência da osteoporose poderão sofrer outra futuramente, aumentando continuamente o risco de novas fraturas a cada nova ocorrência, evidenciando, assim, a importância da doença no atual cenário mundial (ÅKESSON; MITCHELL, 2012).

A perda de 10% de massa óssea nas vértebras pode dobrar o risco de ocorrer uma fratura por fragilidade no local e no quadril esse risco é 2,5 vezes maior (KLOTZBUECHER et al., 2000). Até 2050 a incidência de fraturas no quadril em mulheres deve subir 240% e em homens 310%, comparado aos dados de 1990 (GULLBERG; JOHNELL; KANIS, 1997). E ainda os dados indicam que uma fratura prévia está associada com um aumento de 86% no risco de ocorrência de uma nova fratura (KANIS et al., 2004).

A osteoporose é mais incidente e, conseqüentemente, a prevalência de fraturas osteoporóticas é maior em pessoas do sexo feminino. Contudo, os homens possuem maior mortalidade relacionada a fraturas no quadril, nos primeiros 12 meses após uma fratura a mortalidade é 20% maior em homens que em mulheres (CENTER et al., 1999). A maioria dos

pacientes de alto risco que já sofreram ao menos uma fratura decorrente da osteoporose não foram tratados ou diagnosticados (HERNLUND et al., 2013). As estimativas apontam que apenas um terço das fraturas nas vértebras seja diagnosticada (COOPER et al., 1992) e o diagnóstico é de suma importância para evitar novas fraturas. Se uma mulher de 65 anos sofrer uma fratura vertebral decorrente da osteoporose, sua chance é de 25% de sofrer uma nova fratura após 5 anos. Ao ser diagnosticada e tratada, essa chance é reduzida para 1 em 8 (KAPTOGE et al., 2004). No Brasil, apenas um terço dos pacientes com fratura no quadril é diagnosticado e desses apenas 1 em cada 5 pacientes recebe um tratamento (ZABAGLIA; COSTA-PAIVA; PINTO-NETO, 2001).

Além do sofrimento dos pacientes, a osteoporose gera ainda custos muito elevados aos sistemas de Saúde. No Brasil, os gastos anuais estimados são de 310 milhões de dólares, sendo atribuídos principalmente à perda de produtividade e hospitalizações. O número de fraturas decorrentes da osteoporose no país em 2018 foi de 413.546 e são esperadas 417.445 em 2022 (AZIZIYEH et al., 2019). As fraturas no quadril geram custo estimado de 6 milhões de dólares aos planos de saúde do país (ARAÚJO; OLIVEIRA; BRACCO, 2005). Nos EUA, os custos foram de aproximadamente 17 bilhões de dólares em 2005 (BURGE et al., 2007) e na Europa em 2010 foram de 34,5 bilhões de dólares (SVEDBOM et al., 2013). Esses valores tendem a aumentar conforme a população mundial envelhece, esperando-se que sejam gastos cerca de 25,3 bilhões por ano em 2025 nos EUA (QASEEM et al., 2017).

A doença afeta os ossos do corpo todo, no entanto, são mais frequentes as fraturas nas vértebras, nos pulsos e no quadril, além de braços, pélvis e parte inferior das pernas (ÅKESSON; MITCHELL, 2012). Os pacientes apresentam maior morbidade e mortalidade em decorrência dessas fraturas e devido à regeneração comprometida do tecido ósseo (ZOFKOVA; BLAHOS, 2017). Essas lesões causam dores e podem gerar deficiências graves. Além disso, fraturas no quadril e nas vértebras estão relacionadas ao aumento do risco de morte, com cerca de 20% das pessoas que sofrem uma fratura de quadril falecendo no período de seis meses após a lesão (ÅKESSON; MITCHELL, 2012). Já as fraturas vertebrais podem resultar em dores nas costas, perda de peso, imobilidade, aumento no tempo acamado e ainda reduzir a eficiência pulmonar (LIPS et al., 1999), afetando assim as atividades diárias da pessoa acometida (ADACHI et al., 2002).

1.2 Fisiopatologia

O tecido ósseo é altamente dinâmico e desempenha diversas funções no organismo entre elas: suporte e locomoção, proteção de órgãos como pulmões, cérebro e coração, hematopoiética e metabólica ao ser fonte de íons como cálcio e fósforo, além de produzir osteocalcina e fator de crescimento fibroblástico 23 (FGF23) (OLDKNOW; MACRAE; FARQUHARSON, 2015).

Os ossos são formados por dois diferentes tecidos, o cortical e o trabecular. O cortical ou compacto é denso e compõe a parte externa do osso, representando cerca de 80%. Já o trabecular ou esponjoso está presente no interior de ossos longos e chatos e é um tecido composto por uma rede tridimensional de trabéculas interconectadas envoltas em medula óssea, correspondendo aos 20% restantes do osso. Esse tecido é formado por uma matriz orgânica mineralizada rica em cálcio-fosfato na forma de cristais de hidroxapatita, matriz extracelular, fibras de colágeno e outras proteínas, além de células ósseas (EMMANUELLE et al., 2021).

Os ossos estão entre os poucos órgãos capazes de se regenerar quando adulto, sendo o um tecido que continuamente se remodela durante a vida (KIM et al., 2017). As células que participam desse processo e estão ligadas à manutenção da homeostase do tecido são, principalmente, os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea, os osteoblastos que secretam a matriz óssea, e os osteócitos, que mantem a homeostase do tecido (SEGREDO- MORALES et al., 2017) (Figura 1).

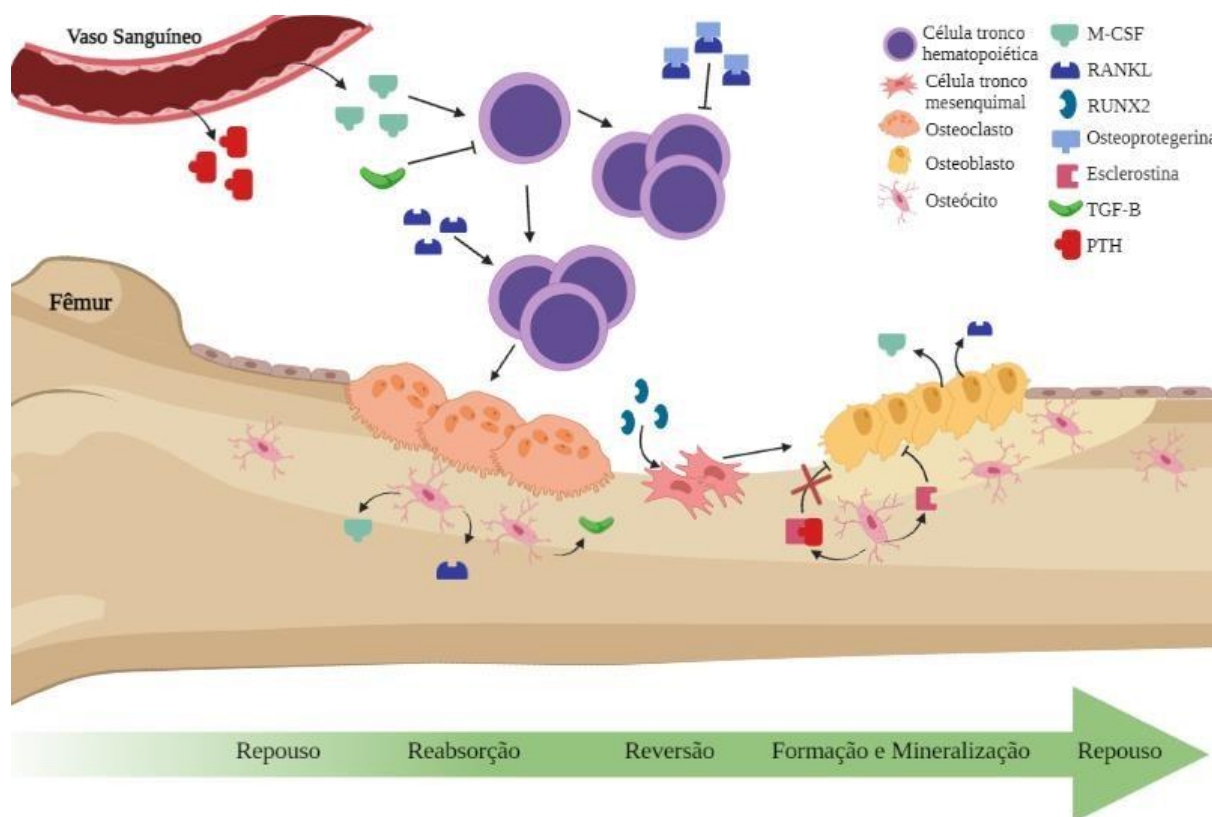


Figura 1 - Esquemática da remodelação óssea. As células-tronco hematopoiéticas se diferenciam em osteoclastos induzidas pelo M-CSF e RANKL, e essa diferenciação é inibida pela osteoprotegerina e TGF- β . As células-tronco mesenquimais se diferenciam em osteoblastos pela ação do fator de transcrição Runx2 e essas células liberam os indutores da diferenciação dos osteoclastos M-CSF e RANKL. A diferenciação final dos osteoblastos ocorre após ficarem presos na matriz óssea secretada por eles, se diferenciando em osteócitos. Essas células expressam os fatores da osteoclastogênese RANKL e M-CSF, como também seu inibidor, TGF- β . Além desses fatores os osteócitos liberam a esclerostina, inibidor da ativação dos osteoblastos. Essa proteína é inibida pela ação do hormônio PTH, que se liga à esclerostina e inibe sua atividade, permitindo que a atividade dos osteoblastos ocorra. M-CSF: Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos; RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B; TGF- β : Fator de crescimento transformante beta; PTH: Paratormônio. Fonte: Autoria própria. Criado com: Biorender.com

Os osteoclastos são células terminalmente diferenciadas a partir da linhagem mielóide. Essas células liberam íons cloro (Cl^-) que causa a desmineralização da matriz óssea, já a matriz orgânica é degradada pela catepsina-K, metaloproteínases e outras proteases, também expressas liberadas pelos osteoclastos (ONO; NAKASHIMA, 2018). A proliferação e diferenciação dessas células ocorre mediada em especial por M-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos) e RANKL. A principal função do M-CSF é manter as células da linhagem mielóide viáveis e induzir sua proliferação, enquanto RANKL se liga a seu receptor e participa da diferenciação final dessas células em osteoclastos (XIAO et al., 2015).

Os osteoblastos são células derivadas de células-tronco mesenquimais/estromais (CTMs), e sua maturação ocorre mediada e controlada principalmente por fatores de transcrição, em especial pelo Runx2, que é essencial para que ocorra essa diferenciação, sendo este o primeiro passo. Essas células secretam proteínas que compõem a matriz óssea como a osteocalcina, colágeno I e sialoproteínas ósseas I e II. Além disso, também são responsáveis pela mineralização da matriz (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Dentre os fatores que auxiliam na proliferação e diferenciação está a via Wnt/ β -catenina, que juntamente com as BMPs induzem a expressão de Runx2. Sendo assim essa via desempenha um papel de suma importância na formação óssea, participando da promoção do aumento da densidade óssea e da resistência do tecido (FLORENCIO-SILVA et al., 2015; UKON et al., 2019). Essa via participa ainda na regulação de osteoprotegerina (OPG), que atua inibindo a diferenciação dos osteoclastos mediada por RANKL, sendo um antagonista dessa proteína (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Dentre os inibidores da via Wnt/ β -catenina estão a Esclerostina e o Dickkopf-1 (DKK-1), que reduzem a expressão de Runx2, reduzindo consequentemente a diferenciação dos osteoblastos (UKON et al., 2019).

Já os osteócitos são as células derivadas da diferenciação final dos osteoblastos e são células vivas dentro da matriz óssea, atuando na regulação da homeostase do tecido. Durante o estado basal da remodelação óssea, essas células secretam a esclerostina e a DKK-1, que vão inibir a sinalização da via Wnt, e dessa forma, inibir a formação óssea nesse estado (TU et al., 2015). A esclerostina é inibida pela ação do PTH (paratormônio), e assim ocorre o estímulo para a formação da matriz óssea. Os osteócitos também secretam TGF- β (Fator de crescimento transformante tipo beta), que inibe a osteoclastogênese. Quando os osteócitos são estimulados passam a secretar fatores pró-osteoclastogênese como o M-CSF e RANKL, juntamente com os osteoblastos, para dessa forma estimular a remodelação óssea. Esse

processo ocorre dentro de uma região de reabsorção, chamado unidade de remodelamento ósseo ou unidade multicelularbásica, um microambiente para a remodelação (JÄHN; BONEWALD, 2012).

Quando há o desequilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea, produto da atividade dos osteoblastos e osteoclastos, respectivamente, o resultado é a perda na massa do tecido ósseo e degeneração da microarquitetura trabecular óssea (CHEN et al., 2017; BARTELT et al., 2018). Assim, o preenchimento dos poros causados pela reabsorção fica incompleto, o que pode gerar uma progressiva diminuição da densidade óssea e levar ao desenvolvimento da osteoporose (SEGREDO-MORALES et al., 2017) (Figura 2).

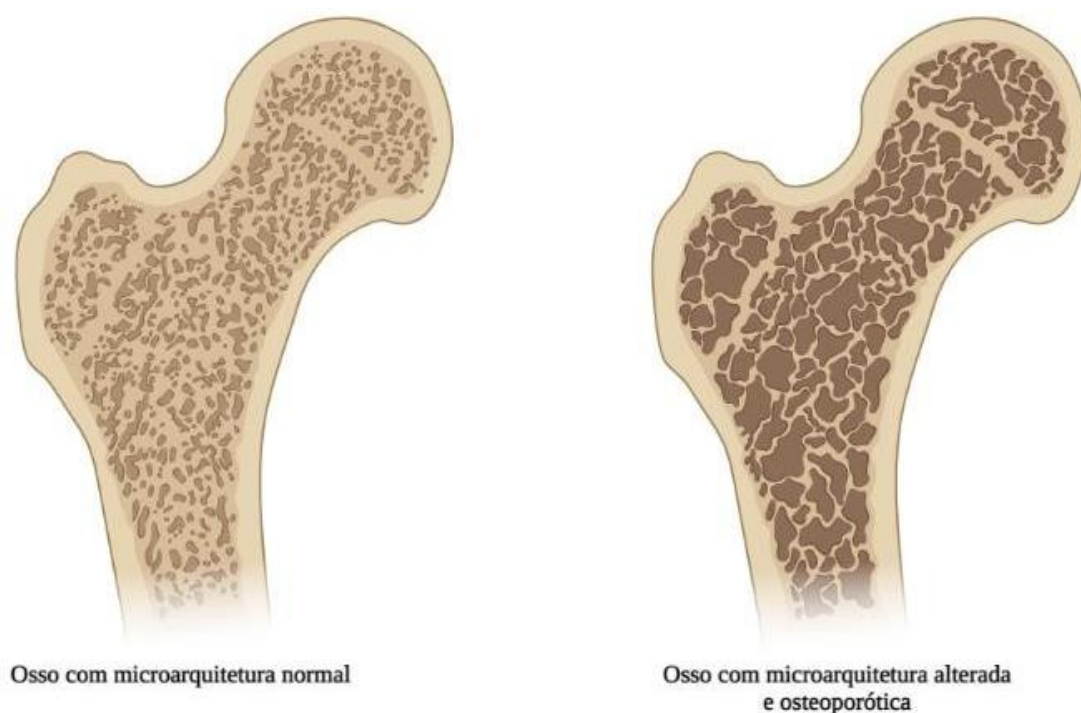


Figura 2. Representação do fêmur comparando a microarquitetura entre o tecido ósseo normal e osteoporótico onde é possível observar redução na espessura e número de trabéculas ósseas. Fonte: Autoria própria. Criado com: Biorender.com

A doença pode ser dividida em osteoporose primária e secundária. A osteoporose primária é comumente causada pelo desequilíbrio de vias associadas com a regulação do metabolismo ósseo, que irão alterar o equilíbrio entre a ação dos osteoclastos e osteoblastos (ASAFO-ADJEI et al., 2016). Está relacionada com a queda na produção de testosterona nos homens e com as alterações hormonais geradas pela menopausa nas mulheres, já que o estrogênio possui papel muito importante na manutenção da homeostase do tecido ósseo.

O 17 β -estradiol (E2) se liga ao receptor de estrogênio nas CTMs, estimula sua diferenciação em osteoblastos e aumenta a formação óssea ao elevar a expressão de fatores peptídicos de crescimento como BMPs, TGF- β 1, IGF-1 e IGF-2 (fatores de crescimento semelhantes à insulina tipo 1 e 2,

respectivamente) (IRMAK et al., 2014). Além de atuar na diferenciação e proliferação dos osteoblastos, ele também inibe a apoptose dessas células. Por outro lado, inibe a diferenciação dos osteoclastos ao suprimir a expressão de RANKL e outras citocinas envolvidas na osteoclastogênese, estimula ainda a síntese de osteoprotegerina, um dos inibidores de RANKL (KHOSLA; OURSLER; MONROE, 2012). Dessa forma, o estrogênio tem papel fundamental no metabolismo ósseo e sua deficiência pode levar a redução na densidade óssea, resultando em um quadro osteoporótico (SAFARI; DAVARAN; AGHANEJAD, 2021).

Já a osteoporose secundária tem como causas doenças inflamatórias e metabólicas, deficiências nutricionais e uso prolongado de drogas como glicocorticóides (YU; WANG, 2016), que podem suprimir a osteogênese promovida pelos osteoblastos (CORTET, 2011). Dentre as causas da osteoporose secundária, o uso contínuo de glicocorticóides é o mais comum (ZAVATTA; CLARKE, 2021). Esses medicamentos são utilizados para o tratamento de diversas doenças, incluindo alergias, inflamações e doenças autoimunes. É observado um aumento na reabsorção óssea nos primeiros 12 a 18 meses do tratamento. Após esse período a reabsorção fica estável e normal, contudo, a redução na formação óssea é contínua e persistente ao longo do tempo de tratamento, sendo que a apoptose de osteoblastos e osteócitos aumenta com o tratamento prolongado. Isso causa uma redução na DMO e na qualidade dos ossos do paciente, levando a um aumento no risco de fraturas. Esses medicamentos elevam a excreção de cálcio e fósforo pelo sistema urinário, também levam a uma redução na absorção de cálcio pelo intestino, resultando no aumento de PTH na tentativa de corrigir o desequilíbrio nos níveis de cálcio (ZAVATTA; CLARKE, 2021), prejudicando o tecido ósseo. Além disso, os glicocorticóides inibem IGF-1, que participa na formação óssea ao promover a síntese de colágeno I, resultando na degradação do colágeno e apoptose dos osteoblastos (NOH; YANG; JUNG, 2020).

1.2.1 Fraturas

As principais características da osteoporose são a fragilidade dos ossos e o aumento do risco de fraturas. O reparo de uma fratura pode ser dividido em três etapas: 1- a formação do calo, em que ocorre a inflamação e o recrutamento de células; 2- o reparo da fratura, momento em que ocorre a diferenciação celular; 3- a formação óssea, a restauração, na qual há a remodelação óssea (DUMIC-CULE et al., 2018).

Na primeira etapa o hematoma no local da lesão é formado por agregação plaquetária e matriz de fibrina, as células inflamatórias são recrutadas e liberam diversos fatores peptídicos de crescimento e citocinas, que iniciam o processo de reparo. Entre as principais moléculas dessa cascata estão BMPs, VEGF-1, PDGF, TGF- β e proteínas estimuladoras da via Wnt (AI-AQL et al., 2008). Esses fatores peptídicos de crescimento recrutam CTMs e induzem sua proliferação e consequente liberação de fatores angiogênicos (HANKENSON; GAGNE; SHAUGHNESSY, 2015).

Na segunda etapa do processo de reparo os fatores peptídicos de crescimento induzem a diferenciação das CTMs em condrócitos e osteoblastos para que ocorra a síntese da matriz de

fibrocartilagem e o calo ósseo (MEHTA et al., 2012), além de induzem a mineralização do calo e formação das redes vasculares. Nessa fase as BMPs, TGF- β e VEGF são de suma importância para o reparo da lesão (GERBER et al., 1999).

Na terceira e última etapa, a formação da vascularização é finalizada e ocorre a remodelação do osso recém-formado para um tecido maduro, assim o osso atinge sua função e integridade ótimas. Nessa fase, mais uma vez as BMPs têm grande importância. Além delas o PTH, estrogênio e vitamina D atuam na regulação da ossificação e aumentam a resistência do osso (SCHINDELER et al., 2008).

No entanto, em pessoas com osteoporose o reparo e a regeneração de ossos fraturados estão comprometidos, pois o metabolismo ósseo está alterado. Dessa forma os pacientes apresentam dificuldades na recuperação dessas lesões (SEGREDO-MORALES et al., 2017).

1.2.2 Diagnóstico e fatores de risco

Na grande maioria dos casos, a osteoporose não é diagnosticada até que ocorra a primeira fratura por fragilidade óssea, quando, então, o diagnóstico é feito. Nos pacientes em que isso ainda não ocorreu, a osteoporose pode ser diagnosticada a partir da baixa densidade mineral óssea (DMO). O exame utilizado para determinar essa característica é a densitometria óssea, que utiliza como técnica a absorciometria de raios-X de dupla energia (DXA), com os resultados do paciente sendo comparados a um padrão de referência (KANIS, 2008). Além disso, exames laboratoriais de sangue para determinar a concentração de cálcio, fósforo, ALP e vitamina D também podem auxiliar no diagnóstico do paciente (JOHNSTON; DAGAR, 2020).

Algumas características são fatores de risco para o desenvolvimento dessa enfermidade, entre os quais estão: idade elevada, pós-menopausa para as mulheres, baixo peso corporal, histórico familiar de fraturas no quadril, etnia branca, DMO baixa, artrite reumatóide, deficiência de vitamina D, consumo de bebidas alcoólicas três ou mais vezes por dia, tabagismo, baixa ingestão de cálcio, quedas, imobilização e uso prolongado de medicamentos como glicocorticóides, anticoagulantes, anticonvulsivantes, inibidores da aromatase, quimioterápicos e agonistas do hormônio liberador de gonadotrofinas (COSMAN et al., 2014; JOHNSTON; DAGAR, 2020).

1.2.3 Tratamentos

A osteoporose afeta principalmente idosos, que tem maiores chances de sofrer quedas e, conseqüentemente, fraturas. Para preveni-las, é recomendado que o paciente pratique atividade física regularmente, como caminhada, dança, yoga e pilates por exemplo, pois esses exercícios aumentam a força, a agilidade e o equilíbrio, reduzindo, assim, os riscos de quedas e possíveis fraturas. A suplementação de cálcio e vitamina D também pode reduzir o risco de fraturas, no entanto, seu excesso

pode gerar doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral (AVC) e cálculo renal (COSMAN et al., 2014).

O tratamento também pode ser feito utilizando-se fármacos, os quais se dividem-se, principalmente, em duas classes: aqueles que inibem a reabsorção dos ossos ou antirreabsortivos, e aqueles que aumentam sua formação, os anabólicos (QASEEM et al., 2017). Alguns dos medicamentos disponíveis para o tratamento da osteoporose são os bisfosfonatos (alendronato, risedronato, ibandronato, ácido zoledrônico), moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERMs), denosumab, peptídeos hormonais como a calcitonina, a teriparatida e a abaloparatida, o ranelato de estrôncio e o romosozumab.

1.2.3.1 Tratamentos antirreabsortivos

Os bisfosfonatos (BF) constituem a classe de medicamentos mais utilizada para o tratamento da osteoporose. Eles são análogos químicos do pirofosfato inorgânico e possuem forte afinidade com a hidroxiapatita que compõe a matriz óssea, ligando-se a ela e por isso mantêm sua atividade por um período mesmo após o tratamento ser interrompido. Esses medicamentos podem ser divididos entre os que não possuem e aqueles que possuem nitrogênio em sua molécula. Aqueles que não possuem nitrogênio são a primeira geração de BF e seu mecanismo de ação consiste em induzir a apoptose dos osteoclastos ao inibir a ADP/ATP translocase mitocondrial (LEHENKARI et al., 2002). Já os BF que possuem nitrogênio são mais eficientes tanto em inibir a atividade dos osteoclastos quanto em se ligar a matriz óssea. Eles atuam sobre a via do mevalonato, inibem a prenilação e, conseqüentemente, inibem a reabsorção óssea. Dessa forma, esses medicamentos reduzem o risco de fraturas em diversos locais do corpo como quadril e vértebras (UKON et al., 2019). Contudo entre os efeitos adversos os bisfosfonatos está o aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (WANG et al., 2016), problemas gastrointestinais (HARTLE et al., 2012) e seu uso prolongado está associado ao desenvolvimento de osteonecrose (OTTO et al., 2021).

Uma forma de prevenir o desenvolvimento de osteoporose em mulheres na pós-menopausa é utilizar a terapia de reposição hormonal com estrogênio, contudo essa terapia alongo prazo pode ser prejudicial para a paciente, causando sérios efeitos adversos como problemas cardíacos e aumento no risco de desenvolvimento de tumores de mama e útero (BARRETT-CONNOR et al., 2002). Dessa forma, os SERMs (Moduladores seletivos do receptor de estrogênio) são uma alternativa com melhor custo-benefício, pois estimulam os receptores de estrogênio nas células ósseas sem causar malefícios aos outros sistemas.

Um dos SERMs mais utilizados na terapia para a osteoporose é o raloxifeno, que reduz o remodelamento ósseo ao reduzir a atividade dos osteoclastos, mantendo a atividade dos osteoblastos e dessa forma reduz a incidência de fraturas. Dentre os efeitos adversos desse tratamento estão aumento no risco de eventos tromboembólicos e AVC (HEGDE et al., 2016).

O Denozumab é outro tratamento antirreabsortivo que atua sobre os osteoclastos e é capaz de reduzir o risco de fraturas. Ele é um anticorpo monoclonal que, por circular na corrente sanguínea do paciente, consegue atuar em todo o esqueleto e tem um tempo aproximado de meia vida de 26 dias. Seu mecanismo de ação consiste em se ligar a RANKL e impedir sua atividade, dessa forma o medicamento inibe a diferenciação, atividade e sobrevivência dos osteoclastos, uma vez que RANKL é necessário para esses processos (ANASTASILAKIS et al., 2021). Como consequência, o Denozumab inibe a reabsorção do osso, contudo também reduz toda a remodelação óssea (HUMPHREY et al., 2006) e a qualidade do osso, pois ao inibir os osteoclastos reduz a atividade dos osteoblastos e não ocorre o remodelamento ósseo, mantendo o osso velho (JÄHN-RICKERT et al., 2020). Diferentemente dos BFs que se ligam à matriz óssea, uma vez interrompido o tratamento com denozumab a inibição do RANKL cessa e ocorre uma abrupta mudança na remodelação óssea, com um aumento muito significativo da osteoclastogênese e também da osteoblastogênese, além de elevar a reabsorção óssea. Dessa forma observa-se redução no volume ósseo devido ao aumento no remodelamento ósseo e esse fenômeno é conhecido como efeito rebote no tratamento com denozumab (ZEYTINOGLU; NAAMAN; DICKENS, 2021). O medicamento está ainda associado a problemas gastrointestinais (KUMAGAI; HASUNUMA; PADHI, 2011) e aumento no risco de infecções (TOULIS; ANASTASILAKIS, 2010).

A calcitonina é um hormônio produzido pela tireoide que atua principalmente no epitélio tubular renal e nos osteoclastos. Nos rins causa um aumento na eliminação de cálcio e fosfato, já nos ossos reduz a atividade dos osteoclastos, diferenciação e mobilidade através da inibição da anidrase carbônica II, alterando assim o pH ácido do meio, que é ideal para a atividade dessas células, reduzindo a reabsorção óssea (MASI; BRANDI, 2007). O hormônio administrado exogenamente como medicamento é obtido de uma glândula do salmão e possui diversas formas de administração, sendo parenteral, spray nasal e oral (NAOT; MUSSON; CORNISH, 2019). É um medicamento aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration), contudo é indicado apenas para pacientes que não podem utilizar outras terapias, sendo parte da segunda linha de tratamento para a osteoporose. Entre as reações adversas as mais comuns são problemas gastrointestinais, aumento da diurese, úlcera mucosa nasal (quando utilizado o spray nasal) e dor abdominal. Pode causar hipocalcemia devido a sua ação nos rins e não poder ser utilizado pelos pacientes com alergia a peixe (MCLAUGHLIN; JIALAL, 2020).

1.2.3.2 Tratamentos anabólicos

O hormônio da paratireoide (PTH) é uma proteína secretada pela paratireoide que atua sobre o metabolismo do cálcio através de um receptor presente tanto nos rins quanto nos ossos. Os altos e contínuos níveis de PTH levam ao aumento na reabsorção óssea enquanto a administração intermitente do hormônio promove a renovação e melhora o metabolismo ósseo (HAUSER; ALONSO; RICHES, 2021; MCCLUNG, 2021). A teriparatida é um peptídeo formado pelos primeiros 34 aminoácidos do PTH que ativa a via de Wnt ao se ligar a seu receptor nos osteoblastos e osteócitos. Dessa forma ela

também inibe a expressão de esclerostina (COSMAN; DEMPSTER, 2021). Ao fazer isso, induz o remodelamento ósseo levando a expressão de RANKL e promovendo a atividade dos osteoclastos e a reabsorção óssea. (HAUSER; ALONSO; RICHES, 2021; MCCLUNG, 2021). O tratamento com teriparatida aumenta a DMO e melhora a microarquitetura e a resistência dos ossos, o que diminui o risco de fraturas (ZOFKOVA; BLAHOS, 2017; HAUSER; ALONSO; RICHES, 2021; MCCLUNG, 2021), sendo indicado para pacientes de alto risco. Já a abaloparatida é um peptídeo sintético análogo ao PTH que apresenta uma ação anabólica otimizada. Ela aumenta a densidade óssea, melhora a microarquitetura e a resistência óssea e reduz a ação reabsortiva. Tanto teriparatida quanto abaloparatida podem causar hipercalcemia, sintomas associados a vasodilatação e hipotensão ortostática, como náusea, palpitação e dor de cabeça (COSMAN; DEMPSTER, 2021)

O estrôncio é um mineral naturalmente presente nos ossos, em especial nos ossos recém-mineralizados, e o ranelato de estrôncio (RE) é um dos medicamentos aprovados para o tratamento da osteoporose que possuem dupla atividade, sendo capaz de induzir a diferenciação dos osteoblastos e inibir a atividade dos osteoclastos. O estrôncio induz o aumento da expressão de ALP, osteocalcina e de sialoproteínas ósseas, contudo o mecanismo de ação pelo qual o RE atua ainda não foi completamente elucidado (BONNELLYE et al., 2008). Acredita-se que seja capaz de inibir a reabsorção óssea e a diferenciação dos osteoclastos, além de ser capaz de promover a diferenciação e proliferação dos osteoblastos e aumentar a expressão de colágeno I e induzir a atividade dos osteoblastos (PILMANE et al., 2017). Sendo assim, aumenta a DMO e reduz o risco de fraturas nas vértebras e no quadril (REGINSTER et al., 2008). As reações adversas mais comuns são problemas cardiovasculares, eventos trombóticos, dor de cabeça, diarreia e desconforto gastrointestinal. É contraindicado para pacientes com hipertensão e com problemas cardiovasculares sendo considerado a segunda linha de tratamento para a osteoporose. (PILMANE et al., 2017).

A esclerostina é uma proteína predominantemente expressa pelos osteócitos com a capacidade de inibir a via canônica de Wnt/ β -catenina e, conseqüentemente, inibir a atividade dos osteoblastos e a formação óssea. A proteína, além de inibir a diferenciação e atividade dos osteoblastos ainda induz a apoptose e estimulam a osteoclastogênese (RAUNER et al., 2021). O romosozumab é um anticorpo monoclonal IgG2 anti-esclerostina que liga-se a essa proteína e, ao inibir sua ação, apresenta dupla função no tratamento da osteoporose ao reduzir a reabsorção e estimular a formação da matriz óssea. Ao inibir a esclerostina ele reduz a expressão de RANKL e o desempenho dos osteoclastos, além disso a via Wnt/ β -catenina continua ativa nos osteoblastos e estes mantem sua atividade. Sendo assim, o anticorpo promove o aumento da DMO, a resistência e espessura do osso reduzindo o risco de fraturas osteoporóticas nos pacientes. Seus efeitos adversos são principalmente problemas cardíacos, hipocalcemia e hipersensibilidade na pele no local da aplicação. O romosozumab é contra indicado para pacientes com histórico de infarto do miocárdio e AVC (MCCLUNG, 2021).

Como as drogas antirreabsortivas não tem efeito na regeneração do tecido ósseo, é necessário desenvolver drogas anabólicas para recuperar a massa óssea perdida, tratamento que é essencial para

pacientes com baixa densidade óssea (KIM et al., 2017). Por isso, novos tratamentos estão sendo estudados e uma classe de moléculas com potencial para atuar contra a osteoporose estimulando o aumento da densidade óssea são os fatores peptídicos de crescimento, como as BMPs, o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o VEGF, que atuam na regeneração do osso e na osteogênese (LEE; KIM; RYOO, 2015).

1.2.3.3 Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs)

As BMPs são proteínas pertencentes à superfamília TGF- β que participam da regulação do reparo e formação de ossos e cartilagens, desenvolvimento embrionário, manutenção da homeostase do tecido ósseo durante a idade adulta (CARREIRA et al., 2014a), organogênese, apoptose, proliferação e diferenciação celular, quimiotaxia, reparo de vários tipos de tecido (DUCY; KARSENTY, 2000), assim como na biologia de células-tronco. São os fatores peptídicos de crescimento osteoindutivos mais potentes, sendo muito estudados devido ao seu papel na regulação da formação de novos ossos (KIM et al., 2017). São expressas por diversos tipos de células e tecidos, sendo que, nos ossos, as principais são as células osteoprogenitoras, osteoblastos, plaquetas e células endoteliais. Após serem secretadas, estas proteínas são armazenadas pela matriz extracelular e liberadas durante o processo de reparo e remodelação (CARREIRA et al., 2014b). Em seu mecanismo de ação, estas proteínas se ligam a seus receptores, os quais ativam os receptores de proteínas quinases, as quais irão catalisar a fosforilação das proteínas Smad, que, por sua vez, são translocadas para o núcleo, onde irão promover o aumento da expressão de genes que codificam fatores osteoblastos-específicos, como o Runx2, a osteocalcina e a fosfatase alcalina (BAE et al., 2017) (Figura 3). O efeito regulatório das BMPs depende do tipo de célula-alvo, o estágio de diferenciação, sua concentração e interação com as demais proteínas no local (GROENEVELD; BURGER, 2000).

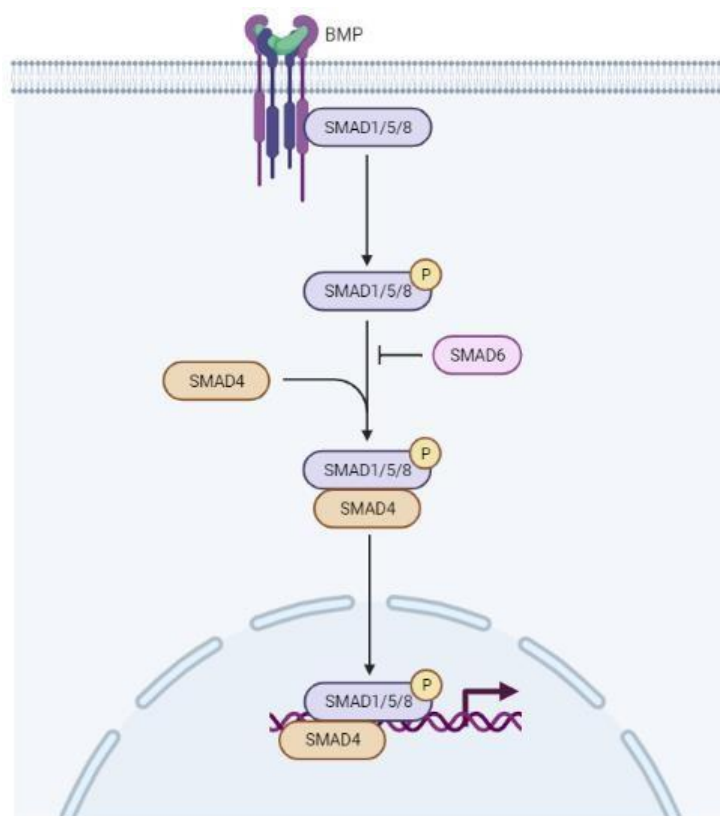


Figura 3 - Via canônica das BMPs através das proteínas Smad. Fonte: Biorender.com

As BMPs constituem um dos mais eficientes fatores peptídicos de crescimento na recuperação de fraturas, não-união, fusão espinhal e implantes dentais (CARREIRA et al., 2014b). Elas induzem a diferenciação das células-tronco mesenquimais na linhagem osteoblástica e, dessa forma, induzem a ossificação endocondral/intramembranosa e a condrogênese (LEBOY et al., 2001). Há evidências da eficácia em acelerar a regeneração do tecido ósseo e recuperação de lesões em estudos *in vitro*, *in vivo* e pré-clínicos (CARREIRA et al., 2014a; KIM et al., 2017; SEGREDO-MORALES et al., 2017).

Essas proteínas, em conjunto com demais fatores de crescimento, formam um sistema de sinalização celular complexo, tendo um importante papel na manutenção da integridade e do reparo ósseo (CARREIRA et al., 2014a).

A BMP-7 é uma proteína homodimérica com 139 resíduos de aminoácidos em cada dímero e peso molecular aproximado de 36 kDa. Assim como as demais BMPs, a BMP-7 é uma proteína básica com ponto isoelétrico de 8,1. Possui baixa solubilidade em pH fisiológico e várias regiões hidrofóbicas em sua superfície, além de tempo de meia vida reduzido (EL BIALY; JISKOOT; REZA NEJADNIK, 2017).

As BMPs 2 e 7 são especialmente estudadas para incorporar sistemas de reparo e *scaffolds* por sua grande eficácia na indução da formação de ossos (SEGREDO-MORALES et al., 2017). BMPs recombinantes já são utilizadas em aplicações ortopédicas e cirurgias maxilofaciais, tornando-se uma terapia adjuvante nos tratamentos de algumas doenças musculoesqueléticas. A rhBMP-2 (Dibotermi-

α) foi aprovada pela FDA, sendo comercializada como InductOS[®] e InFUSE[®] (CARREIRA et al., 2014a), e a rhBMP-7, com o nome comercial de Osigraft, foi aprovada para tratamento de fraturas não-união na tíbia (DUMIC-CULE et al., 2018).

Por ter atividade indutora da diferenciação dos osteoblastos, essas proteínas induzem a formação óssea e estimulam a migração de células-tronco mesenquimais, possuindo, portanto, potencial terapêutico no reparo de fraturas osteoporóticas (SEGREDO-MORALES et al., 2017), além de atuar na Engenharia de Tecidos, acelerando e aumentando a osteointegração. A combinação entre BMPs e outros fatores de crescimento, como a PDGF, pode se tornar uma opção de tratamento para distúrbios que afetem o tecido ósseo (CARREIRA et al., 2014a).

1.2.3.4 Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)

O PDGF é uma proteína quimioatrativa, mitogênica para tecidos de origem mesodérmica e agente de ancoragem vascular, possuindo importante papel na cicatrização de ferimentos nos ossos e tecidos moles (CAPLAN; CORREA, 2011). Promove ainda o desenvolvimento do sistema nervoso central atuando juntamente com fatores embrionários e de desenvolvimento, para a promoção da organogênese (ANDRAE; GALLINI; BETSHOLTZ, 2008).

A proteína PDGF é produzida por diversos tipos celulares, incluindo plaquetas, macrófagos, células epiteliais, fibroblastos, mioblastos, neurônios, células-tronco mesenquimais, condrócitos, osteoblastos e osteoclastos (GRAHAM et al., 2009). Existem cinco formas diméricas desta proteína, que são: PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC e PDGF-DD, as quais respondem a dois receptores distintos, os receptores α e β . Entre elas, o PDGF-BB consegue se ligar a todas as isoformas conhecidas de seu receptor (HOLLINGER et al., 2008a), e, além disso, ativa principalmente os osteoblastos, em relação às demais células (CENTRELLA et al., 1991).

Esse fator peptídico de crescimento está presente em várias etapas do processo de reparo de fraturas ao promover a infiltração de células progenitoras mesenquimais e angiogênicas além de regular as respostas condrogênicas e osteogênicas. PDGF-BB está também envolvido na regulação da quimiotaxia dos osteoblastos, proliferação e diferenciação, resultando na rápida formação do osso (HOLLINGER et al., 2008a; CAPLAN; CORREA, 2011). É um fator angiogênico que conecta a angiogênese e osteogênese, por isso possui grande importância tanto na modelagem do osso na região do periosteio quando para a remodelação óssea trabecular, e, ademais, sua inibição gera perda de massa óssea trabecular e cortical (XIE et al., 2014). O PDGF-BB aumenta, ainda, a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂), que apresenta um efeito anabólico no metabolismo ósseo, demonstrando que essa proteína atua sobre o metabolismo desse tecido, assim como em seu reparo (SHARP et al., 1991). Por isso, o PDGF possui grande relevância clínica no contexto da regeneração e reparo do tecido ósseo.

Estudos com células humanas confirmam o efeito mitogênico do PDGF-BB sobre os osteoblastos (BATEMAN et al., 2005), uma vez que também possui efeito quimiotático nas células

progenitoras mesenquimais humanas, células progenitoras mesenquimais diferenciadas osteoblastos primários (FIEDLER et al., 2002). Além desse papel, o PDGF secretado pelos osteoblastos pode estar relacionado à osteoclastogênese e à função de osteoclastos (BARTELT et al., 2018). PDGF estimula a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos em células derivadas do osso ilíaco esponjoso humano, aumentando a atividade de enzimas marcadoras da atividade osteoclástica como a fosfatase ácida total (ZHANG; CHEN; JIN, 1998). Esse efeito nos osteoclastos, juntamente com a ação proliferativa nos osteoblastos, demonstra o importante papel dessa proteína na remodelação do tecido e no reparo de fraturas (LI et al., 2017).

Como existe uma relação direta entre a expressão de PDGF e a diferenciação osteogênica (XIE et al., 2014), ele é utilizado na regeneração e reparo de fraturas ósseas ao ser secretado no osso cortical e direcionar sua formação (FRIEDLAENDER et al., 2013). Estudos demonstram que a expressão precoce e elevada de PDGF pós-fratura estimula a recuperação ao aumentar a diferenciação de osteoblastos, aumentando a mineralização do calo (WALIA et al., 2018).

Diversos trabalhos sugerem o efeito proliferativo do PDGF sobre o tecido ósseo, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. McCarthy e colaboradores relataram que o PDGF eleva a produção de osteoprotegerina (OPG) em um estudo utilizando células de osteosarcoma e o estroma da medula óssea humana e pré-osteoblastos de camundongos. Como mencionado anteriormente, essa proteína é inibidora da osteoclastogênese e da reabsorção óssea, e o aumento de sua concentração eleva a massa óssea, enquanto a diminuição pode levar à osteoporose (MCCARTHY et al., 2009). Já Gruber e colegas, utilizando células bovinas, demonstraram que o PDGF tem efeito mitogênico dose-dependente. Assim, durante o reparo da fratura, o PDGF secretado no local pode atuar sinergicamente levando à proliferação do periosteó, uma etapa importante durante o processo de reparo de fraturas (GRUBER et al., 2003). Um estudo em osteoblastos isolados de fragmentos de osso trabecular humano mostrou que PDGF possui um efeito anabólico nesse tecido, promovendo a proliferação (KIM; VALENTINI, 1997).

Entre as patologias que afetam negativamente a recuperação de fraturas, tanto em camundongos quanto em humanos, está o diabetes mellitus (KAGEL; EINHORN, 1996). Um estudo utilizando fraturas de camundongos diabéticos observou que esses animais produzem menos PDGF no calo da fratura indicando uma correlação positiva entre a proliferação celular e a concentração da proteína (TYNDALL et al., 2003).

Durante o processo de recuperação de fraturas em modelos animais e humanos ocorre um aumento na expressão de PDGF nos osteoblastos do osso recém formado, sugerindo que este fator desempenha uma função na proliferação osteoblástica *in vivo* (FUJII et al., 1999; HELDIN; ERIKSSON; OSTMAN, 2002; ANDRAE; GALLINI; BETSHOLTZ, 2008). Um estudo com tíbias fraturadas de camundongos revelou que PDGF está relacionado à estimulação da formação óssea, pois foi detectada nos osteoblastos que recobrem o osso trabecular formado após a fratura, e, além disso, o receptor β de PDGF foi expresso em altos níveis pelos osteoblastos nos locais

de ossificação (FUJII et al., 1999).

Outros trabalhos mostraram que o PDGF possui ação direta e indireta sobre o aumento no remodelamento ósseo no tecido periodontal humano (HELDIN; ERIKSSON; OSTMAN, 2002; SARMENT et al., 2006), tendo sido encontrado no osteóide secretado por osteoblastos em fraturas humanas (ANDREW et al., 1995). Experimentos utilizando coelhos mostraram que a aplicação exógena de PDGF-BB estimula a recuperação de ossos fraturados, melhorando o tempo de reparo da fratura e aumentando a taxa de diferenciação osteogênica. Além disso, a força do osso tratado não apresentou diferença estatística quando comparado com o osso contralateral não fraturado, enquanto os controles tinham ossos mais fracos em relação ao contralateral (NASH et al., 1994).

Duas formas da proteína recombinante humana PDGF-BB foram aprovadas pela FDA e já são empregados clinicamente. O GEM 21S[®] Growth-factor Enhanced Matrix (LYNCH Biologics) é utilizado para defeitos ósseos periodontais, sendo a combinação de rhPDGF-BB combinado a uma matriz osteocondutiva β -TCP, e o Regranex[®] gel (Becaplermin) (Janssen- Cilag International), rhPDGF-BB produzido em *Saccharomyces cerevisiae*, para tratamento de úlceras de pele em diabéticos (HOLLINGER et al., 2008a). Por ser efetivo no reparo de doenças musculoesqueléticas e periodontais, o PDGF-BB pode ser útil no tratamento de osteoporose (GRAHAM et al., 2009).

Pountos e colaboradores demonstraram que o uso individual de BMP-7 e PDGF-BB aumentou a proliferação de CTM e possibilitou a diferenciação osteogênica, promovendo a regeneração óssea em modelo de CTM isoladas do osso trabecular de pacientes com osteoporose (POUNTOS et al., 2010).

Dessa forma, a utilização conjunta dessas proteínas em um modelo animal osteoporótico pode promover a recuperação do tecido afetado em um modelo *in vivo* e resultar em uma possível regressão ou atenuação da doença.

Dentre os diversos modelos de estudo de doenças, os modelos animais estão entre os mais empregados para avaliar os efeitos sistêmicos de novas terapias. Eles são criados com o objetivo de mimetizar uma doença ou condição clínica e assim permitir seu estudo. Um dos principais modelos animais de osteoporose tipo I é representado por ratos fêmeas ooforectomizadas, que passam por um processo de retirada cirúrgica dos ovários e mimetizam a perda de massa óssea induzida pela queda das concentrações de estrogênio, manifestando, clinicamente, os sintomas da doença (YOUSEFZADEH et al., 2020).

JUSTIFICATIVA

Considerando o grande número de casos de osteoporose no Brasil e no mundo, seu grande impacto na morbidade e mortalidade dos pacientes, a grande dificuldade de reparo e regeneração de fraturas osteoporóticas, assim como os altos custos ao sistema de Saúde Pública, é de suma importância encontrar formas alternativas e inovadoras de tratamento capazes de fortalecer os ossos dos pacientes, prevenir fraturas e promover o reparo do tecido de forma mais rápida e eficaz. Os fatores peptídicos de

crescimento PDGF-BB e BMP-7 possuem um papel importantíssimo na regulação da formação óssea e na regeneração desse tecido. Dessa forma, essas proteínas são candidatas potenciais à atuarem no tratamento da osteoporose, uma vez que são capazes de estimular a formação óssea e promover o aumento da densidade do tecido, tornando-o mais robusto e menos propenso a fraturas.

2 CONCLUSÃO

Após 100 dias da cirurgia de ooforectomia, os animais apresentaram redução na densidade e no volume ósseos, além de aumento na concentração de fosfatase alcalina, presença de número elevado de adipócitos intramedulares e redução expressiva das trabéculas, indicando estado osteoporótico e o estabelecimento do modelo de osteoporose. O tratamento com as proteínas recombinantes de forma sistêmica, por cinco semanas, foi promissor para BMP-7 e PDGF-BB+BMP-7 com duas aplicações semanais, utilizando as doses de 30 µg/kg de BMP-7 e 20 µg/kg de PDGF-BB, totalizando, respectivamente, 22% e 26% de aumento da fração do volume ósseo. Além disso, o medicamento Ácido Zoledrônico, utilizado como controle positivo neste estudo, também apresentou bons resultados, especialmente na análise histomorfológica.

Espera-se com este trabalho contribuir com uma nova e efetiva opção de tratamento a fim de aumentar a qualidade de vida dos indivíduos afetados pela osteoporose.

REFERÊNCIAS

ADACHI, J. D. et al. The Impact of Incident Vertebral and Non-Vertebral Fractures on Health Related Quality of Life in Postmenopausal Women. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 3, p. 11, abr. 2002.

AI-AQL, Z. S. et al. Molecular Mechanisms Controlling Bone Formation during Fracture Healing and Distraction Osteogenesis. **Journal of dental research**, v. 87, n. 2, p. 107–118, fev. 2008.

ÅKESSON, K.; MITCHELL, P. Capture a fratura. p. 1–28, 2012. Disponível em: <www.iofbonehealth.org%0A>.

ANASTASILAKIS, A. D. et al. Denosumab Discontinuation and the Rebound Phenomenon: A Narrative Review. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 1, p. 152, 2021.

ANDRAE, J.; GALLINI, R.; BETSHOLTZ, C. Role of Platelet-Derived Growth Factors in Physiology and Medicine. **Genes & development**, v. 22, n. 10, p. 1276–1312, maio 2008.

ANDREW, J. G. et al. Platelet-Derived Growth Factor Expression in Normally Healing Human Fractures. **Bone**, v. 16, n. 4, p. 455–460, abr. 1995.

ARAÚJO, D. V.; OLIVEIRA, J. H. A. de; BRACCO, O. L. Custo da fratura osteoporótica de fêmur no sistema suplementar de saúde brasileiro. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 6, p. 897–901, 2005.

ASAFO-ADJEI, T. A. et al. Advances in Controlled Drug Delivery for Treatment of Osteoporosis. **Current Osteoporosis Reports**, v. 14, n. 5, p. 226–238, 2016.

ASTUDILLO, P. et al. Increased Adipogenesis of Osteoporotic Human-Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Characterizes by Impaired Leptin Action. **Journal of cellular biochemistry**, v. 103, n. 4, p. 1054–1065, mar. 2008.

AZIZIYEH, R. et al. The Burden of Osteoporosis in Four Latin American Countries: Brazil, Mexico, Colombia, and Argentina. **Journal of medical economics**, v. 22, n. 7, p. 638–644, jul. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30835577>>.

AZZI, C. M. G.; NISHIYAMA, A. C. O. C. **Desenvolvimento de um modelo animal para osteoporose induzido por ooforectomia em rato fêmea nude (Rowett)**. 2017. Universidade de São Paulo, 2017. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10132/tde-19012018-090320/>>.

BAE, S. J. et al. Acceleration of osteoblast differentiation by a novel osteogenic compound, DMP-PYT, through activation of both the BMP and Wnt pathways. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-08190-9>>.

BALOĞLU, M.; GÖKALP ÖZKORKMAZ, E. Biochemical and immunohistochemical investigations on bone formation and remodelling in ovariectomised rats with tamoxifen citrate administration. **Folia Morphologica (Poland)**, v. 78, n. 4, p. 789–797, 2019.

BARRETT-CONNOR, E. et al. Raloxifene and Cardiovascular Events in Osteoporotic Postmenopausal Women: Four-Year Results from the MORE (Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation) Randomized Trial. **JAMA**, v. 287, n. 7, p. 847–857, fev. 2002.

BARTELT, A. et al. Lrp1 in osteoblasts controls osteoclast activity and protects against osteoporosis by limiting PDGF-RANKL signaling. **Bone Research**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2018.

BATEMAN, J. et al. Platelet-Derived Growth Factor Enhancement of Two Alloplastic Bone Matrices. **Journal of periodontology**, v. 76, n. 11, p. 1833–1841, nov. 2005.

BAYER, E. A.; FEDORCHAK, M. V.; LITTLE, S. R. The Influence of Platelet-Derived Growth Factor and Bone Morphogenetic Protein Presentation on Tubule Organization by Human Umbilical Vascular Endothelial Cells and Human Mesenchymal Stem Cells in Coculture. **Tissue Engineering - Part A**, v. 22, n. 21–22, p. 1296–1304, 2016.

BLACK, D. M. et al. Once-Yearly Zoledronic Acid for Treatment of Postmenopausal Osteoporosis. **The New England journal of medicine**, v. 356, n. 18, p. 1809–1822, maio 2007.

BONNELYE, E. et al. Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. **Bone**, v. 42, n. 1, p. 129–138, 2008.

BORGHESE, C. et al. Self-assembling nanoparticles encapsulating zoledronic acid inhibit mesenchymal stromal cells differentiation, migration and secretion of proangiogenic factors and their interactions with prostate cancer cells. **Oncotarget; Vol 8, No 26**, 2017. Disponível em: <<https://www.oncotarget.com/article/17216/text/>>.

BURGE, R. et al. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005–2025. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 3, p. 465–475, 2007.

CAPLAN, A. I.; CORREA, D. PDGF in bone formation and regeneration: New insights into a novel mechanism involving MSCs. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 29, n. 12, p. 1795–1803, 2011.

CARLSSON, C.; WEISBROD, S. Ossos, Articulações, Tendões e Ligamentos. In:

ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. (Ed.). **Bases da Patologia em Veterinária**. 5º ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ltd, 2013. p. 923–974.

CARREIRA, A. C. et al. Bone Morphogenetic Proteins: Structure, biological function and therapeutic applications. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 561, p. 64–73, 2014a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.07.011>>.

CARREIRA, A. C. et al. Bone morphogenetic proteins: Facts, challenges, and future perspectives.

Journal of Dental Research, v. 93, n. 4, p. 335–345, 2014b.

CECCHI, S.; BENNET, S. J.; ARORA, M. Bone morphogenetic protein-7: Review of signalling and efficacy in fracture healing. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 4, p. 28–34, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jot.2015.08.001>>.

CENTER, J. R. et al. Mortality after All Major Types of Osteoporotic Fracture in Men and Women: An Observational Study. **Lancet (London, England)**, v. 353, n. 9156, p. 878–882, mar. 1999.

CENTRELLA, M. et al. Relative Binding and Biochemical Effects of Heterodimeric and Homodimeric Isoforms of Platelet-Derived Growth Factor in Osteoblast-Enriched Cultures from Fetal Rat Bone. **Journal of cellular physiology**, v. 147, n. 3, p. 420–426, jun. 1991.

CHAN, M. C. et al. Molecular basis for antagonism between PDGF and the TGFB family of signalling pathways by control of miR-24 expression. **EMBO Journal**, v. 29, n. 2, p. 559–573, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.115>>.

CHEN, F. et al. The biological characteristics of sheep umbilical cord mesenchymal stem cells. **Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire**, v. 82, n. 3, p. 216–224, 2018.

CHEN, X. et al. Emodin promotes the osteogenesis of MC3T3-E1 cells via BMP-9/Smad pathway and exerts a preventive effect in ovariectomized rats. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 49, n. 10, p. 867–878, 2017.

CHEN, Y.; HEIMAN, M. L. Increased weight gain after ovariectomy is not a consequence of leptin resistance. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 280, n. 2 43-2, p. 315–322, 2001.

CHUBINSKAYA, S.; HURTIG, M.; RUEGER, D. C. OP-1/BMP-7 in cartilage repair. **International Orthopaedics**, v. 31, n. 6, p. 773–781, 2007.

COMPSTON, J. E.; MCCLUNG, M. R.; LESLIE, W. D. Osteoporosis. **The Lancet**, v. 393, n. 10169, p. 364–376, 2019.

COOPER, C. et al. Incidence of Clinically Diagnosed Vertebral Fractures: A Population-Based Study in Rochester, Minnesota, 1985-1989. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 7, n. 2, p. 221–227, fev. 1992.

CORTET, B. Bone repair in osteoporotic bone: Postmenopausal and cortisone-induced osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 22, n. 6, p. 2007–2010, 2011.

COSMAN, F. et al. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 10, p. 2359–2381, 2014.

COSMAN, F.; DEMPSTER, D. W. Anabolic Agents for Postmenopausal Osteoporosis: How Do You Choose? **Current Osteoporosis Reports**, v. 19, n. 2, p. 189–205, 2021.

DESMYTER, S. et al. The Role of Bone Morphogenetic Protein-7 (Osteogenic Protein-1) in the Treatment of Tibial Fracture Non-Unions. An Overview of the Use in Belgium. **Acta orthopaedica Belgica**, v. 74, n. 4, p. 534–537, ago. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18811040>>.

DIWAN, A. et al. **Bone morphogenetic protein-7 accelerates fracture healing in osteoporotic rats** **Indian Journal of Orthopaedics**, 2013. . Disponível em:

<<http://www.ijoonline.com/text.asp?2013/47/6/540/121569>>.

DUCY, P.; KARSENTY, G. The family of bone morphogenetic proteins. **Kidney International**, v. 57, n. 6, p. 2207–2214, 2000.

DUMIC-CULE, I. et al. Bone morphogenetic proteins in fracture repair. **International orthopaedics**, 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00264-018-4153-y>><<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30219967>>.

EL BIALY, I.; JISKOOT, W.; REZA NEJADNIK, M. Formulation, Delivery and Stability of Bone Morphogenetic Proteins for Effective Bone Regeneration. **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 6, p. 1152–1170, 2017.

EMMANUELLE, N. E. et al. Critical role of estrogens on bone homeostasis in both male and female: From physiology to medical implications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1–18, 2021.

FIEDLER, J. et al. BMP-2, BMP-4, and PDGF-Bb Stimulate Chemotactic Migration of Primary Human Mesenchymal Progenitor Cells. **Journal of cellular biochemistry**, v. 87, n. 3, p. 305–312, 2002.

FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

FRIEDLAENDER, G. E. et al. The role of recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) in orthopaedic bone repair and regeneration. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 19, p. 3384–3390, 2013.

FUJII, H. et al. Expression of Platelet-Derived Growth Factor Proteins and Their Receptor Alpha and Beta MRNAs during Fracture Healing in the Normal Mouse. **Histochemistry and cell biology**, v. 112, n. 2, p. 131–138, ago. 1999.

GAO, S. et al. Zoledronate suppressed angiogenesis and osteogenesis by inhibiting osteoclasts formation and secretion of PDGF-BB. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0179248, 8 jun. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179248>>.

GARNERO, P.; CHRISTGAU, S.; DELMAS, P. D. The bisphosphonate zoledronate decreases type II collagen breakdown in patients with Paget's disease of bone. **Bone**, v. 28, n. 5, p. 461–464, 2001.

GERBER, H. P. et al. VEGF Couples Hypertrophic Cartilage Remodeling, Ossification and Angiogenesis during Endochondral Bone Formation. **Nature medicine**, v. 5, n. 6, p. 623–628, jun. 1999.

GHAG, S. B. et al. Plant Platforms for Efficient Heterologous Protein Production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 1–22, 2021.

GRAHAM, S. et al. Investigating the role of PDGF as a potential drug therapy in bone formation and fracture healing. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 18, n. 11, p. 1633–1654, 2009.

GRIGORYAN, A. V. et al. Changes of Serum Concentrations of Alkaline Phosphatase and Metalloproteinase-9 in an Ovariectomized Wistar Rat Model of Osteoporosis. **Journal of Biomedical and Clinical Research**, v. 10, n. 1, p. 32–36, 2017.

GROENEVELD, E. H.; BURGER, E. H. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 142, n. 1, p.

9–21, 2000.

GRUBER, R. et al. Platelets Are Mitogenic for Periosteum-Derived Cells. **Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 21, n. 5, p. 941–948, set. 2003.

GULLBERG, B.; JOHNELL, O.; KANIS, J. A. World-Wide Projections for Hip Fracture. **Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA**, v. 7, n. 5, p. 407–413, 1997.

HAK, D. J. et al. Recombinant human BMP-7 effectively prevents non-union in both young and old rats. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 24, n. 1, p. 11–20, 2006.

HANKENSON, K. D.; GAGNE, K.; SHAUGHNESSY, M. Extracellular Signaling Molecules to Promote Fracture Healing and Bone Regeneration. **Advanced drug delivery reviews**, v. 94, p. 3–12, nov. 2015.

HARDING, A. K. et al. Manipulating the anabolic and catabolic response in bone graft remodeling: Synergism by a combination of local BMP-7 and a single systemic dosis of zoledronate. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 26, n. 9, p. 1245–1249, 2008.

HARTLE, J. E. et al. Bisphosphonate Therapy, Death, and Cardiovascular Events among Female Patients with CKD: A Retrospective Cohort Study. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**, v. 59, n. 5, p. 636–644, maio 2012.

HATA, K. et al. Differential Roles of Smad1 and P38 Kinase in Regulation of Peroxisome Proliferator-Activating Receptor Gamma during Bone Morphogenetic Protein 2-Induced Adipogenesis. **Molecular biology of the cell**, v. 14, n. 2, p. 545–555, fev. 2003.

HAUSER, B.; ALONSO, N.; RICHES, P. L. Review of Current Real-World Experience with Teriparatide as Treatment of Osteoporosis in Different Patient Groups. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 7, p. 1403, 2021.

HEGDE, V. et al. Effect of osteoporosis medications on fracture healing. **Osteoporosis International**, v. 27, n. 3, p. 861–871, 2016.

HELBIG, L. et al. Bone morphogenetic proteins - 7 and - 2 in the treatment of delayed osseous union secondary to bacterial osteitis in a rat model. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2018.

HELDIN, C.-H.; ERIKSSON, U.; OSTMAN, A. New Members of the Platelet-Derived Growth Factor Family of Mitogens. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 398, n. 2, p. 284–290, fev. 2002.

HERNLUND, E. et al. Osteoporosis in the European Union: Medical Management, Epidemiology and Economic Burden. A Report Prepared in Collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). **Archives of osteoporosis**, v. 8, n. 1, p. 136, 2013.

HOLLINGER, J. O. et al. Recombinant Human Platelet-Derived Growth Factor: Biology and Clinical Applications. **The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume**, v. 90, n. Suppl 1, p. 48–54, 2008a. Disponível em:

<<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00004623-200802001-00010>>.

HOLLINGER, J. O. et al. Accelerated Fracture Healing in the Geriatric, Osteoporotic Rat with Recombinant Human Platelet-Derived Growth Factor-BB and an Injectable Beta-Tricalcium Phosphate/Collagen Matrix. **Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 26, n. 1, p. 83–90, jan. 2008b.

HOROWITZ, M. C. et al. Bone Marrow Adipocytes. **Adipocyte**, v. 6, n. 3, p. 193–204, jul. 2017.

HU, L. et al. Mesenchymal stem cells: Cell fate decision to osteoblast or adipocyte and application in osteoporosis treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, 2018.

HU, Y. et al. RANKL from Bone Marrow Adipose Lineage Cells Promotes Osteoclast Formation and Bone Loss. **EMBO reports**, p. e52481, jun. 2021.

HUMPHREY, E. L. et al. Effects of Dissociated Glucocorticoids on OPG and RANKL in Osteoblastic Cells. **Bone**, v. 38, n. 5, p. 652–661, maio 2006.

IRMAK, G. et al. Sustained Release of 17 β -Estradiol Stimulates Osteogenic Differentiation of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells on Chitosan-Hydroxyapatite Scaffolds. **Cells, tissues, organs**, v. 199, n. 1, p. 37–50, 2014.

JÄHN-RICKERT, K. et al. Elevated Bone Hardness Under Denosumab Treatment, With Persisting Lower Osteocyte Viability During Discontinuation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, n. May, p. 1–13, 2020.

JÄHN, K.; BONEWALD, L. F. Bone Cell Biology: Osteoclasts, Osteoblasts, Osteocytes. **Pediatric Bone**, p. 1–8, 2012.

JIANG, L. et al. The Effect of MMP-2 Inhibitor 1 on Osteogenesis and Angiogenesis During Bone Regeneration. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, n. January, p. 1–16, 2021.

JOHNELL, O.; KANIS, J. A. An Estimate of the Worldwide Prevalence and Disability Associated with Osteoporotic Fractures. **Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA**, v. 17, n. 12, p. 1726–1733, dez. 2006.

JOHNSTON, C. B.; DAGAR, M. Osteoporosis in Older Adults. **Medical Clinics of North America**, v. 104, n. 5, p. 873–884, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mcna.2020.06.004>>.

KAGEL, E. M.; EINHORN, T. a. Alterations of fracture healing in the diabetic condition. **The Iowa orthopaedic journal**, v. 16, p. 147–152, 1996.

KANG, K. Y. et al. Increased serum alkaline phosphatase levels correlate with high disease activity and low bone mineral density in patients with axial spondyloarthritis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 45, n. 2, p. 202–207, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0049017215000517>>.

KANIS, J. A. et al. A Meta-Analysis of Previous Fracture and Subsequent Fracture Risk. **Bone**, v. 35, n. 2, p. 375–382, ago. 2004.

KANIS, J. A. **Assessment of Osteoporosis at the Primary Health Care Level** University of Sheffield: World Health Organisation Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases. [s.l.: s.n.].

KAPTOGE, S. et al. When Should the Doctor Order a Spine X-Ray? Identifying Vertebral Fractures for Osteoporosis Care: Results from the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS). **Journal**

of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research, v. 19, n. 12, p. 1982–1993, dez. 2004.

KHAJURIA, D. K.; RAZDAN, R.; MAHAPATRA, D. R. Description of a New Method of Ovariectomy in Female Rats. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 52, n. 3, p. 462–470, 2012.

KHOSLA, S.; OURSLER, M. J.; MONROE, D. G. Estrogen and the Skeleton. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 23, n. 11, p. 576–581, nov. 2012.

KIM, H. D.; VALENTINI, R. F. Human Osteoblast Response in Vitro to Platelet-Derived Growth Factor and Transforming Growth Factor-Beta Delivered from Controlled-Release Polymer Rods. **Biomaterials**, v. 18, n. 17, p. 1175–1184, set. 1997.

KIM, H. K. et al. Bone-forming peptide-2 derived from BMP-7 enhances osteoblast differentiation from multipotent bone marrow stromal cells and bone formation. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 49, n. 5, p. e328-7, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/emm.2017.40>>.

KLOTZBUECHER, C. M. et al. Patients with Prior Fractures Have an Increased Risk of Future Fractures: A Summary of the Literature and Statistical Synthesis. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 15, n. 4, p. 721–739, abr. 2000.

KOMORI, T. Regulation of Osteoblast Differentiation by Transcription Factors. **Journal of cellular biochemistry**, v. 99, n. 5, p. 1233–1239, dez. 2006.

KUMAGAI, Y.; HASUNUMA, T.; PADHI, D. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Single-Dose Study to Evaluate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Denosumab Administered Subcutaneously to Postmenopausal Japanese Women. **Bone**, v. 49, n. 5, p. 1101–1107, nov. 2011.

LANG, J. et al. Bone turnover markers and novel biomarkers in lung cancer bone metastases. **Biomarkers**, v. 23, n. 6, p. 518–526, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/1354750X.2018.1463566>>.

LASOTA, A.; DANOWSKA-KLONOWSKA, D. Experimental Osteoporosis--Different Methods of Ovariectomy in Female White Rats. **Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku (1995)**, v. 49 Suppl 1, p. 129–131, 2004.

LEBOY, P. et al. Smad-Runx Interactions during Chondrocyte Maturation. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, v. 83-A Suppl, n. Pt 1, p. S15-22, 2001.

LEE, Z. H.; KIM, H.-J.; RYOO, H. M. A Novel Osteogenic Activity of Suberoylanilide Hydroxamic Acid Is Synergized by BMP-2. **Journal of bone metabolism**, v. 22, n. 2, p. 51–56, maio 2015.

LEHENKARI, P. P. et al. Further Insight into Mechanism of Action of Clodronate: Inhibition of Mitochondrial ADP/ATP Translocase by a Nonhydrolyzable, Adenine-Containing Metabolite. **Molecular pharmacology**, v. 61, n. 5, p. 1255–1262, maio 2002.

LELOVAS, P. P. et al. The Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research. v. 58, n. 5, p. 424–430, 2008.

LI, D. et al. Platelet-derived growth factor BB enhances osteoclast formation and osteoclast precursor cell chemotaxis. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 35, n. 4, p. 355–365, 14 jul. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00774-016-0773-8>>.

LIPS, P. et al. Quality of Life in Patients with Vertebral Fractures: Validation of the Quality of Life Questionnaire of the European Foundation for Osteoporosis (QUALEFFO). Working Party for Quality of Life of the European Foundation for Osteoporosis. **Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA**, v. 10, n. 2, p. 150–160, 1999.

MARCU, F. et al. The Histopathological Study of Osteoporosis. **Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie**, v. 52, n. 1 Suppl, p. 321–325, 2011.

MASI, L.; BRANDI, M. L. Calcitonin and calcitonin receptors. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 4, n. 2, p. 117–122, 2007.

MATHAVAN, N.; TÄGIL, M.; ISAKSSON, H. Do osteoporotic fractures constitute a greater recalcitrant challenge for skeletal regeneration? Investigating the efficacy of BMP-7 and zoledronate treatment of diaphyseal fractures in an open fracture osteoporotic rat model. **Osteoporosis International**, v. 28, n. 2, p. 697–707, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00198-016-3771-8>>.

MATTHEWS, J. A. et al. Electrospinning of collagen type II: A feasibility study. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 18, n. 2, p. 125–134, 2003.

MCCARTHY, H. S. et al. Platelet-Derived Growth Factor Stimulates Osteoprotegerin Production in Osteoblastic Cells. **Journal of cellular physiology**, v. 218, n. 2, p. 350–354, fev. 2009.

MCCLUNG, M. R. Role of bone-forming agents in the management of osteoporosis. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 33, n. 4, p. 775–791, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40520-020-01708-8>>.

MCLAUGHLIN, M.; JIALAL, I. **Calcitonin**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537269/>>. Acesso em: 5 jun. 2021.

MEHTA, M. et al. Biomaterial Delivery of Morphogens to Mimic the Natural Healing Cascade in Bone. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, n. 12, p. 1257–1276, set. 2012.

MITLAK, B. H. et al. The effect of systemically administered PDGF-BB on the rodent skeleton. **J Bone Miner Res**, v. 11, n. 2, p. 238–247, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8822348>>http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/jbmr.5650110213/asset/5650110213_ft.pdf?v=1&t=il1e55yd&s=b319f4d47c91547ca49ed8cbb3ac270b9f1cda1a>.

MUKAIYAMA, K. et al. Elevation of serum alkaline phosphatase (ALP) level in postmenopausal women is caused by high bone turnover. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 27, n. 4, p. 413–418, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40520-014-0296-x>>.

NAOT, D.; MUSSON, D. S.; CORNISH, J. The activity of peptides of the calcitonin family in bone. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 1, p. 781–805, 2019.

NASH, T. J. et al. Effect of Platelet-Derived Growth Factor on Tibial Osteotomies in Rabbits. **Bone**, v. 15, n. 2, p. 203–208, 1994.

NOH, J. Y.; YANG, Y.; JUNG, H. Molecular mechanisms and emerging therapeutics for osteoporosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 20, p. 1–22, 2020.

OLDKNOW, K. J.; MACRAE, V. E.; FARQUHARSON, C. Endocrine Role of Bone: Recent and Emerging Perspectives beyond Osteocalcin. **The Journal of endocrinology**, v. 225, n. 1, p. R1-19,

abr. 2015.

ONO, T.; NAKASHIMA, T. Recent Advances in Osteoclast Biology. **Histochemistry and cell biology**, v. 149, n. 4, p. 325–341, abr. 2018.

OTTO, S. et al. Infection as an Important Factor in Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ). **Medicina**, v. 57, n. 5, p. 463, 2021.

PENG, Y. et al. Type H blood vessels in bone modeling and remodeling. **Theranostics**, v. 10, n. 1, p. 426–436, 2020.

PILMANE, M. et al. Strontium and strontium ranelate: Historical review of some of their functions. **Materials Science and Engineering C**, v. 78, p. 1222–1230, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.042>>.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 284, n. 5411, p. 143–147, abr. 1999.

POUNTOS, I. et al. The effect of bone morphogenetic protein-2, bone morphogenetic protein-7, parathyroid hormone, and platelet-derived growth factor on the proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from osteoporotic bone. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 24, n. 9, p. 552–556 5p, 2010. Disponível em: <<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=rzh&AN=104917567&site=ehost-live>>.

QASEEM, A. et al. Treatment of low bone density or osteoporosis to prevent fractures in men and women: A clinical practice guideline update from the American college of physicians. **Annals of Internal Medicine**, v. 166, n. 11, p. 818–839, 2017.

RAHMAN, M. M. et al. Secretion of PDGF Isoforms during Osteoclastogenesis and Its Modulation by Anti-Osteoclast Drugs. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 462, n. 2, p. 159–164, 26 jun. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25951977>>.

RAUNER, M. et al. Osteoporosis Treatment with Anti-Sclerostin Antibodies—Mechanisms of Action and Clinical Application. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 4, p. 787, 2021.

REGINSTER, J. Y. et al. Effects of long-term strontium ranelate treatment on the risk of nonvertebral and vertebral fractures in postmenopausal osteoporosis: Results of a five-year, randomized, placebo-controlled trial. **Arthritis and Rheumatism**, v. 58, n. 6, p. 1687–1695, 2008.

SAFARI, B.; DAVARAN, S.; AGHANEJAD, A. Osteogenic potential of the growth factors and bioactive molecules in bone regeneration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 175, p. 544–557, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.052>>.

SAKI, F. et al. Evaluation of Bone Mineral Density in Children with Type i Diabetes Mellitus and Relationship to Serum Levels of Osteopontin. **Drug Research**, v. 67, n. 9, p. 527–533, 2017.

SALAMANNA, F. et al. Link between estrogen deficiency osteoporosis and susceptibility to bone metastases: A way towards precision medicine in cancer patients. **Breast**, v. 41, p. 42–50, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.breast.2018.06.013>>.

SALAZAR, V. S.; GAMER, L. W.; ROSEN, V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 4, p. 203–221, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2016.12>>.

SARMENT, D. P. et al. Effect of rhPDGF-BB on bone turnover during periodontal repair. **Journal of**

Clinical Periodontology, v. 33, n. 2, p. 135–140, 2006.

SCHINDELER, A. et al. Bone Remodeling during Fracture Repair: The Cellular Picture. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 19, n. 5, p. 459–466, out. 2008.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, v. 182, n. 3, p. 311–322, 2000.

SEGREDO-MORALES, E. et al. BMP delivery systems for bone regeneration: Healthy vs osteoporotic population. Review. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 42, p. 107–118, 2017.

SHARP, J. D. et al. Molecular Cloning and Expression of Human Ca(2+)-Sensitive Cytosolic Phospholipase A2. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 23, p. 14850–14853, ago. 1991.

SI, J. et al. Osteopontin in Bone Metabolism and Bone Diseases. **Medical Science Monitor**, v. 26, p. 1–9, 2020.

SOLCHAGA, L. A. et al. Safety of recombinant human platelet-derived growth factor-BB in Augment® bone graft. **Journal of Tissue Engineering**, v. 3, n. 1, p. 1–6, 2012.

SVEDBOM, A. et al. Osteoporosis in the European Union: A Compendium of Country-Specific Reports. **Archives of osteoporosis**, v. 8, n. 1–2, p. 137, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24113838>>.

TARQUINI, C. et al. Comparison of tissue transglutaminase 2 and bone biological markers osteocalcin, osteopontin and sclerostin expression in human osteoporosis and osteoarthritis. **Amino Acids**, v. 49, n. 3, p. 683–693, 2017.

TOULIS, K. A.; ANASTASILAKIS, A. D. **Increased risk of serious infections in women with osteopenia or osteoporosis treated with denosumab. Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA** England, nov. 2010. .

TU, X. et al. Osteocytes mediate the anabolic actions of canonical Wnt/ β -catenin signaling in bone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 5, p. E478–E486, 2015.

TURNER, A. S. ANIMAL MODELS OF OSTEOPOROSIS - NECESSITY AND LIMITATIONS. 2001.

TYNDALL, W. A. et al. Decreased Platelet Derived Growth Factor Expression during Fracture Healing in Diabetic Animals. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 408, p. 319–330, mar. 2003.

UKON, Y. et al. Molecular-Based Treatment Strategies for Osteoporosis: A Literature Review. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 10, p. 1–24, 2019.

VESTERGAARD, P.; REJNMARK, L.; MOSEKILDE, L. Increased mortality in patients with a hip fracture-effect of pre-morbid conditions and post-fracture complications. **Osteoporosis International**, v. 18, n. 12, p. 1583–1593, 2007.

VIDAL, M. et al. Osteoporosis: a clinical and pharmacological update. **Clinical Rheumatology**, v. 38, n. 2, p. 385–395, 2019.

VIGUET-CARRIN, S.; GARNERO, P.; DELMAS, P. D. The Role of Collagen in Bone Strength. **Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA**, v. 17, n. 3, p. 319–336, 2006.

WALIA, B. et al. A novel role for cathepsin K in periosteal osteoclast precursors during fracture repair. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 2018.

WANG, E. A. et al. Bone Morphogenetic Protein-2 Causes Commitment and Differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 Cells. **Growth factors (Chur, Switzerland)**, v. 9, n. 1, p. 57–71, 1993.

WANG, J.-C. et al. Adverse Cardiovascular Effects of Nitrogen-Containing Bisphosphonates in Patients with Osteoporosis: A Nationwide Population-Based Retrospective Study. **International journal of cardiology**, v. 215, p. 232–237, jul. 2016.

WANG, J. Y. et al. Comparison of Vascular Morphometry in Jawbones and Long Bones: Micro-CT Study in a Rat Model Treated with Zoledronic Acid. **BioMed Research International**, v. 2021, p. 1–10, 2021.

WOODFIN, A.; VOISIN, M. B.; NOURSHARGH, S. PECAM-1: A multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 12, p. 2514–2523, 2007.

XIAO, W. et al. Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. **Frontiers of Oral Biology**, v. 18, p. 9–16, 2015.

XIE, H. et al. PDGF-BB secreted by preosteoclasts induces angiogenesis during coupling with osteogenesis. **Nature Medicine**, v. 20, n. 11, p. 1–12, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nm.3668>>.

XU, H. et al. Effect of Caffeine on Ovariectomy-Induced Osteoporosis in Rats. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 112, p. 108650, abr. 2019.

YAACOBI, E. et al. Surgical treatment of osteoporotic fractures: An update on the principles of management. **Injury**, v. 48, p. S34–S40, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.injury.2017.08.036>>.

YEH, L. C. C.; TSAI, A. D.; LEE, J. C. Osteogenic protein-1 (OP-1, BMP-7) induces osteoblastic cell differentiation of the pluripotent mesenchymal cell line C2C12. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 87, n. 3, p. 292–304, 2002.

YOGUI, F. C. et al. A SERM increasing the expression of the osteoblastogenesis and mineralization-related proteins and improving quality of bone tissue in an experimental model of osteoporosis. **Journal of Applied Oral Science**, v. 26, n. 18, p. 1–13, 2018.

YOUSEFZADEH, N. et al. Ovariectomised rat model of osteoporosis. **EXCLI Journal**, v. 19, p. 89–107, 2020.

YU, B.; WANG, C. Y. Osteoporosis: The Result of an ‘Aged’ Bone Microenvironment. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 8, p. 641–644, 2016.

YU, W. et al. Bone marrow adipogenic lineage precursors promote osteoclastogenesis in bone remodeling and pathologic bone loss. **Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 2, 2021.

ZABAGLIA, S. F. C.; COSTA-PAIVA, L. H. S.; PINTO-NETO, A. M. A Ligadura Tubária é Fator de

Risco para a Redução da Densidade Mineral Óssea em Mulheres na Pós-menopausa? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 23, n. 10, p. 621–626, 2001.

ZAVATTA, G.; CLARKE, B. L. Glucocorticoid- and Transplantation-Induced Osteoporosis. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 50, n. 2, p. 251–273, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecl.2021.03.002>>.

ZEYTINOGLU, M.; NAAMAN, S. C.; DICKENS, L. T. Denosumab Discontinuation in Patients Treated for Low Bone Density and Osteoporosis. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 50, n. 2, p. 205–222, 2021.

ZHANG, W. et al. Vacuum extraction enhances rhPDGF-BB immobilization on nanotubes to improve implant osseointegration in ovariectomized rats. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 10, n. 8, p. 1809–1818, 1 nov. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S154996341400389X>>. Acesso em: 16 out. 2018.

ZHANG, Z.; CHEN, J.; JIN, D. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)-BB Stimulates Osteoclastic Bone Resorption Directly: The Role of Receptor Beta. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 251, n. 1, p. 190–194, out. 1998.

ZHUANG, H. et al. Molecular Mechanisms of PPAR- γ Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. **Current stem cell research & therapy**, v. 11, n. 3, p. 255–264, 2016.

ZOFKOVA, I.; BLAHOS, J. New Molecules Modulating Bone Metabolism – New Perspectives in the Treatment of Osteoporosis. **Physiol. Res**, v. 66, p. 341–347, 2017. Disponível em: <www.biomed.cas.cz/physiolres>.

