



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO CIÊNCIA ANIMAL**

FÁBIO JOSÉ MARTINS PINTO

**EFEITO DE BIFIDOBACTERIUM spp , EM MURINOS COM OSTEOPOROSE
INDUZIDA: REVISÃO SISTEMÁTICA COM META-ANÁLISE**

Presidente Prudente - SP
2024



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO CIENCIA ANIMAL**

FÁBIO JOSÉ MARTINS PINTO

**EFEITO DE BIFIDOBACTERIUM spp , EM MURINOS COM OSTEOPOROSE
INDUZIDA: REVISÃO SISTEMÁTICA COM META-ANÁLISE**

Dissertação apresentada Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal – Área de concentração: Fisiopatologia Animal.

Orientador:
Prof. Dr. Hermann Bremer Neto

Presidente Prudente - SP
2024

636.089
P659e Pinto, Fábio José Martins.
 Efeito de bifidobacterium spp , em murinos com
osteoporose induzida: revisão sistemática com meta-
análise / Fábio José Martins Pinto – Presidente
Prudente, 2024.
 54f.: il.

 Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2024.
 Bibliografia.
 Orientador: Hermann Bremer Neto.

1. BMD. 2. BMC. 3. BV/TV%. 4. Ratas
ovariectomizadas. 5. Probiótico. I. Título.

Catálogo na Fonte: Michele Mologni – CRB 8-6204

FÁBIO JOSÉ MARTINS PINTO

**EFEITO DE BIFIDOBACTERIUM spp , EM MURINOS COM OSTEOPOROSE
INDUZIDA: REVISÃO SISTEMÁTICA COM META-ANÁLISE**

Dissertação apresentada Pró-reitora de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal - Área de Concentração: Saúde Animal.

Presidente Prudente, 29 de Maio de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hermann Bremer Neto
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dra. Liliana Martos Nicoletti Tóffoli
Centro Universitário de Adamantina - UNIFAI
Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. Inês Cristina Giometti Ceda
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

DEDICATÓRIA

Dedico a minha esposa, que com amor e sabedoria soube dar todo suporte para que conseguisse realizar este projeto.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, que sempre me conduziu com as devidas lições de amor, fraternidade e compaixão hoje e sempre.

Aos meus pais, Ivo Pinto e Fátima Martins Pinto que sempre estiveram ao meu lado nas horas mais difíceis e felizes da minha vida.

A minha esposa que não mede esforços para sempre me ver feliz.

As minhas irmãs, Patrícia Martins Pinto Sollis e Flávia Martins Pinto que sempre torceram por mim e são essenciais na minha vida.

Aos meus sobrinhos, Caroline Sollis, Bruna Albertini e Felipe Albertini que amo eles.

Aos meus cunhados, Sérgio Sollis e Márcio Albertini que sempre que estiveram ao meu lado e são verdadeiros amigos.

Agradeço a toda equipe do Departamento de Ciências Funcionais, pelo acolhimento, respeito e incentivo dados a mim desde o primeiro dia de curso.

Ao meu amigo Doutorando Adriano Messias de Souza que sempre acreditou no meu potencial e me auxiliou nesta jornada, resultando na construção de uma verdadeira amizade .

Em especial ao Prof. Dr. Hermann Bremer Neto, uma pessoa que possui uma inteligência superior aos seus demais, agradeço a oportunidade de poder conviver ao seu lado, ser seu orientado na parte científica e receber conselhos para meu desenvolvimento pessoal.

Por fim, deixo um agradecimento a todas as pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito obrigado.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

Efeito de bifidobacterium spp , em murinos com osteoporose induzida: revisão sistemática com meta-análise

A osteoporose pós-menopausa resulta em baixa densidade mineral óssea, deterioração da microarquitetura óssea, diminuição da resistência óssea e aumento do risco de fraturas por fragilidade. A suplementação de bactérias do gênero Bifidobacterium tem demonstrado efeitos benéficos em parâmetros indicativos de osteoporose, porém os resultados têm sido controversos. Esta revisão sistemática teve como objetivo aumentar o nível de evidência da suplementação de bactérias do gênero Bifidobacterium na osteoporose induzida em murinos, ratas e camundongos fêmeas ovariectomizadas (OVX). A pesquisa foi conduzida utilizando os bancos de dados PubMed, Embase, ScienceDirect, Scopus, Web of Science e Scielo em janeiro de 2023 e foi repetida em julho de 2023, usando as palavras-chave “osteoporose”, “murinos”, “ovariectomizadas”, “OVX” e “Bifidobacterium”. Foram encontrados 89 artigos completos, resumos ou capítulos de livros e após triagem detalhada, 5 estudos atenderam os critérios de inclusão, utilizando 66 animais, divididos randomicamente entre grupos controle e tratamento. Os resultados demonstraram que a suplementação oral de bactérias do gênero Bifidobacterium melhoram significativamente os parâmetros indicativos da saúde óssea BMD, BMC, BV/TV% e Tb.Sp. Em conclusão, essa meta-análise forneceu evidências de que bactérias do gênero Bifidobacterium estão envolvidas nos mecanismos anti-osteoporóticos em ratas e camundongos fêmeas OVX, como modelo pré-clínico e sugere que novos estudos em mulheres pós-menopausa como alternativa terapêutica ou terapia complementar aos tratamentos convencionais da osteoporose sejam realizados.

Palavras-chave: BMD, BMC, BV/TV%, Ratas ovariectomizadas, Probiótico.

ABSTRACT

Effect of bifidobacterium spp, in murines with induced osteoporosis: systematic review with meta-analysis

Postmenopausal osteoporosis results in low bone mineral density, deterioration of bone microarchitecture, decreased bone strength, and increased risk of fragility fractures. Supplementation of bacteria from the Bifidobacterium genus has demonstrated beneficial effects on parameters indicative of osteoporosis, but the results have been controversial. This systematic review aimed to increase the level of evidence of supplementation of bacteria of the genus Bifidobacterium in induced osteoporosis in murine, rats and ovariectomized female mice (OVX). The search was conducted using the PubMed, Embase, ScienceDirect, Scopus, Web of Science and Scielo databases in January 2023 and was repeated in July 2023, using the keywords “osteoporosis”, “murine”, “ovariectomized” , “OVX” and “Bifidobacterium”. 89 full articles, abstracts or book chapters were found and after detailed screening, 5 studies met the inclusion criteria, using 66 animals, randomly divided between control and treatment groups. The results demonstrated that oral supplementation of bacteria of the genus Bifidobacterium significantly improves parameters indicative of bone health BMD, BMC, BV/TV% and Tb.Sp. In conclusion, this meta-analysis provided evidence that bacteria of the genus Bifidobacterium are involved in anti-osteoporotic mechanisms in female OVX rats and mice, as a preclinical model and suggests that further studies in postmenopausal women as a therapeutic alternative or complementary therapy conventional osteoporosis treatments are carried out.

Keywords: BMD, BMC, BV/TV%, Ovariectomized rats, Probiotic.

SUMÁRIO

1	ARTIGO CIENTÍFICO.....	10
	ANEXO A- PARECER APROVAÇÃO DO PROJETO CAPI.....	30
	ANEXO B- NORMAS DE PUBLICAÇÃO PARA REVISTA.....	31

1 ARTIGO CIENTÍFICO

1 **EFEITO DE BIFIDOBACTERIUM spp , EM MURINOS COM OSTEOPOROSE** 2 **INDUZIDA: REVISÃO SISTEMÁTICA COM META-ANÁLISE**

3
4 Fábio José Martins Pinto ¹; Giovanna Marani Bernabé¹; Ana Clara Alvim Cancelli¹; Adriano
5 Messias de Souza¹; Hermann Bremer-Neto¹

6
7 A osteoporose pós-menopausa resulta em baixa densidade mineral óssea, deterioração da
8 microarquitetura óssea, diminuição da resistência óssea e aumento do risco de fraturas por
9 fragilidade. A suplementação de bactérias do gênero Bifidobacterium tem demonstrado
10 efeitos benéficos em parâmetros indicativos de osteoporose, porém os resultados têm sido
11 controversos. Esta revisão sistemática teve como objetivo aumentar o nível de evidência da
12 suplementação de bactérias do gênero Bifidobacterium na osteoporose induzida em murinos,
13 ratas e camundongos fêmeas ovariectomizadas (OVX). A pesquisa foi conduzida utilizando
14 os bancos de dados PubMed, Embase, ScienceDirect, Scopus, Web of Science e Scielo em
15 janeiro de 2023 e foi repetida em julho de 2023, usando as palavras-chave “osteoporose”,
16 “murinos”, “ovariectomizadas”, “OVX” e “Bifidobacterium”. Foram encontrados 89 artigos
17 completos, resumos ou capítulos de livros e após triagem detalhada, 5 estudos atenderam os
18 critérios de inclusão, utilizando 66 animais, divididos randomicamente entre grupos controle e
19 tratamento. Os resultados demonstraram que a suplementação oral de bactérias do gênero
20 Bifidobacterium melhoram significativamente os parâmetros indicativos da saúde óssea
21 BMD, BMC, BV/TV% e Tb.Sp. Em conclusão, essa meta-análise forneceu evidências de que
22 bactérias do gênero Bifidobacterium estão envolvidas nos mecanismos anti-osteoporóticos em
23 ratas e camundongos fêmeas OVX, como modelo pré-clínico e sugere que novos estudos em
24 mulheres pós-menopausa como alternativa terapêutica ou terapia complementar aos
25 tratamentos convencionais da osteoporose sejam realizados.

26
27 **Palavras-chave:** BMD, BMC, BV/TV%, Ratas ovariectomizadas, Probiótico.

28

¹ Departamento de Ciências Funcionais, Faculdade de medicina, Universidade do Oeste Paulista, Rua: José Bongiovani, 700, Cidade Universitária, Presidente Prudente, Brazil, CEP: 19050-920. Tel.: +55 18 3229 1181. Correspondente: Hermann Bremer Neto (hermann@unoeste.br)

29 INTRODUÇÃO

30

31 A osteoporose, do termo grego "osso poroso", é uma doença óssea comum, afetando
32 milhões de pessoas em todo o mundo. Embora os fatores de risco da osteoporose variem
33 dependendo do sexo e da idade, as fraturas osteoporóticas podem resultar em morbidade e
34 mortalidade substancial em homens e mulheres [1, 2]. É uma doença crônica que afeta o bem-
35 estar físico, emocional e mental de uma em cada três mulheres em todo o mundo e um em
36 cada cinco homens com mais de 50 anos. De acordo com a OMS (Organização Mundial da
37 Saúde), essa doença é definida como tendo uma densidade óssea inferior a 2,5 DP (desvio
38 padrão) em comparação com uma população saudável média da mesma idade e sexo [3–7].

39 Os fatores endócrinos primários envolvidos no desenvolvimento da osteoporose são
40 hormônio paratireoideiano (PTH), vitamina D, calcitonina e estrogênio. PTH e vitamina D
41 estão diretamente conectados: a PTH pode aumentar a absorção de cálcio através dos rins,
42 ossos e intestino; promover a atividade dos osteoclastos; e ativar a vitamina D para formar
43 calcitriol, promovendo a absorção intestinal de cálcio. Os papéis da PTH e da vitamina D são
44 opostos aos da calcitonina, que se liga ao seu receptor para bloquear de maneira reversível a
45 função dos osteoclastos, bloqueando assim a reabsorção óssea. O estrogênio também pode
46 bloquear a reabsorção óssea através da interação com receptores específicos de tecido,
47 receptor de estrogênio α (ER α) e receptor de estrogênio β (ER β), para aumentar a apoptose de
48 osteoclastos, uma diminuição da produção de estrogênio em mulheres pós-menopausa é uma
49 razão pela qual essa população tem maior incidência de osteoporose [8, 9].

50 Um crescente corpo de literatura pré-clínica e clínica mostra que microrganismos,
51 descritos como probióticos, são essenciais para melhorar a absorção intestinal de cálcio e
52 outros minerais e também para melhorar a saúde esquelética [10, 11]. As bifidobactérias são
53 probióticos comumente encontrados em todo o cólon de humanos e animais que são
54 considerados residentes normais do trato gastrointestinal [12]. Esses micróbios são
55 anaeróbicos, não patogênicos, gram-positivos, não formadores de esporos, bastonetes
56 pleomórficos e catalase-negativos [12, 13]. Diferentes espécies e/ou cepas de bifidobactérias
57 podem apresentar diferentes efeitos benéficos à saúde, como regulação da homeostase
58 microbiana intestinal, repressão de atividades enzimáticas pró-carcinogênicas na microbiota,
59 produção de vitaminas e bioconversão de vários compostos dietéticos em moléculas bioativas
60 [14, 15]. A maioria das evidências atuais sugere o impacto benéfico da suplementação oral de
61 probióticos durante períodos de crescimento rápido de adolescentes e também estádios de

62 vida caracterizados por maior perda mineral de osso e risco de fratura por osteoporose [11, 16,
63 17].

64 Em modelos animais, os resultados demonstraram que a suplementação oral de
65 probióticos é uma alternativa segura e eficaz para prevenir a perda óssea e aumentar a
66 densidade óssea em indivíduos saudáveis ou moderadamente inflamados, bem como proteger
67 contra a osteoporose primária (deficiência de estrogênio) e secundária [18]. No entanto,
68 devido a diferentes tipos de microrganismos probióticos, suplementados por via oral de forma
69 isolada ou combinada, esses resultados precisam ser compilados e se possível realizar análise
70 estatística secundária, para aumentar o nível de evidência na utilização de bactérias do gênero
71 *Bifidobacterium* no tratamento da osteoporose em fêmeas ovariectomizadas de murinos, como
72 modelos pré-clínicos e com isso fomentar a realização de estudos clínicos randomizados
73 (RCTs).

74

75 **METODOLOGIA**

76

77 A revisão sistemática para realização da meta-análise deste trabalho foi conduzida de
78 acordo com as recomendações do CAMARADES (Collaborative Approach to Meta Analysis
79 and Review of Animal Data from Experimental Studies) e o protocolo submetido para registro
80 na plataforma OSF (Open Science Framework) (<https://osf.io>). Para o relatório foram
81 seguidas às diretrizes descritas no Preferred Report Items for Systematic Reviews and Meta-
82 Analyzes (PRISMA) [19].

83

84 **Estratégia de Pesquisa**

85

86 Os dados e artigos utilizados na revisão sistemática foram obtidos durante o mês de
87 janeiro de 2023, e a estratégia de pesquisa foi repetida em abril do mesmo ano. As buscas
88 foram realizadas nas bases eletrônicas de dados científicos “Embase”, “PubMed”, “Scielo”,
89 “ScienceDirect”, “Scopus” e “Web of Science” disponíveis na Internet. Para as buscas, foram
90 utilizadas as palavras-chave “osteoporose”, “murinos”, “ovariectomizadas”, “OVX” e
91 “Bifidobacterium” que são aceitos como Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) e Medical
92 Subject Headings (MeSH). Estes termos foram utilizados em conjunto nos idiomas inglês e
93 português. Para tornar as pesquisas mais abrangentes, nesta fase, todos os resultados obtidos
94 foram analisados sem restrição de datas, idioma de publicação ou categoria, incluindo artigos
95 completos, resumos e capítulos de livros.

96 Critérios de Inclusão e Exclusão para Seleção de Estudos

97

98 Os trabalhos que continham as palavras-chave foram selecionados e analisados de
99 maneira independente por dois pesquisadores do grupo e em caso de discordância um terceiro
100 autor foi consultado. Registros duplicados e trabalhos que não estavam relacionados aos
101 objetivos propostos foram manualmente excluídos após análise dos títulos e / ou resumos.
102 Foram selecionados trabalhos completos que estudaram o seguinte P.I.C.O.: (i) População:
103 ratas ovariectomizadas (OVX); (ii) Intervenção: suplementação com bactérias do gênero
104 *Bifidobacterium*; (iii) Controle: murinos fêmeas OVX não suplementadas na dieta com
105 bactérias do gênero *Bifidobacterium*; (iv) Desfechos: avaliação de parâmetros indicadores de
106 osteoporose. Ensaio clínico em outras espécies, estudos-piloto, artigos de revisão e
107 trabalhos que não abordaram o objetivo desta meta-análise foram excluídos.

108

109 Extração de dados

110

111 Foi elaborada uma planilha com dados de cada estudo selecionado na etapa anterior:
112 autor(s)/ano de publicação, *Bifidobacterium* utilizada, tempo de duração do experimento,
113 espécie e número de animais utilizados e parâmetros analisados (Tabela 1).

114

115 Parâmetros de Interesse

116

117 Definimos a fração trabecular do volume ósseo do fêmur (BV/TV%), espessura
118 trabecular do fêmur (Tb.Th), espaçamento trabecular do fêmur (Tb.Sp), densidade mineral
119 óssea da porção trabecular do fêmur (BMD), conteúdo mineral ósseo do fêmur (BMC),
120 concentração sérica de cálcio (Ca) e concentração sérica de fósforo (P), como parâmetros de
121 relevância primária para os objetivos desta meta-análise.

122

123 Qualidade dos Estudos e Risco de Viés

124

125 A qualidade metodológica dos estudos individuais foi avaliada por 2 autores, de forma
126 independente, com base no Collaborative Approach to Meta-analysis and Review of Animal
127 Data from Experimental Studies checklists [20] e os Instrumentos de Avaliação de Risco de
128 Viés e Outros Critérios Metodológicos de Estudos Animais Publicados [21]. Essas diretrizes
129 avaliam a qualidade usando os seguintes critérios: (1) cálculo do tamanho da amostra; (2)

130 alocação aleatória para tratamento; (3) condições de criação (por exemplo, programa de
131 reprodução, ciclo claro/escuro, temperatura, tipo de alimento, acesso à água e enriquecimento
132 ambiental); (4) avaliação cega dos resultados; (5) cumprimento das regulamentações de bem-
133 estar animal; (6) divulgação de conflitos de interesse; e (7) publicação revisada por pares. A
134 escala de qualidade varia de 0 a 7 pontos. Um terceiro revisor resolveu as divergências entre
135 os 2 revisores.

136

137 **Análises Estatísticas**

138

139 Usamos o software RevMan 5.3 para a realização dos cálculos da meta-análise. Para a
140 análise do inverso da variância utilizamos as médias e desvios padrões dos resultados de cada
141 estudo para comparar os dados encontrados. A heterogeneidade foi calculada usando o teste
142 do Q^2 e I^2 , a significância foi definida em $p < 0,10$ ou $I^2 > 50\%$. Foram analisados os efeitos
143 fixos dos tratamentos, porém quando observamos heterogeneidade significativa entre os
144 estudos, analisamos os efeitos randômicos. Os valores da BMD foram padronizados usando o
145 método de ajuste de Hedges e foi implementado pelo RevMan 5.3. O valor igual ou menor
146 que 5% foi considerado como estatisticamente significativo.

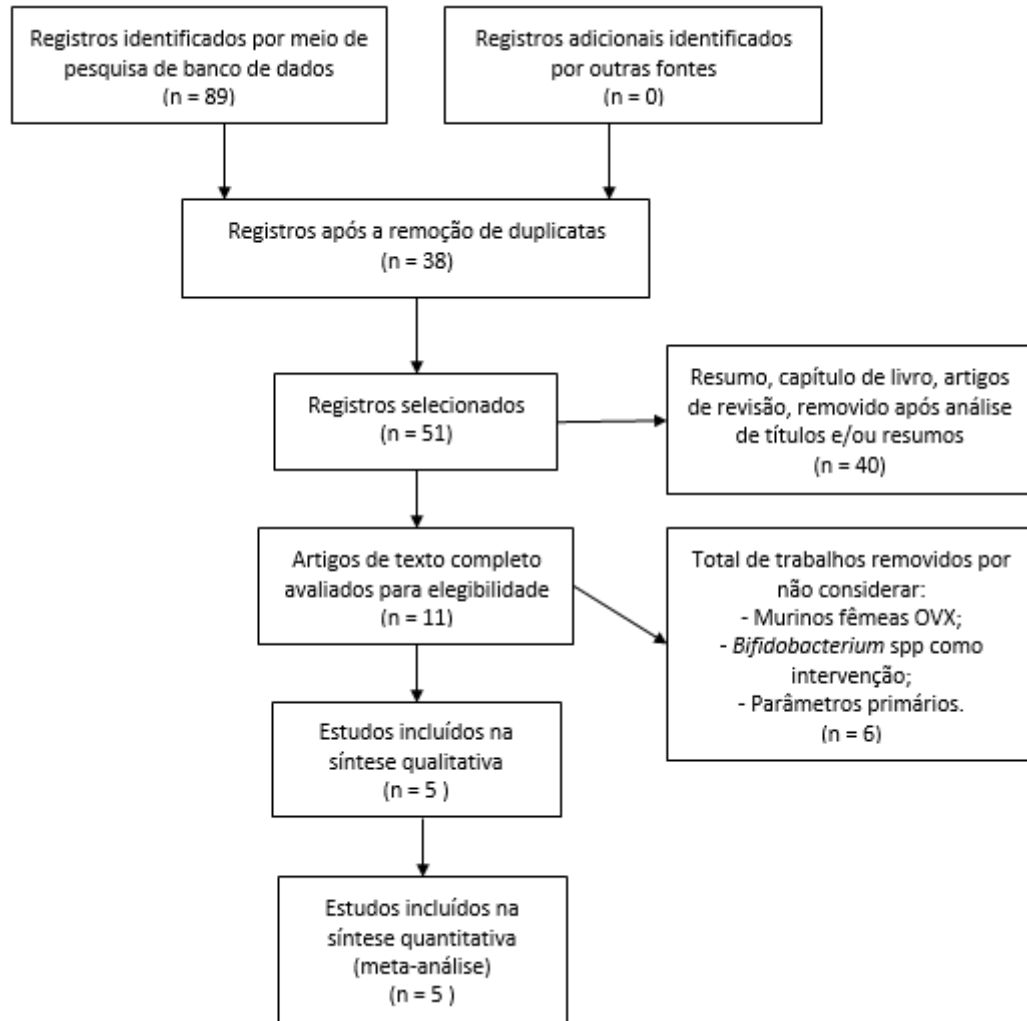
147

148 **RESULTADOS**

149

150 Foram encontrados 89 artigos completos, resumos, artigos de revisão ou capítulos de
151 livros que continham as palavras-chave utilizadas na busca bibliográfica. Destes, após a
152 triagem de maneira independente por dois pesquisadores de títulos e resumos, 11 foram
153 potencialmente escolhidos para avaliação posterior e, após avaliação completa dos estudos, 05
154 estudos experimentais, sendo um estudo que utilizou camundongos fêmeas [22] e os demais
155 utilizaram ratas [17, 23–25] e que preencheram os critérios de inclusão. O processo de seleção
156 de literatura, seleção dos estudos e motivos de exclusão são mostrados no diagrama de fluxo
157 do PRISMA (Figura 1).

158



159

160 **Fig. 1** Diagrama de fluxo PRISMA mostrando o processo de seleção de literatura, seleção de
 161 estudos e motivos de exclusão.

162

163 Características dos estudos incluídos na meta-análise

164

165 Os trabalhos selecionados estudaram os efeitos do tratamento com diferentes cepas de
 166 *Bifidobacterium*, sobre indicadores da osteoporose induzida em murinos fêmeas Ovx. As
 167 doses utilizadas e a composição estão descritas na Tabela 1.

168

169 A duração dos estudos incluídos nas meta-análises variou entre 28 e 112 dias e
 170 utilizaram um total de 54 ratas e 12 camundongos fêmeas ovariectomizadas, divididas entre
 171 grupos controle (n=33) e tratamento (n=33) e todos as análises ocorrem após Ovx. Os estudos
 172 foram realizados na região Sul e Sudeste Asiático e Oriente Médio e publicados de 2015 a

173

174 Os trabalhos e resumo das características dos estudos incluídos na meta-análise são
 apresentados na Tabela 1.

175

176 **Tabela 1.** Composição do *Bifidobacterium* e doses utilizadas nos estudos

Autor/Ano de Publicação	Probiótico	Dose	Composição
PARVANEH et al. (2015)	<i>Bifidobacterium longum</i> ATCC 15707; Rockville, MD, USA)	1 mL (10 ⁸ -10 ⁹ CFU/mL/dia)	<i>Bifidobacterium longum</i> ativadas em Broth (De Man Rogosa e Sharpe, Difco, Detroit, MI, EUA) modificados com 0,02% carbonato de sódio, desidratação de cloreto de cálcio a 0,01% e solução a 1% de L-cisteína a 0,05%. Total de 20 amostras tradicionais de iogurte fermentado, produzidas na costa norte do Golfo Pérsico, foram usadas para isolar <i>Bifidobacterium</i> spp do ácido láctico.
MONTAZERI-NAJAFABADY et al. (2019)	<i>Bifidobacterium</i>	1 mL (10 ⁹ CFU/ml/dia)	Total de 20 amostras tradicionais de iogurte fermentado, produzidas na costa norte do Golfo Pérsico, foram usadas para isolar <i>Bifidobacterium</i> spp do ácido láctico.
JIA et al., (2021)	<i>Bifidobacterium longum</i> BL986	1 mL (10 ⁷ CFU/mL/dia)	<i>Bifidobacterium longum</i> BL986 comercial. Total de 20 amostras tradicionais de iogurte fermentado, produzidas na costa norte do Golfo Pérsico, foram usadas para isolar <i>Bifidobacterium</i> spp do ácido láctico.
MONTAZERI-NAJAFABADY et al. (2021)	<i>Bifidobacterium</i>	1 mL (10 ⁹ CFU/ml/dia)	Total de 20 amostras tradicionais de iogurte fermentado, produzidas na costa norte do Golfo Pérsico, foram usadas para isolar <i>Bifidobacterium</i> spp do ácido láctico.
SAPRA et al. (2022)	<i>Bifidobacterium longum</i> UBBL-64; Unique Biotech Ltd., Hyderabad, India.	400 µL (10 ⁹ CFU/dia)	<i>Bifidobacterium longum</i> UBBL-64 (M1395) cultivado em caldo Bifido contendo 0,05% de L-cisteína sob condições anaeróbicas.

177

178 Os resultados dos parâmetros eleitos para serem analisados foram expressos com clareza, de
179 tal forma que permitiram extrair com segurança os valores para serem meta-analisados
180 (Tabela 2).

181

182 **Tabela 2.** Características dos estudos incluídos na meta-análise

Autor (s)/ano de publicação	Duração do estudo (dias)	Espécie/sexo	Nº de animais por grupo	Parâmetros meta-analisados
PARVANEH et al. (2015)	112	Rata Sprague-Dawley	8	BMD, BV/TV%, Tb.Th, Tb.Sp e Ca.
MONTAZERI-NAJAFABADY et al. (2019)	28	Rata Sprague-Dawley	7	BMD, BMC, Ca e P.
JIA et al., (2021)	30	Rata Sprague-Dawley, patógeno free (SPF)	5	BV/TV%, Tb.Sp
MONTAZERI-NAJAFABADY et al. (2021)	28	Rata Sprague-Dawley / fêmea	7	BMD, BMC, Ca, P.
SAPRA et al. (2022)	42	Camundongo C57BL/6 J patógeno free (SPF)	6	BMD, BV/TV%, Tb.Th e Tb.Sp.

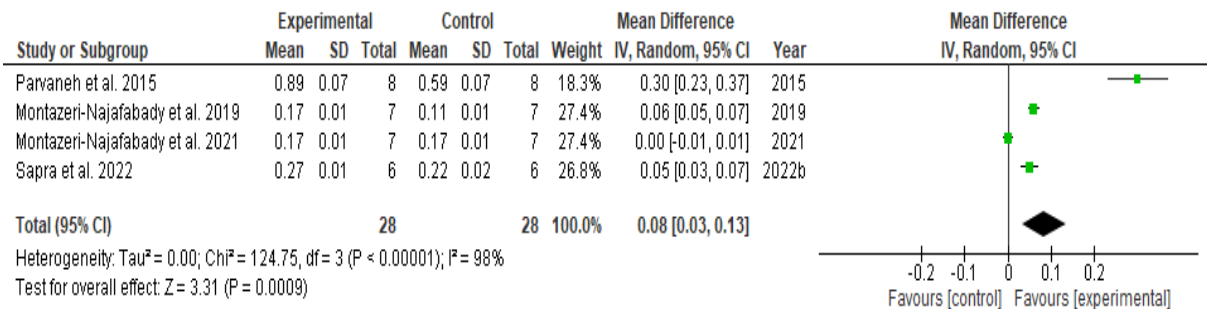
183 Parâmetros meta-analisados: Densidade mineral óssea da porção femoral (BMD); Conteúdo mineral ósseo femoral (BMC);
184 Fração do volume ósseo femoral (BV/TV %); Espessura trabecular do fêmur (Tb.Th); Espaçamento trabecular do fêmur
185 (Tb.Sp); Concentração sérica de cálcio (Ca); e Concentração sérica de fósforo (P).

186

187

188 A meta-análise dos resultados da densidade mineral óssea trabecular (BMD) demonstra
 189 que *Bifidobacterium longum* ATCC 15707, *Bifidobacterium longum* UBBL-64 e
 190 *Bifidobacterium* spp. são capazes de melhorar este parâmetro significativamente ($P=0,00009$),
 191 quando comparado aos grupos controle (Fig.3).

192



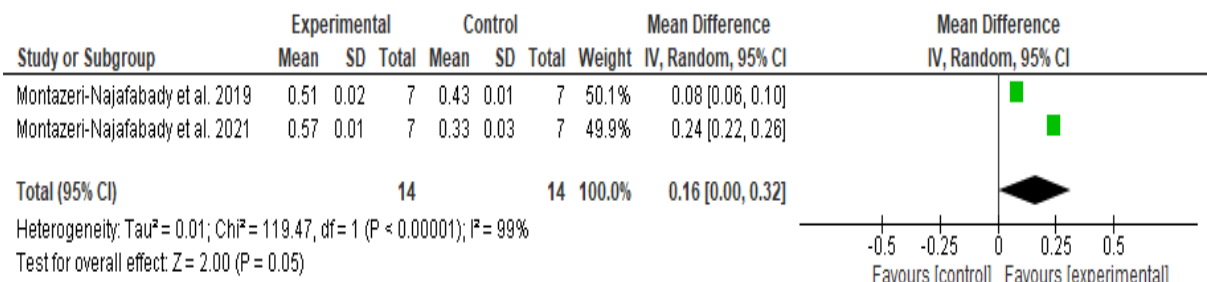
193

194 **Fig. 2** Forest plots para o efeito do consumo de bactérias do gênero *Bifidobacterium* sobre
 195 densidade mineral óssea da porção trabecular do fêmur (BMD), expressos como diferenças
 196 médias entre a intervenção e as dietas controle.

197

198 A meta-análise dos resultados do conteúdo mineral ósseo femoral, BMC, demonstra que
 199 as *Bifidobacterium* spp. é capaz de melhorar este parâmetro significativamente ($P \leq 0,05$),
 200 quando comparado aos grupos controle (Figura 3).

201



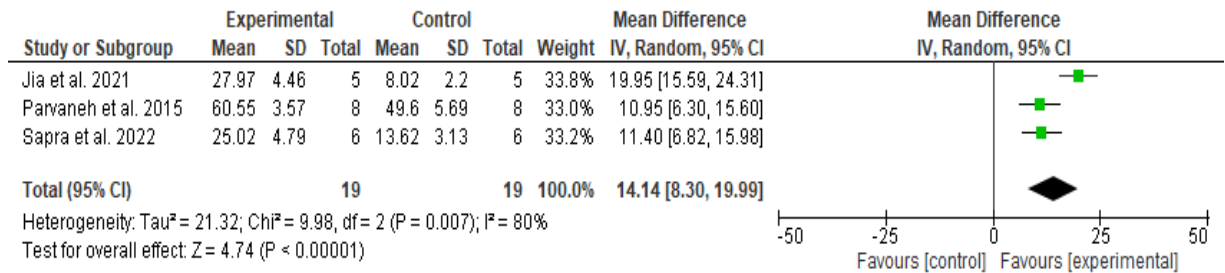
202

203 **Fig. 3** Forest plots para o efeito do consumo de bactérias do gênero *Bifidobacterium* sobre (a)
 204 os níveis de conteúdo mineral ósseo femoral, BMC, expressos como diferenças médias entre a
 205 intervenção e as dietas de controle.

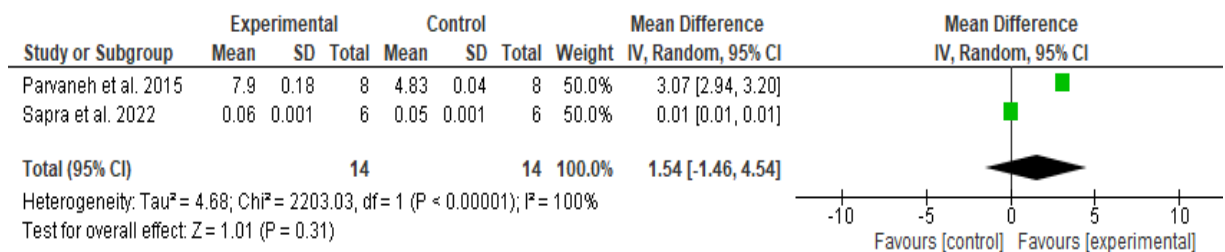
206

207 A meta-análise dos resultados da BV/TV% demonstra que os probióticos,
 208 *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 e *Bifidobacterium longum* UBBL-64 são capazes de
 209 melhorar este parâmetro significativamente ($P < 0,00001$), quando comparado aos grupos
 210 controle (Figura 4a). A meta-análise dos resultados da Tb.Th demonstrou que tanto
 211 *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 quanto *Bifidobacterium longum* UBBL-64,

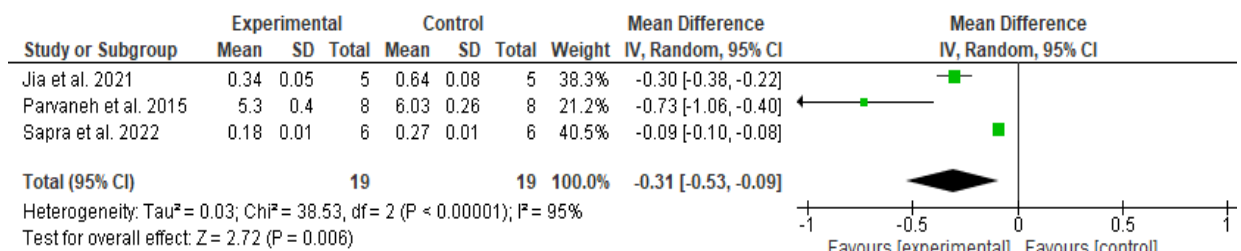
212 probióticos, não melhoraram este parâmetro ($P=0,31$) (Figura 4b). Os resultados estatísticos
 213 que avaliaram o espaçamento trabecular no fêmur (Tb.Sp) sob intervenção com
 214 *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 e *Bifidobacterium longum* UBBL-64 revelaram
 215 diferença significativa ($P=0,06$) quando comparados com o grupo controle (Figura 4c).
 216



(a)



(b)



(c)

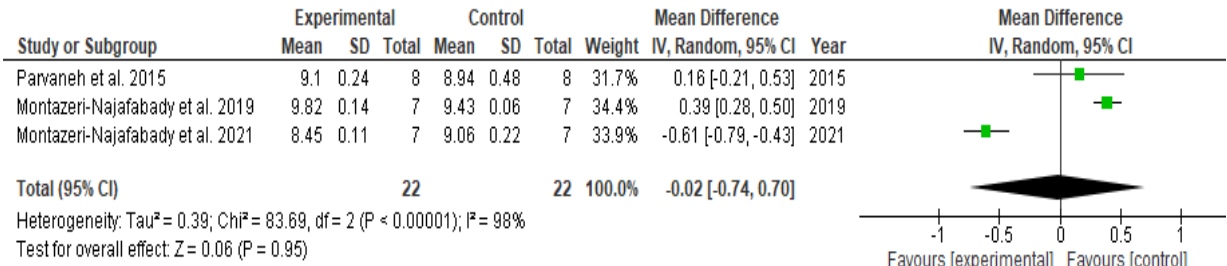
217 **Fig. 4** Forest plots para o efeito do consumo de bactérias do gênero *Bifidobacterium* sobre: (a)
 218 fração do volume ósseo do fêmur trabecular (BV/TV%); (b) espessura trabecular do fêmur
 219 trabecular (Tb.Th); e (c) espaçamento trabecular do fêmur (Tb.Sp), expressos como
 220 diferenças médias entre a intervenção e as dietas de controle.

221

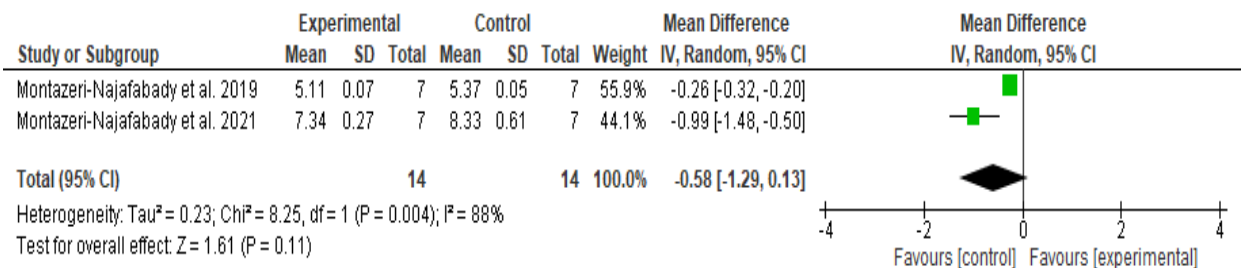
222 Na meta-análise dos resultados relativos ao Ca, foi observado que nas ratas dos grupos
 223 suplementadas com *Bifidobacterium spp.* não demonstraram melhora significativa ($P=0,95$),
 224 em comparação com os grupos controle durante o período experimental (Figura 5a). Ratas
 225 suplementadas com *Bifidobacterium spp.* também não demonstraram melhora significativa

226 (P=0,11), em comparação com os grupos controle durante o período experimental em relação
 227 a concentração sérica de fósforo (Figura 5b).

228



(a)



(b)

229 **Fig. 5** Forest plots para o efeito do consumo de bactérias do gênero *Bifidobacterium* sobre (a)
 230 níveis séricos de cálcio e (b) níveis séricos de fósforo, expressas como diferenças médias
 231 entre a intervenção e as dietas de controle.

232

233 Estudo e Risco de Viés

234

235 Os resultados da nossa avaliação de risco de viés dos cinco estudos incluídos nesta
 236 revisão sistemática são apresentados na Tabela 3. Nenhum dos estudos descreveu a realização
 237 do cálculo do tamanho da amostra e avaliação cega dos resultados. Somente um estudo não
 238 descreveu ter realizado a alocação aleatória para tratamento [17]. Todos os estudos
 239 descreveram ter mantido adequadas condições de criação (por exemplo, programa de
 240 reprodução, ciclo claro/escuro, temperatura, tipo de alimento, acesso à água e enriquecimento
 241 ambiental), cumprimento das regulamentações de bem-estar animal, terem citado terem
 242 divulgado possíveis de conflitos de interesse e publicação revisada por pares. Os estudos
 243 apresentaram baixo risco de viés na maioria dos critérios metodológicos e alcançaram a
 244 qualidade desejada.

245

246

247 **Tabela 3.** Critérios de avaliação para seleção de artigos.

Estudo	1	2	3	4	5	6	7
PARVANEH et al. (2015)	N	Y	Y	N	Y	Y	Y
MONTAZERI-NAJAFABADY et al. (2019)	N	Y	Y	N	Y	Y	Y
JIA et al., (2021)	N	N	Y	N	Y	Y	Y
MONTAZERI-NAJAFABADY et al. (2021)	N	Y	Y	N	Y	Y	Y
SAPRA et al. (2022)	N	Y	Y	N	Y	Y	Y

248 Risco de viés: □, YES; □, NO. Perguntas de avaliação do risco de viés: (1) cálculo do tamanho da amostra; (2)
 249 alocação aleatória para tratamento; (3) condições de criação (por exemplo, programa de reprodução, ciclo
 250 claro/escuro, temperatura, tipo de alimento, acesso à água e enriquecimento ambiental); (4) avaliação cega dos
 251 resultados; (5) cumprimento das regulamentações de bem-estar animal; (6) divulgação de conflitos de interesse;
 252 e (7) publicação revisada por pares.

253

254 **DISCUSSÃO**

255

256 A osteoporose é uma doença óssea sistêmica caracterizada pela redução da massa óssea
 257 e deterioração da microarquitetura óssea, levando à fragilidade óssea e ao aumento do risco de
 258 fraturas [26]. Nas mulheres os ossos são menores e mais finos e na fase da menopausa
 259 apresentam queda nos níveis de estrogênio, o que desencadeia uma rápida aceleração na perda
 260 óssea e que começa pelos menos um ano antes da menopausa e continua por mais três anos
 261 antes de desacelerar ligeiramente, podendo se prorrogar até oito anos subsequentes. Ainda na
 262 fase pós-menopausa essa condição de perda óssea pode permanecer, conforme demonstrado
 263 pela monitorização das taxas de perda óssea e marcadores de reabsorção óssea [27].

264 Nesse sentido, uma gama de estudos em modelos pré-clínicos para melhor compreensão
 265 da fisiopatologia da osteoporose permite análises das condições clínicas e observação de
 266 reaproveitamento oportunista de compostos existentes, o que contribuiu no desenvolvimento
 267 de medicamentos. Contudo, os tratamentos disponíveis não reduziram as ocorrências de
 268 fraturas, o que também pode estar relacionado à prescrição e uso equivocado dos
 269 medicamentos pelos pacientes, em detrimento aos possíveis efeitos colaterais e longo período
 270 de tratamento [28].

271 Apesar desses avanços, persiste uma lacuna preocupante no atendimento ao paciente
 272 [29], pois tratamentos convencionais com risedronato ou os bifosfonatos reservados para

273 maiores de 60 anos demonstraram efeitos colaterais que comprometem a adesão terapêutica,
274 tais como lesões gastrointestinais na porção alta e irritação esofágica e dispepsia [30–32]. O
275 tratamento com anticorpo monoclonal, denosumabe, os pacientes apresentaram hipocalcemia,
276 decorrente da diminuição do potencial de absorção gerada pelo medicamento a esse mineral.
277 Além disso, os pacientes podem desenvolver angioedema, eritema multiforme, dermatite,
278 erupção cutânea e urticária e uma barreira importante a este tratamento é a descontinuação
279 que não deve ser abrupta pelo potencial de gerar lesões ósseas [29, 33]. Também, tratamentos
280 preconizados a base de reposição hormonal têm sido alvo de ocorrência de efeitos adversos,
281 principalmente complicações cardiovasculares e indução de câncer (maior incidência de
282 mama e útero) [34–36]. Com o mesmo intuito, dietas com altas doses de cálcio demonstraram
283 aumentar a oferta deste mineral, no entanto, apresentam limitações importantes, como por
284 exemplo, o aumento do risco para doenças cardíacas e renais [37, 38].

285 Modelos pré-clínicos que reproduzem os efeitos fisiopatológicos da osteoporose pós-
286 menopáusia em humanos adotam a utilização de murinos ovariectomizados, como modelo
287 experimental validado [39], pois após a intervenção cirúrgica, os resultados demonstraram
288 redução da densidade mineral óssea diafisária e comprometimento das propriedades
289 biomecânicas, quando comparadas com animais controle [40]. Assim, o uso de animais, ratas
290 e camundongos fêmeas OVX, tem sido um modelo experimental amplamente utilizado na
291 avaliação dos efeitos da suplementação de alimentos funcionais, probióticos e prebióticos,
292 como terapia alternativa as tradicionalmente utilizadas para a manutenção da saúde óssea em
293 estudos que analisaram parâmetros indicativos de osteoporose [17, 22–25, 40].

294 Nesse contexto, a suplementação oral de bactérias do gênero bifidobacterium como
295 probiótico age no trato gastrointestinal (TGI)[41], onde os carboidratos indigeríveis tornam-
296 se fontes de alimento, promovendo a produção de ácidos graxos de cadeia curta [produtos
297 finais metabólicos da fermentação bacteriana (bífida)] contribuindo na diminuição do pH[41,
298 42], aumento da solubilidade cálcio, manutenção da integridade da barreira intestinal, redução
299 de bactérias patogênicas e processo inflamatórios no TGI, melhor absorção de nutrientes,
300 lipídicos, carboidratos, proteínas e minerais[43], essenciais para a regulação da remodelação
301 óssea[44].

302 Os resultados benéficos observados nos estudos utilizando os probióticos se deve a
303 capacidade desse suplemento alimentar diminuir a ocorrência de osteoporose induzida pela
304 senescência, prevenir a perda óssea induzida pela OVX, inibir a diferenciação células
305 precursoras de osteoclastos *in vitro* e acelerar a remodelação da cartilagem calosa da fratura
306 [44–46].

307 Nessa meta-análise os resultados aumentaram o nível de evidência de que a
308 suplementação oral com bactérias do gênero *Bifidobacterium* é capaz de melhorar
309 significativamente os parâmetros BV/TV%, BMD e BMC e que estão relacionados à
310 composição, estrutura, organização e resistência mecânica do tecido ósseo do fêmur e são
311 fatores determinantes na ocorrência de fraturas [47, 48]. Esses efeitos positivos sobre BMD e
312 BMC reitera a relação pró-regenerativa, principalmente na preservação da barreira e
313 microbiota intestinal [49, 50]. Esse gênero de bactérias na microbiota intestinal estimula a
314 produção de ácido graxos de cadeia curta (SCFA), que reduzem o pH luminal e aumentam a
315 solubilidade do cálcio e a absorção transcelular principalmente no cólon distal [24, 51]. Além
316 disso, possui a capacidade de regulação positiva sobre a proteína secretora ácida rica em
317 cisteína (SPARC), uma glicoproteína que codifica uma proteína não colágena necessária na
318 matriz extracelular óssea para a calcificação do colágeno no osso, e um receptor de ligação ao
319 Ca, assim, associado à remodelação, reparação, desenvolvimento de tecidos, renovação
320 celular, mineralização óssea, resultando em ossos mais fortes [25, 52] e da proteína
321 morfogenética óssea 2 (BMP2) e que desempenha um papel importante na regulação do
322 microambiente da matriz da medula óssea e promove a diferenciação osteogênica das células-
323 tronco mesenquimais que estão envolvidas nas vias de sinalização associadas à organização da
324 matriz extracelular, diferenciação de osteoblastos, ossificação, desenvolvimento ósseo,
325 diferenciação de condrócitos e morfogênese óssea [53].

326 Conjunto crescente de dados demonstra que a deficiência de estrogênio durante a
327 menopausa em mulheres e induzida em modelo animal pela ovariectomia leva a alterações na
328 microbiota intestinal, o que pode contribuir para o desenvolvimento da osteoporose decorrente
329 do aumento da remodelação óssea e diminuição da formação óssea em cada unidade de
330 remodelação, resultando numa perda de massa óssea [25, 54–58] e a administração de
331 probióticos pode exercer efeitos favoráveis, retardando o processo [55, 59].

332 A recuperação excessiva é um fator de risco para fratura, que pode ser importante em
333 ossos pequenos [38, 60, 61] e a suplementação de probióticos do gênero *Bifidobacterium*
334 demonstraram inibir a remodelagem óssea, pela capacidade de modular osteoclastogênese
335 quanto à diferenciação de Células Tregs, Bregs e Th17, papel fundamental do eixo celular
336 “Breg – Treg – Th17” na pós-menopausa em modelos de camundongos osteoporóticos,
337 entretanto, os metabólitos envolvidos no potencial “imunoporótico” precisam ser elucidados
338 [22, 62].

339 A osteoporose é acompanhada de alterações na microestrutura do tecido ósseo, como
340 redução de BV/TV% e Tb.Th e aumento de Tb.Sp, assim como a porosidade total e risco de

341 fratura óssea. As meta-análises evidenciaram essas características da osteoporose nos grupos
342 OVX e não suplementados com probiótico, assim como em outros não incluídos nessa revisão
343 sistemática [17, 22, 25, 63, 64]. A suplementação de *B. longum* demonstrou efeito benéfico na
344 microestrutura trabecular e BV/TV são os principais determinantes da fratura óssea e da
345 resistência óssea e têm uma relação positiva com a perda óssea [65]. Além disso, diminuiu a
346 Tb.Sp e a porosidade total do fêmur e, paralelamente, aumentou a BV/TV e levou à melhora
347 da BMD do fêmur. Assim, Tb.Sp, bem como BV/TV são alguns dos preditores de risco de
348 fratura óssea e osteoporose, que foram modulados benéficamente pela suplementação de *B.*
349 *longum*. Resultados semelhantes em relação às alterações da microestrutura trabecular pelo
350 consumo de probióticos também foram relatados por outros estudos [66, 67].

351 As meta-análises dos valores séricos de cálcio e fósforo não revelaram diferença entre
352 os grupos tratados e controle e a ingestão oral a vontade da ração desses minerais atendia as
353 necessidades nutricionais basais dos animais. Apesar da ingestão dos microrganismos
354 probióticos ter efeito benéfico, os resultados, devido as concentrações terem uma ampla faixa
355 de valores séricos, não resultou em efeito significativo, o que também foi observado em
356 humanos [68, 69].

357

358 Avaliação do viés

359

360 Nesta revisão sistemática com meta-análise, após rigoroso processo de seleção, os
361 estudos foram incluídos por apresentarem metodologia rigorosa e bem descritos. A
362 randomização foi considerada um requisito metodológico importante, no entanto, os estudos
363 que não citaram a sequência aleatória de randomização e a ocultação de alocação foram
364 incluídos quando entendemos que os animais utilizados nos experimentos apresentavam
365 homogeneidade de peso, sexo, tempo de estabilização após OVX e via de administração do
366 suplemento. A consequência desta ponderação foi à possibilidade de inclusão de resultados
367 conflitantes, que em nossa consideração eleva o nível de evidência do resultado. Resultados
368 heterogêneos entre estudos podem ser devidos a vários fatores, dentre eles a diferenças na
369 duração do tratamento, método de administração do *Bifidobacterium* e idade dos animais no
370 início do período experimental [46].

371

372 **CONCLUSÃO**

373

374 Os resultados deste estudo obtidos de modelo pré-clínico, permitem concluir que
375 suplementação de bactérias do gênero *Bifidobacterium* por via oral melhoram a densidade
376 mineral óssea, conteúdo mineral ósseo do fêmur em ratas ovariectomizadas. Além disso, os
377 resultados revelaram efeitos benéficos significativos na fração do volume ósseo da porção
378 trabecular do fêmur e espaçamento trabecular do fêmur e efeito benéfico no espaçamento
379 trabecular do fêmur. Novos estudos utilizando bactérias probióticas desse gênero devem ser
380 produzidos para aumentar o nível de evidência, permitindo que esses probióticos possam ser
381 utilizados como uma terapia complementar aos tratamentos convencionais, ou até mesmo
382 como uma nova abordagem terapêutica para osteoporose pós-menopausa em mulheres.

383

384 **AGRADECIMENTOS**

385

386 À bibliotecária Jakeline Margaret de Queiroz Ortega pela colaboração nas buscas pelos
387 artigos das bases de dados.

388 Ao grupo de pesquisa do Departamento de Ciências Funcionais (DCF), Faculdade de
389 Medicina, Universidade do Oeste Paulista (FAMEPP/UNOESTE), Presidente Prudente, São
390 Paulo, Brasil.

391

392 **CONFLITO DE INTERESSE**

393

394 Os autores não têm nada a divulgar.

395

396 **USO DE TECNOLOGIAS DE INTELIGENCIA ARTIFICIAL**

397

398 Nenhuma tecnologia assistida por ia foi usada na geração deste manuscrito.

399

400 **FINANCIAMENTO**

401

402 Os autores não têm nada a divulgar.

403

404

405 **REFERÊNCIAS**

406

407 1. Mitek T, Nagraba Ł, Deszczyński J, et al (2019) Genetic Predisposition for

- 408 Osteoporosis and Fractures in Postmenopausal Women. In: *Advances in experimental*
409 *medicine and biology*. Adv Exp Med Biol, pp 17–24
- 410 2. Radominski SC, Bernardo W, Paula AP de, et al (2017) Diretrizes brasileiras para o
411 diagnóstico e tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa. *Revista*
412 *Brasileira de Reumatologia* 57:452–466. <https://doi.org/10.1016/j.rbr.2017.06.001>
- 413 3. Keen MU, Reddivari AKR (2023) *Osteoporosis In Females*. StatPearls Publishing
- 414 4. Trevisan C, Alessi A, Girotti G, et al (2020) The Impact of Smoking on Bone
415 Metabolism, Bone Mineral Density and Vertebral Fractures in Postmenopausal
416 Women. *Journal of Clinical Densitometry* 23:381–389.
417 <https://doi.org/10.1016/j.jocd.2019.07.007>
- 418 5. Damani JJ, De Souza MJ, VanEvery HL, et al (2022) The Role of Prunes in
419 Modulating Inflammatory Pathways to Improve Bone Health in Postmenopausal
420 Women. *Advances in Nutrition* 13:1476–1492.
421 <https://doi.org/10.1093/advances/nmab162>
- 422 6. Hernlund E, Svedbom A, Ivergård M, et al (2013) Osteoporosis in the European Union:
423 medical management, epidemiology and economic burden. *Archives of Osteoporosis*
424 8:136. <https://doi.org/10.1007/s11657-013-0136-1>
- 425 7. Salari N, Ghasemi H, Mohammadi L, et al (2021) The global prevalence of
426 osteoporosis in the world: a comprehensive systematic review and meta-analysis.
427 *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 16:609. [https://doi.org/10.1186/s13018-](https://doi.org/10.1186/s13018-021-02772-0)
428 [021-02772-0](https://doi.org/10.1186/s13018-021-02772-0)
- 429 8. Rooney AM, McNeill TJ, Ross FP, et al (2023) PTH Treatment Increases Cortical
430 Bone Mass More in Response to Compression than Tension in Mice. *Journal of Bone*
431 *and Mineral Research* 38:59–69. <https://doi.org/10.1002/jbmr.4728>
- 432 9. Ribeiro AF de C, Serakides R, Nunes VA, et al (2003) A osteoporose e os distúrbios
433 endócrinos da tireóide e das gônadas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia &*
434 *Metabologia* 47:228–236. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302003000300005>
- 435 10. Weaver CM (2015) Parallels Between Nutrition and Physical Activity: Research
436 Questions in Development of Peak Bone Mass. *Research Quarterly for Exercise and*
437 *Sport* 86:103–106. <https://doi.org/10.1080/02701367.2015.1030810>
- 438 11. McCabe L, Britton RA, Parameswaran N (2015) Prebiotic and Probiotic Regulation of
439 Bone Health: Role of the Intestine and its Microbiome. *Current Osteoporosis Reports*
440 13:363–371. <https://doi.org/10.1007/s11914-015-0292-x>
- 441 12. Nielsen DS, Møller PL, Rosenfeldt V, et al (2003) Case Study of the Distribution of
442 Mucosa-Associated Bifidobacterium Species, Lactobacillus Species, and Other Lactic
443 Acid Bacteria in the Human Colon. *Applied and Environmental Microbiology* 69:7545–
444 7548. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7545-7548.2003>
- 445 13. Zacarias MF, Reinheimer JA, Vinderola G, et al (2020) Effects of conventional and
446 nonconventional drying on the stability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1.
447 *International Journal of Dairy Technology* 73:625–633. [https://doi.org/10.1111/1471-](https://doi.org/10.1111/1471-0307.12684)
448 [0307.12684](https://doi.org/10.1111/1471-0307.12684)
- 449 14. Toscano M, De Vecchi E, Gabrieli A, et al (2015) Probiotic characteristics and in vitro
450 compatibility of a combination of *Bifidobacterium breve* M-16 V, *Bifidobacterium*

- 451 longum subsp. infantis M-63 and *Bifidobacterium longum* subsp. longum BB536.
452 *Annals of Microbiology* 65:1079–1086. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0953-5>
- 453 15. Chugh B, Kamal-Eldin A (2020) Bioactive compounds produced by probiotics in food
454 products. *Current Opinion in Food Science* 32:76–82.
455 <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.02.003>
- 456 16. de Sire A, de Sire R, Curci C, et al (2022) Role of Dietary Supplements and Probiotics
457 in Modulating Microbiota and Bone Health: The Gut-Bone Axis. *Cells* 11:743.
458 <https://doi.org/10.3390/cells11040743>
- 459 17. Jia L, Tu Y, Jia X, et al (2021) Probiotics ameliorate alveolar bone loss by regulating
460 gut microbiota. *Cell Proliferation* 54:. <https://doi.org/10.1111/cpr.13075>
- 461 18. Collins FL, Rios-Arce ND, Schepper JD, et al (2017) The Potential of Probiotics as a
462 Therapy for Osteoporosis. *Microbiology Spectrum* 5:.
463 <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAD-0015-2016>
- 464 19. Moher D, Shamseer L, Clarke M, et al (2015) Preferred reporting items for systematic
465 review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Systematic Reviews*
466 4:1. <https://doi.org/10.1186/2046-4053-4-1>
- 467 20. Macleod MR, Lawson McLean A, Kyriakopoulou A, et al (2015) Risk of Bias in
468 Reports of In Vivo Research: A Focus for Improvement. *PLOS Biology* 13:e1002273.
469 <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002273>
- 470 21. Krauth D, Woodruff TJ, Bero L (2013) Instruments for Assessing Risk of Bias and
471 Other Methodological Criteria of Published Animal Studies: A Systematic Review.
472 *Environmental Health Perspectives* 121:985–992. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206389>
- 473 22. Sapra L, Shokeen N, Porwal K, et al (2022) *Bifidobacterium longum* Ameliorates
474 Ovariectomy-Induced Bone Loss via Enhancing Anti-Osteoclastogenic and
475 Immunomodulatory Potential of Regulatory B Cells (Bregs). *Frontiers in Immunology*
476 13:1–19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.875788>
- 477 23. Montazeri-Najafabady N, Ghasemi Y, Dabbaghmanesh MH, et al (2019) Supportive
478 Role of Probiotic Strains in Protecting Rats from Ovariectomy-Induced Cortical Bone
479 Loss. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 11:1145–1154.
480 <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9443-6>
- 481 24. Montazeri-Najafabady N, Ghasemi Y, Dabbaghmanesh MH, et al (2021) Exploring the
482 bone sparing effects of postbiotics in the post-menopausal rat model. *BMC*
483 *Complementary Medicine and Therapies* 21:1–12. [https://doi.org/10.1186/s12906-021-](https://doi.org/10.1186/s12906-021-03327-w)
484 [03327-w](https://doi.org/10.1186/s12906-021-03327-w)
- 485 25. Parvaneh K, Ebrahimi M, Sabran MR, et al (2015) Probiotics (*Bifidobacterium*
486 *longum*) Increase Bone Mass Density and Upregulate Sparc and Bmp-2 Genes in Rats
487 with Bone Loss Resulting from Ovariectomy. *BioMed Research International* 2015:1–
488 10. <https://doi.org/10.1155/2015/897639>
- 489 26. Słupski W, Jawień P, Nowak B (2021) Botanicals in postmenopausal osteoporosis.
490 *Nutrients* 13:. <https://doi.org/10.3390/nu13051609>
- 491 27. Yong Eu-Leong, Logan Susan (2021) Smj-62-159. *Singapore Medical Journal* 62:156–
492 166

- 493 28. Khosla S, Hofbauer LC (2017) Osteoporosis treatment: recent developments and
494 ongoing challenges. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 5:898–907.
495 [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(17\)30188-2](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(17)30188-2)
- 496 29. Compston JE, McClung MR, Leslie WD (2019) Osteoporosis seminar
497 2019COMPSTON, J. E.; MCCLUNG, M. R.; LESLIE, W. D. Osteoporosis seminar
498 2019. *The Lancet*, v. 393, n. 10169, p. 364–376, 2019. *The Lancet* 393:364–376
- 499 30. Yamamoto K, Kishino M, Nakamura S, Tokushige K (2019) Symptoms and Upper
500 Gastrointestinal Mucosal Injury Associated with Bisphosphonate Therapy. *Internal*
501 *Medicine* 58:1049–1056. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.1271-18>
- 502 31. Arantes HP, Silva AG da, Lazaretti-Castro M (2010) Bisphosphonates in the treatment
503 of metabolic bone diseases. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*
504 54:206–212. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302010000200017>
- 505 32. Novriadi R, Prihadi TH, Saragih HSD, et al (2023) Well-defined multispecies probiotic
506 and enzyme combination outperforms traditional fermented probiotic applications in an
507 intensive Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), culture system.
508 *Journal of the World Aquaculture Society* 54:156–166.
509 <https://doi.org/10.1111/jwas.12935>
- 510 33. Tsvetov G, Amitai O, Shochat T, et al (2020) Denosumab-induced hypocalcemia in
511 patients with osteoporosis: can you know who will get low? *Osteoporosis International*
512 31:655–665. <https://doi.org/10.1007/s00198-019-05261-7>
- 513 34. Beral V, Bull D, Reeves G, Million Women Study Collaborators (2005) Endometrial
514 cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *The Lancet*
515 365:1543–1551. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66455-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66455-0)
- 516 35. Group on Hormonal Factors in Breast Cancer C (2019) Type and timing of menopausal
517 hormone therapy and breast cancer risk: individual participant meta-analysis of the
518 worldwide epidemiological evidence. *The Lancet* 394:1159–1168.
519 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31709-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31709-X)
- 520 36. Aibar-Almazán A, Voltés-Martínez A, Castellote-Caballero Y, et al (2022) Current
521 Status of the Diagnosis and Management of Osteoporosis. *International Journal of*
522 *Molecular Sciences* 23:9465. <https://doi.org/10.3390/ijms23169465>
- 523 37. Hamilton S, Terentyev D (2019) Altered Intracellular Calcium Homeostasis and
524 Arrhythmogenesis in the Aged Heart. *International Journal of Molecular Sciences*
525 20:2386. <https://doi.org/10.3390/ijms20102386>
- 526 38. Madison A, Kiecolt-Glaser JK (2019) Stress, depression, diet, and the gut microbiota:
527 human–bacteria interactions at the core of psychoneuroimmunology and nutrition.
528 *Current Opinion in Behavioral Sciences* 28:105–110.
529 <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2019.01.011>
- 530 39. Kalu DN (1991) The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and*
531 *mineral* 15:175–91
- 532 40. Artoni de Carvalho JA, Magalhães LR, Polastri LM, et al (2023) Prebiotics improve
533 osteoporosis indicators in a preclinical model: systematic review with meta-analysis.
534 *Nutrition Reviews* 81:891–903. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuac097>
- 535 41. Alcon-Giner C, Dalby MJ, Caim S, et al (2020) Microbiota Supplementation with

- 536 Bifidobacterium and Lactobacillus Modifies the Preterm Infant Gut Microbiota and
537 Metabolome: An Observational Study. *Cell Reports Medicine* 1:.
538 <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100077>
- 539 42. Pokusaeva K, Fitzgerald GF, Van Sinderen D (2011) Carbohydrate metabolism in
540 Bifidobacteria. *Genes and Nutrition* 6:285–306
- 541 43. Lordan C, Roche AK, Delsing D, et al (2024) Linking human milk oligosaccharide
542 metabolism and early life gut microbiota: bifidobacteria and beyond. *Microbiology and*
543 *Molecular Biology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00094-23>
- 544 44. Lyu Z, Hu Y, Guo Y, Liu D (2023) Modulation of bone remodeling by the gut
545 microbiota: a new therapy for osteoporosis. *Bone Research* 11:31.
546 <https://doi.org/10.1038/s41413-023-00264-x>
- 547 45. Ohta A, Ohtsuki M, Baba S, et al (1995) Calcium and Magnesium Absorption from the
548 Colon and Rectum Are Increased in Rats Fed Fructooligosaccharides. *The Journal of*
549 *Nutrition* 125:2417–2424. <https://doi.org/10.1093/jn/125.9.2417>
- 550 46. Legette LL, Lee W, Martin BR, et al (2012) Prebiotics Enhance Magnesium
551 Absorption and Inulin-based Fibers Exert Chronic Effects on Calcium Utilization in a
552 Postmenopausal Rodent Model. *Journal of Food Science* 77:88–94.
553 <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02612.x>
- 554 47. Helgason B, Perilli E, Schileo E, et al (2008) Mathematical relationships between bone
555 density and mechanical properties: A literature review. *Clinical Biomechanics* 23:135–
556 146. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiomech.2007.08.024>
- 557 48. Mathey J, Mardon J, Fokialakis N, et al (2007) Modulation of soy isoflavones
558 bioavailability and subsequent effects on bone health in ovariectomized rats: the case
559 for equol. *Osteoporosis International* 18:671–679. [https://doi.org/10.1007/s00198-007-](https://doi.org/10.1007/s00198-007-0351-y)
560 0351-y
- 561 49. Roberts JL, Liu G, Darby TM, et al (2020) Bifidobacterium adolescentis
562 supplementation attenuates fracture-induced systemic sequelae. *Biomedicine and*
563 *Pharmacotherapy* 132:. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110831>
- 564 50. Roberts JL, Gollosi M, Harding DB, et al (2023) Bifidobacterium longum
565 supplementation improves age-related delays in fracture repair. *Aging Cell* 22:1–17.
566 <https://doi.org/10.1111/acel.13786>
- 567 51. Davis EC, Dinsmoor AM, Wang M, Donovan SM (2020) Microbiome Composition in
568 Pediatric Populations from Birth to Adolescence: Impact of Diet and Prebiotic and
569 Probiotic Interventions. *Digestive Diseases and Sciences* 65:706–722.
570 <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06092-x>
- 571 52. Ribeiro N, Sousa SR, Brekken RA, Monteiro FJ (2014) Role of SPARC in Bone
572 Remodeling and Cancer-Related Bone Metastasis. *Journal of Cellular Biochemistry*
573 115:17–26. <https://doi.org/10.1002/jcb.24649>
- 574 53. Cai H, Zou J, Wang W, Yang A (2021) BMP2 induces hMSC osteogenesis and matrix
575 remodeling. *Molecular Medicine Reports* 23:1–12.
576 <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11764>
- 577 54. Li S, Mao Y, Zhou F, et al (2020) Gut microbiome and osteoporosis. *Bone & Joint*
578 *Research* 9:524–530. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.98.BJR-2020-0089.R1>

- 579 55. Li J-YJ-Y, Chassaing B, Tyagi AM, et al (2016) Sex steroid deficiency-associated
580 bone loss is microbiota dependent and prevented by probiotics. *Journal of Clinical*
581 *Investigation* 126:2049–2063. <https://doi.org/10.1172/JCI86062>
- 582 56. Xu X, Jia X, Mo L, et al (2017) Intestinal microbiota: a potential target for the
583 treatment of postmenopausal osteoporosis. *Bone Research* 5:17046.
584 <https://doi.org/10.1038/boneres.2017.46>
- 585 57. Ibáñez L, Rouleau M, Wakkach A, Blin-Wakkach C (2019) Gut microbiome and bone.
586 *Joint Bone Spine* 86:43–47. <https://doi.org/10.1016/J.JBSPIN.2018.02.008>
- 587 58. Lanzillotti HS, Lanzillotti RS, Trotte APR, et al (2003) Osteoporose em mulheres na
588 pós-menopausa, cálcio dietético e outros fatores de risco. *Revista de Nutrição* 16:181–
589 193. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732003000200005>
- 590 59. Behera J, Ison J, Tyagi SC, Tyagi N (2020) The role of gut microbiota in bone
591 homeostasis. *Bone* 135:115317. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115317>
- 592 60. Heaney RP (2006) Calcium intake and disease prevention. *Arquivos Brasileiros de*
593 *Endocrinologia & Metabologia* 50:685–693. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302006000400014>
- 595 61. Heaney RP, Weaver CM (2005) Newer perspectives on calcium nutrition and bone
596 quality. *Journal of the American College of Nutrition* 24:574S-581S
- 597 62. (2022) World Congress on Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases
598 (WCO-IOF-ESCEO 2022). *Aging Clinical and Experimental Research* 34:35–474.
599 <https://doi.org/10.1007/s40520-022-02147-3>
- 600 63. Abdul-Majeed S, Mohamed N, Soelaiman I-N (2015) The use of delta-tocotrienol and
601 lovastatin for anti-osteoporotic therapy. *Life Sciences* 125:42–48.
602 <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.12.012>
- 603 64. Muhammad N, Luke DA, Shuid AN, et al (2012) Two Different Isomers of Vitamin E
604 Prevent Bone Loss in Postmenopausal Osteoporosis Rat Model. *Evidence-Based*
605 *Complementary and Alternative Medicine* 2012:1–7.
606 <https://doi.org/10.1155/2012/161527>
- 607 65. Legrand E, Chappard D, Pascaretti C, et al (2000) Trabecular Bone Microarchitecture,
608 Bone Mineral Density, and Vertebral Fractures in Male Osteoporosis. *Journal of Bone*
609 *and Mineral Research* 15:13–19. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.1.13>
- 610 66. Chiang S-S, Pan T-M (2011) Antiosteoporotic Effects of *Lactobacillus* -Fermented Soy
611 Skim Milk on Bone Mineral Density and the Microstructure of Femoral Bone in
612 Ovariectomized Mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:7734–7742.
613 <https://doi.org/10.1021/jf2013716>
- 614 67. Shim K-S, Kim T, Ha H, et al (2013) *Lactobacillus* fermentation enhances the
615 inhibitory effect of Hwangryun-haedok-tang in an ovariectomy-induced bone loss.
616 *BMC Complementary and Alternative Medicine* 13:106. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-106>
- 618 68. Berdud I, Martin-Malo A, Almaden Y, et al (1998) The PTH-Calcium Relationship
619 During a Range of Infused PTH Doses in the Parathyroidectomized Rat. *Calcified*
620 *Tissue International* 62:457–461. <https://doi.org/10.1007/s002239900460>

- 621 69. Kemi VE, Kärkkäinen MUM, Lamberg-Allardt CJE (2006) High phosphorus intakes
622 acutely and negatively affect Ca and bone metabolism in a dose-dependent manner in
623 healthy young females. *British Journal of Nutrition* 96:545–552.
624 <https://doi.org/10.1079/BJN20061838>

625

ANEXO A- PARECER APROVAÇÃO DO PROJETO CAPI

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

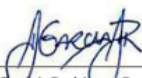
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROBIC - Programa de Bolsas de Iniciação Científica

Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO **BIFIDOBACTERIUM**, **PROBIÓTICO**, EM MURINOS COM OSTEOPOROSE INDUZIDA: REVISÃO SISTEMÁTICA", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº **8289** e tendo como participante(s) **ADRIANO MESSIAS DE SOUZA** (discente), **FABIO JOSE MARTINS PINTO** (discente), **GIOVANNA MARANI BERNABE** (discente), **ANA CLARA ALVIM CANCELLI** (discente), **HERMANN BREMER NETO** (orientador responsável), foi avaliado e **APROVADO** pelo **COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI)** da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.


Presidente Prudente, 22 de Fevereiro de 2024.



Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.
Docente Responsável pela CPDI

ANEXO B- NORMAS DE PUBLICAÇÃO PARA REVISTA

[Home](#) > [Journal of Bone and Mineral Metabolism](#) > [Submission guidelines](#)



Journal of Bone and Mineral Metabolism

Publishing model
Hybrid

[Submit your manuscript](#)

Submission guidelines

Contents

- [Instructions for Authors](#)
 - [EDITORIAL POLICIES](#)
 - [ALL CORRESPONDENCE SHOULD BE SENT TO:](#)
 - [MANUSCRIPT SUBMISSION VIA EDITORIAL MANAGER](#)
 - [EDITORIAL MANAGER REQUIREMENTS:](#)
 - [AUTHOR ACCOUNTS](#)
 - [GETTING STARTED](#)
 - [UPLOADING FILES](#)
 - [KEEPING TRACK](#)
 - [HUMAN AND ANIMAL STUDIES](#)
 - [INFORMED CONSENT](#)
 - [PREPARATION OF MANUSCRIPTS](#)
 - [TABLES AND ILLUSTRATIONS](#)
 - [ABBREVIATIONS AND NOMENCLATURE](#)
 - [REFERENCES](#)
 - [ARTWORK GUIDELINE](#)
 - [ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL](#)
 - [CONFLICT OF INTEREST POLICY](#)
 - [ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS](#)

- [Authorship principles](#)
- [After Acceptance](#)
- [Open access publishing](#)
- [Mistakes to avoid during manuscript preparation](#)

Instructions for Authors

EDITORIAL POLICIES

The Journal of Bone and Mineral Metabolism (JBMM) publishes:

(1) Original articles

(2) Review articles

(3) Perspective

(4) Letter to Editor

Manuscripts are received with the understanding that they have not been published or submitted for publication in whole or part elsewhere. This restriction does not apply to abstracts published in connection with scientific meetings. All papers are reviewed by at least two referees, and acceptance is decided by the editorial board of the Japanese Society for Bone and Mineral Research and the Japanese Society for Bone Morphometry.

ALL CORRESPONDENCE SHOULD BE SENT TO:
Editorial Office, Journal of Bone and Mineral Metabolism

c/o Academic Square Co., Ltd.

2-348-302 Ryogae-machi, Fushimi-ku, Kyoto 612-8082, Japan

Tel 81-75-468-8772; Fax 81-75-468-8773

e-mail: jbmm@ac-square.co.jp

Prerequisites for publication: A Certification Form, included in each issue, and which also may be downloaded from: <http://www.springer.com/774>, must be signed by all authors and be scanned and uploaded through Editorial Manager at the same time you submit your manuscript.

IMPORTANT: Upon receipt of a Certification Form, manuscripts are officially recognized as submissions.

[Certification Form \(Download pdf, 35 kB\)](#)

MANUSCRIPT SUBMISSION VIA EDITORIAL MANAGER

Authors should submit their manuscripts to JBMM online. Please log in directly at: <https://www.editorialmanager.com/jbmm> and upload your manuscript following the instructions given. If you encounter any difficulties while submitting your manuscript online, click on Help in the upper left corner.

EDITORIAL MANAGER REQUIREMENTS:

Please use the Help option to see the most recently updated system requirements.

Electronic files of the manuscript text

Electronic files of the manuscript figures and illustrations

AUTHOR ACCOUNTS

Authors entering the journal's Editorial Manager site can either create a new account or use an existing one. When you have an existing account, use it for all your submissions;

you can track their status on the same page.

If you have forgotten your username and password, please click the link "Send Username/Password" and enter your mail address. You will then receive an automatic e-mail with your user name and password. Alternatively, please create a new account and then follow the instructions given on the screen.

GETTING STARTED

Once you have logged into your account, Editorial Manager will lead you through the submission process in an orderly, step-by-step process. If you cannot finish your submission in one visit, you can save a draft and re-enter the process later at the same point for that manuscript.

While submitting your electronic manuscript, you will be required to enter data about your manuscript in the system. These include full title, author names and affiliations, and so forth, as listed below under Preparation of Manuscripts. Support for special characters is available.

UPLOADING FILES

- **Main Documents:** Main documents of articles should be uploaded as a Microsoft Word document.
- **Tables:** Use the table functions of your word-processing program, not spreadsheets, to make tables. Tables should be inserted into the main document.
- **Figures:** Common graphic files such as GIF, JPEG, EPS, and TIFF are supported. Please upload figures that are satisfactory for the review process. If your manuscript is accepted for publication, you will be required to provide figures/illustrations of sufficient quality for printing according to Requirements for Electronically Produced Illustrations for Accepted Papers toward the end of these instructions.

After uploading the parts of the article in this manner, the system will convert the files to PDF format. You can view the result of the conversion with Adobe Acrobat Reader. You will also be notified by e-mail that your submission was successful.

At any point during this process, there are Help buttons available to see frequently asked questions.

If the total size of the files exceeds the file volume (20 MB) for online submission, reduce the resolution of large files for initial submission.

KEEPING TRACK

After submission, you may return and monitor the progress of your submission through the review process.

HUMAN AND ANIMAL STUDIES

All human studies must be conducted according to the Declaration of Helsinki principles. Authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional review board(s) (IRB), together with a statement that written informed consent was received from participants prior to inclusion in the study.

For animal studies, authors should state that the studies have been approved by the appropriate institutional review board(s) and conducted according to all applicable institutional and/or national guidelines for the care and use of animals.

These statements should be included in an independent paragraph in the Methods section of the manuscript. Manuscripts without the paragraph will not be reviewed.

INFORMED CONSENT

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies e.g. have the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered and to what they have said e.g. during a study or an interview as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) has given written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

Informed consent: “Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.”

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

“Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.”

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements dealing with ethical concerns. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements.

PREPARATION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be double-spaced. Leave margins of approximately 3 cm on the sides, top, and bottom of the page.

Three manuscript pages correspond to about one printed page. The title page should include the authors’ names, addresses, and affiliations. Please indicate the name,

address, phone number and e-mail address of the author who is to receive correspondence. Provide up to five key words.

Articles should have the following format: Title page, text, conflict of interest, references, tables, figure legends, and artwork. Number pages consecutively. Consult a current issue of the journal for the exact format.

1. Original Articles

Articles should have the following format: Title page, abstract, main text, author contributions, acknowledgments, references, tables with footnotes, figure legends, and figures. Number pages consecutively. Consult a current issue of the journal for the exact format.

Title should be clear, concise, informative, and limited to no more than 15 words. For publication, titles may be revised by the JBMM to ensure clarity and accessibility to our readers, with the final approval of the authors.

Provide a structured abstract of no more than 250 words which should be divided into the following sections:

- Introduction

- Materials and Methods

- Results

- Conclusion

Main text including Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion should be limited to 5,000 words.

Provide acknowledgments and author contributions, specifying how each author (identified by initials) contributed to the manuscript.

Up to 50 References should be provided.

Tables are self-contained and self-explanatory with brief titles.

Figures and Figure legends, provide a short title and an explanation in brief but sufficient detail to make the figure intelligible without reference to the main text

Figures and Tables should be no more than 7 items.

Supplemental data, authors may provide related supplemental data.

2. Review Articles

The editorial board invites selected investigators to submit review articles. Unsolicited reviews are also acceptable pending peer review by the editorial board.

Title should be clear, concise and limited to no more than 10 words.

Abstracts or a concluding summary should be no more than 200 words.

Main text should be no more than 3000 words. Reference should be limited to no more than 50.

Figures and Tables should be no more than 5 items.

All Review Articles, whether invited or not, will be subject to peer review.

3. Perspectives

Perspectives are more focused than reviews and may be accepted from a single individual or team. Perspectives may be solicited or proposed.

Perspectives should review a particular field to identify outstanding issues and challenges and propose new hypotheses.

Please note that any Perspective will be subject to the standard review process.

4. Letters to the Editor

Letters to the Editor should contribute constructively and substantively to scientific dialogue, and should concern timely and important issues raised in articles recently published in the JBMM. Letters to the Editor should not exceed 400 words.

No more than 5 references may be provided, and the first one must be the original article under discussion. If necessary, one figure or table may be included.

TABLES AND ILLUSTRATIONS

Prepare each table (with its title) on a separate page. Use Arabic numerals to number tables. Each table must be able to stand alone, i.e., it must contain enough information to be understood independently of the text. Details of experimental conditions, statistical significance, and the definition of all abbreviations should be included in the table footnotes. Information that appears in the text should not be repeated in detail in the tables, and tables should not contain data that can be given in the text in one or two sentences.

All figures are to be numbered using Arabic numerals. Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.). If illustrations are supplied with uppercase labeling, lowercase letters will still be used in the figure captions and citations. For all figures, double-spaced figure legends should be supplied on a separate page. Magnifications should be included when appropriate, and all abbreviations must be defined.

All tables and figures must be cited in order in the text.

If a figure has been published previously, acknowledge its source and submit written permission from the author and publisher. The previously published source should also be included in the list of references.

ABBREVIATIONS AND NOMENCLATURE

Abbreviations and nomenclature should follow the recommendations of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry at the web sites, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/jcfn/>. All quantities stated should conform to the International System of Units (SI units). The list of abbreviations in *Endocrinology* 138: 1 (January 1997) is generally acceptable in JBMM. Drug names should always be generic. Please give the name and location (city, state, country) of the manufacturer of any equipment referred to in your manuscript.

REFERENCES

Number references consecutively in the order cited in the text using square brackets:—as shown by Suzuki et al. [1], Fujita et al. [2], Brown and Roberts [3].

References should be listed in numerical order at the end of the article. References should include the names of all authors when 19 or less; when 20 or more, list only the first 5 names and add et al.

References should also include the full title. Journal titles should be abbreviated according to Index Medicus and inclusive page numbers should be supplied.

The styling of the reference list for

1. journal articles

2. journal articles in Japanese

3. books

4. and chapters in edited books

is as follows:

1. Tezuka K, Wada Y, Takahashi A (2005) Computersimulated bone architecture in a simple bone-remodeling model based on a reaction-diffusion system. *J Bone Miner Metab* 23:1–7

2. Ishida Y (1998) Studies on induction mechanism of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine especially on the cultured cells from the human spinal ligament (in Japanese). *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi (J Jpn Orthop Assoc)* 62:1019–1027

3. Takahashi HE (1999) *Mechanical Loading of Bones and Joints*. Springer, Tokyo

4. Suzuki F (1994) Regulation of cartilage differentiation and metabolism. In: Heersche JNM, Kanis JA (eds) *Bone and Mineral Research* 8. Elsevier, Amsterdam, pp 115–142

ARTWORK GUIDELINE

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.

- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary

distinctions between the different colors are still apparent.

- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions into your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in the text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article/chapter and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1.

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Electronic supplementary material will be published in the online version only.

It may consist of

- Information that cannot be printed: animations, video clips, sound recordings
- Information that is more convenient in electronic form: sequences, spectral data, etc.
- Large original data, e.g. additional tables, illustrations, etc.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.

- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized formats such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contain a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

CONFLICT OF INTEREST POLICY

Authors are required to disclose commercial or similar relationships to products or companies mentioned in or related to the subject matter of the article being submitted. Affiliations of authors should include corporate appointments relating to or in connection with products or companies mentioned in the article, or otherwise bearing on the subject matter thereof. Sources of funding for the article should be included in the acknowledgments. Other pertinent financial relationships, such as consultancies, stock ownership, or other equity interests or patent-licensing arrangements, should be disclosed in the cover letter to the Editor-in-Chief, on a separate conflict of interest page in the manuscript (see below for examples of how

to format the conflict of interest page in your manuscript) and on the conflict of interest form accompanying the article at the time of submission. The conflict of interest form, which is available at: <http://www.springer.com/774>, should be signed, scanned, and submitted through Editorial Manager. The conflicts of interest disclosed on the conflict of interest form should be the same as those disclosed on the conflict of interest page in the manuscript. Questions about this policy should be directed to the Editor-in-Chief.

Please note: When considered necessary, the raw data of a manuscript will be requested to be submitted and examined by a third-party.

Examples:

The conflict of interest page should take the form of a statement as shown in the following examples.

- Dr. YYYYYY serves as a consultant for Company X.
- Dr. XXXXXX is an employee of Company Y.
- Dr. XXXXXX owns stock in Company Z.
- All other authors have no conflicts of interest.
- If no author has a conflict, the statement should read “All authors have no conflicts of interest.”

[Conflict of Interest form \(Download pdf, 36 kB\)](#)

ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics ([COPE](#)) the journal will follow the [COPE](#) guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”)).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, before the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.
- Authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission. Changes of authorship or in the order of authors are not accepted after acceptance of a manuscript.
- Adding and/or deleting authors and/or changing the order of authors at revision stage may be justifiably warranted. A letter must accompany the revised manuscript to explain the reason for the change(s) and the contribution role(s) of the added and/or deleted author(s). Further documentation may be required to support your request.

- Requests for addition or removal of authors as a result of authorship disputes after acceptance are honored after formal notification by the institute or independent body and/or when there is agreement between all authors.
- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential proprietary data is excluded.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the [COPE](#) guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note. Please note that retraction means that the paper is maintained on the platform, watermarked "retracted" and explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.
- The author's institution may be informed.

Authorship principles

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to.

Authorship clarified

The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are

applicable in their specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines*:

All authors whose names appear on the submission

- 1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;
- 2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;
- 3) approved the version to be published; and
- 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

* Based on/adapted from:

[ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors,](#)

[Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNutt at all, PNAS February 27, 2018](#)

Disclosures and declarations

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or non-financial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate).

The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

Data transparency

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards. Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and expectations.

Role of the Corresponding Author

One author is assigned as Corresponding Author and acts on behalf of all co-authors and ensures that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately addressed.

The Corresponding Author is responsible for the following requirements:

- ensuring that all listed authors have approved the manuscript before submission, including the names and order of authors;
- managing all communication between the Journal and all co-authors, before and after publication;*
- providing transparency on re-use of material and mention any unpublished material (for example manuscripts in press) included in the manuscript in a cover letter to the Editor;
- making sure disclosures, declarations and transparency on data statements from all authors are included in the manuscript as appropriate (see above).

* The requirement of managing all communication between the journal and all co-authors during submission and proofing may be delegated to a Contact or Submitting Author. In this case please make sure the Corresponding Author is clearly indicated in the manuscript.

Author contributions

In absence of specific instructions and in research fields where it is possible to describe discrete efforts, the Publisher recommends authors to include contribution statements in the work that specifies the contribution of every author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the separate title page.

Examples of such statement(s) are shown below:

- Free text:

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Example: CRediT taxonomy:

- Conceptualization: [full name], ...; Methodology: [full name], ...; Formal analysis and investigation: [full name], ...; Writing - original draft preparation: [full name, ...]; Writing - review and editing: [full name], ...; Funding acquisition: [full name], ...; Resources: [full name], ...; Supervision: [full name],....

For **review articles** where discrete statements are less applicable a statement should be included who had the idea for the article, who performed the literature search and data analysis, and who drafted and/or critically revised the work.

For articles that are based primarily on the **student's dissertation or thesis**, it is recommended that the student is usually listed as principal author:

A Graduate Student's Guide to Determining Authorship Credit and Authorship Order, APA Science Student Council 2006

Affiliation

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated. Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

Changes to authorship

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, the Corresponding Author, and the order of authors at submission. Changes of authorship by adding or deleting authors, and/or changes in Corresponding Author, and/or changes in the sequence of authors are **not accepted after acceptance** of a manuscript.

- **Please note that author names will be published exactly as they appear on the accepted submission!**

Please make sure that the names of all authors are present and correctly spelled, and that addresses and affiliations are current.

Adding and/or deleting authors at revision stage are generally not permitted, but in some cases it may be warranted. Reasons for these changes in authorship should be explained. Approval of the change during revision is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

Author identification

Authors are recommended to use their [ORCID](#) ID when submitting an article for consideration or acquire an [ORCID](#) ID via the submission process.

Deceased or incapacitated authors

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peer-review process, and the co-authors feel it is appropriate to include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

Authorship issues or disputes

In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

Confidentiality

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

After Acceptance

Upon acceptance, your article will be exported to Production to undergo typesetting. Shortly after this you will receive two e-mails. One contains a request to confirm your affiliation, choose the publishing model for your article, as well as to arrange rights and payment of any associated publication cost. A second e-mail containing a link to your article's proofs will be sent once typesetting is completed.

Article publishing agreement

Depending on the ownership of the journal and its policies, you will either grant the Publisher an exclusive licence to publish the article or will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Publication of color illustrations is free of charge.

Proofreading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Open access publishing

To find out more about publishing your work Open Access in *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, including information on fees, funding and licenses, visit our [Open access publishing page](#).