

VINÍCIUS CAROLINO DE SOUZA

**ASSOCIAÇÃO DA OSTEOPONTINA COM DENSIDADE MINERAL ÓSSEA EM
INDIVÍDUOS MUITO IDOSOS.**

BRASÍLIA - DF, 2012.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

VINÍCIUS CAROLINO DE SOUZA

**ASSOCIAÇÃO DA OSTEOPONTINA COM DENSIDADE MINERAL ÓSSEA EM
INDIVÍDUOS MUITO IDOSOS.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Otávio de Tolêdo Nóbrega

BRASÍLIA - DF

2012.

VINÍCIUS CAROLINO DE SOUZA

**ASSOCIAÇÃO DA OSTEOPONTINA COM DENSIDADE MINERAL ÓSSEA EM
INDIVÍDUOS MUITO IDOSOS.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 28 de Novembro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Otávio Tolêdo Nóbrega – **(Presidente)**

Universidade de Brasília

Herbert Gustavo Simões – **(Membro)**

Universidade Católica de Brasília

Aparecido Pimentel Ferreira – **(Membro)**

UNICESP/PROMOVE

Claudio Olavo de Almeida Córdova – **(Suplente)**

Universidade Católica de Brasília

*Dedico este
trabalho aos meus Pais,
minha Esposa e meu
Irmão. Pois sempre
estiveram do meu lado.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela inspiração e força com que me conduziu. Pelo cuidado que Ele teve comigo todos esses tempos. Pela sabedoria no qual venho conquistando a cada dia que se passa, pois sei que ela vem Dele.

Aos meus Pais, Maurilio e Fátima, pelo apoio incondicional na minha vida, não importando qual seja área da minha vida. Onde sempre frisaram que a única herança que eu tenho e que ninguém pode me tirar são os meus estudos. Nunca me esquecerei dessas palavras que me foi dita antes mesmo de concluir minha graduação. Agradeço por vocês sempre estarem ao meu lado, não importando qual seja a situação.

Ao meu Irmão André, que com seu jeito único sempre me incentivou nas minhas adversidades, falando “esse é meu irmão Cabeção”. “*Tamo junto*” pra sempre!!

A minha Esposa Lorena, que sempre esteve ao meu lado, seja qual for à circunstância. Pelo apoio, incentivo, compreensão, e por sempre estar em prontidão a me ouvir. Mesmo tendo que abrir mão de alguns finais de semana, pois lá estava eu enfiado no quarto de estudo escrevendo, estudando ou preparando aula. Qualquer palavra que eu disser será pouco pra expressar o que você é pra mim. Agradeço a Deus por tê-la em minha vida!!

Ao meu orientador e amigo Prof^o Otávio de Tolêdo Nóbrega, no qual tenho um carinho muito especial. Sempre disposto a me ajudar em qualquer momento da minha caminhada, seja ela profissional ou pessoal, pelos ensinamentos e conselhos que sempre escutei com muita atenção e carinho. É um exemplo de Ser Humano. Orientadores como o senhor nos dias de hoje são raros, e eu posso dizer que tive o privilégio de tê-lo como orientador.

Aos meus amigos Wladimir Freitas, Claudio Córdova, Alexandre Soares, Audrey Tonet, Luis Guaglia e Andrei Sposito do Projeto Geros da Biocárdios, pois me receberam de braços abertos e confiaram no meu trabalho. Eu estarei sempre me esforçando para que possamos estar colhendo muitos frutos no meio científico.

Aos meus Amigos Prof^o Marcelo Sales, Prof^o Rafael Sotero, Prof^a Verusca Najara, Prof^o Ricardo Asano, Prof^o Jonato Prestes, Prof^o Claudio Córdova, Prof^o Daniel Boullosa, Prof^a Carmem Campbell e Prof^o Herbert Simões do programa de pós-graduação da Educação física - UCB, pois cada um com seu jeito, sempre

estiveram me incentivando e ajudando no meu crescimento como profissional e ser humano. Pela confiança em meu trabalho, por acreditarem em mim.

Aos meus Amigos de trabalho Diego Nakashoji, Rodrigo Zolini, Marcos Sodré pelo apoio e momento de descontração diante dificuldades que surgiram neste trabalho. Pelos bons momentos de risadas.

A Universidade Católica de Brasília que me possibilitou desenvolver este trabalho em suas dependências. Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

Em especial a todos os pacientes e familiares que se dispuseram a participar deste trabalho, para o crescimento da ciência.

Finalmente, partindo da premissa de que ninguém faz nada sem ajuda, agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, concorreram para que o presente trabalho se desenvolvesse e pudesse ser concluído.

“O homem sábio é forte, e o homem de conhecimento consolida a força”. (Provérbios, 24.5)

“Os sábios entesouram o conhecimento, mas a boca do néscio é uma ruína iminente”. (Provérbios, 10.14)

“O caminho para vida é de quem guarda o ensino, mas o que abandona a repreensão anda errado”. (Provérbios 10.17)

RESUMO

Introdução e objetivo: Dado que a concentração sérica de osteopontina (OPN) constitui promessa de marcador para o diagnóstico precoce de doenças ósseas, tecemos a hipótese de que um polimorfismo em seu gene poderia explicar níveis séricos diferenciais do mediador e, em sequência, os escores de densidade óssea entre adultos muito idosos no Brasil. **Métodos:** homens e mulheres (80 anos ou mais) residentes no Distrito Federal brasileiro foram submetidos a avaliação por densitometria óssea de raio-X de dupla energia para determinação da densidade mineral óssea (DMO) das regiões do colo do fêmur, cabeça do fêmur e lombosacral (L1 a S5). Exame clínico foi realizado para avaliar outras características físicas e para excluir co-morbidades (cardiovasculares, autoimunidade, infecções ou doenças neoplásicas). As concentrações séricas de OPN foram determinadas por ensaio imunoenzimático, enquanto o polimorfismo A7385G (rs1126772) foi determinada por sequenciamento direto dos produtos de reação em cadeia da polimerase. **Resultados:** Entre os duzentos e dez sujeitos envolvidos, não foram observados níveis diferenciais de densidade mineral óssea entre os genótipos, mas um teor circulatório aumentado de OPN foi encontrado entre os portadores do alelo A ($P \leq 0,05$) mesmo após os ajustes. Os níveis séricos de OPN foram negativamente correlacionados com a densidade do colo do fêmur ($P = 0,050$ para a DMO; $P = 0,032$ para T-score), mas não os níveis de outras regiões investigadas. As análises com a amostra dicotomizada para idade e massa corporal revelou que esta associação foi perceptível apenas entre os sujeitos pertencentes à faixa etária mais avançada e aos com peso corporal dentro do intervalo inferior. **Conclusão:** Nossos achados apontam para níveis circulantes elevados de osteopontina entre pacientes com densidade mineral óssea diminuída, consistente com uma modesta contribuição de uma variação alélica OPN para a expressão do mediador. Atestar relevância clínica destes achados exige estudos futuros.

Palavras-chave: densidade óssea; osteoporose; remodelação óssea; polimorfismo; biomarcador; envelhecimento.

ABSTRACT

Introduction and objective: Given that serum osteopontin (OPN) concentrations may be a promising marker for early diagnosis of bone disorders, we hypothesized that a polymorphism in its gene might account to differential serum levels of the mediator and thus to the bone density scores among very-old adults in Brazil. **Methods:** Men and women (80 years or older) living in the Brazilian Federal District underwent assessments with dual energy X-ray absorptiometry for bone mineral density (BMD) of the femoral neck, femoral head and lumbar-sacral (L1 to S5) regions. Clinical inspection was performed to assess other physical traits and to exclude co-morbidities (cardiovascular, autoimmunity, infections or neoplastic diseases). Serum concentrations of OPN were determined with an enzyme-linked immunosorbent assay, whereas the A7385G polymorphism (rs1126772) was determined by direct sequencing of a polymerase chain reaction product. **Results:** Among the two hundred and ten subjects enrolled, no differential scores for bone mineral density could be observed across genotypes, but a greater content of circulating OPN was found among carriers of the A allele ($P \leq 0.05$) even after adjustments. Serum OPN levels were negatively correlated with the femoral neck density ($P = 0.050$ for BMD; $P = 0.032$ for T-scores) but not with scores of the other regions investigated. Analyses with the sample dichotomized to age and body mass revealed that this inverse relationship was noticeable only among those aged within the highest and weighed within the lowest intervals. **Conclusion:** Our findings indicate elevated circulating osteopontin levels in patients with decreased bone mineral density, consistent with a modest contribution of an OPN allelic variation to its expression. Attesting clinical relevance of our findings demands forthcoming studies.

Key-words: bone density; osteoporosis; bone remodeling; polymorphism; biomarker; ageing.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	–	Duas Dimensões
3D	–	Três Dimensões
BMPs	–	<i>Bone morphogenetic proteins</i> (Proteínas morfogenéticas ósseas)
Células NK	–	Células Natural Killer
CMO	–	Conteúdo Mineral Ósseo
CTX	–	C-telopeptídeo do Colágeno Tipo I
DCNT	–	Doenças Crônica Não Transmissível
DEXA	–	<i>dual energy X-ray absorptiometry</i> (densitometria óssea com raio-X de dupla energia)
DMO	–	Densidade Mineral Óssea
FTIR	–	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Raman e Fourier
GLA	–	Ácido gama-carboxiglutâmico
HR-MRI	–	Ressonância Magnética em Imagem de Alta Resolução
HR-pQCT	–	Tomografia Computadorizada Quantitativa de Alta Resolução Periférica
IMC	–	Índice de Massa Corporal
OMS	–	Organização Mundial da Saúde
OPN	–	Osteopontina
NTX	–	N-telopéptidos do colágeno tipo I
P1NP	–	N-pró-péptidos de Colágeno do Tipo 1
qBSEI	–	imagem de elétrons retroespalhados quantitativa
RGD	–	Arg-Gly-Asp (argina–glicina–aspartato)
SAXS	–	Técnica de Dispersão de Raios-X em Pequeno Ângulo
TEM	–	Microscopia Eletrônica de Transmissão
TGF- β	–	Transforming growth factor beta (fator de transformação de crescimento Beta)
μ CT	–	Tomografia Computadorizada em Resolução Micrométrica de Radiação Síncrotron

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	11
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 – Envelhecimento Populacional	13
2.2 – Osso (tecido ósseo)	15
2.2.1 – Estrutura e Composição Óssea	15
2.2.2 – Qualidade Óssea	18
2.2.2.1 – Remodelação / Renovação Óssea	19
2.2.2.2 – Microarquitetura Óssea	21
2.2.2.3 – Mineralização e Matriz Óssea	22
2.2.2.4 – Avaliação dos Microdanos / Microlesões	24
2.3 – Densidade Mineral Óssea	25
2.3.1 – Densitometria Óssea (DEXA)	27
2.4 – Osteopontina	29
2.4.1 – Função	29
2.4.2 – Estrutura	31
3 – JUSTIFICATIVA	32
4 – OBJETIVOS	33
5 – MANUSCRITO	34
6 – DISCUSSÃO COMPLEMENTAR	53
7 – CONCLUSÃO	55
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXO A – APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA	72
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	73

1 INTRODUÇÃO

A transição demográfica encontra-se em diferentes fases ao redor do mundo. Em conjunto com a transição epidemiológica, resulta no principal fenômeno demográfico do século 20 e que se estende ao longo deste século, conhecido como envelhecimento populacional. Este fenômeno tem levado a uma reorganização do sistema de Saúde, pois essa população exige cuidados que são um desafio devido às doenças crônicas que apresentam, além do fato de que incorporam disfunções nos últimos anos de suas vidas. No grupo etário composto por pessoas acima de 65 anos, observou-se um crescimento de 3,5% em 1970 para 5,5% em 2000. Em 2050, este grupo etário deverá responder por 19% da população brasileira. Estes fatos levarão a uma drástica mudança de padrão na pirâmide populacional brasileira (1). Entretanto, é interessante observar o envelhecimento dentro da própria população idosa, pois vemos que, enquanto 17% dos idosos de ambos os sexos tinham 80 anos ou mais de idade, em 2050 corresponderão, provavelmente, a aproximadamente 28% do segmento. Na população feminina, o percentual das mais idosas passará de 18 para cerca de 30,8%, e assim presenciaremos o “envelhecimento” e “feminilização” da população muito-idosa (2). No ano de 2000, para cada cem mulheres idosas, havia 81 homens idosos; em 2050 haverá provavelmente cerca de 76 idosos para cem idosas. No grupo acima de 80 anos, estima-se que, em 2050, teremos duas idosas para cada idoso (3).

Na população idosa, a prevalência de distúrbios ósseos é elevada. O principal distúrbio ósseo consiste na osteoporose. Ela é conhecida como uma doença silenciosa por ser assintomática, pois o surgimento das primeiras manifestações clínicas ocorre quando já atinge perda da ordem de 30 a 40% de massa óssea (4,5,6,). A osteoporose é uma doença de importância crescente tendo-se em vista o aumento da expectativa de vida populacional, que no Brasil é de aproximadamente 72 anos para as mulheres (8). Estima-se que uma em cada duas mulheres assim como em um a cada cinco homens acima de 65 anos de idade apresentarão pelo menos uma fratura relacionada à osteoporose em algum momento da vida (9). A osteoporose atualmente afeta mais de 75 milhões de pessoas na Europa, Japão e os Estados Unidos, com um risco estimado de fraturas ao redor 15% (10). Dados

norte-americanos mostram que as fraturas devido à osteoporose são mais graves, letais em 12 a 20% dos casos e acarretam despesas médicas ao redor de dez bilhões de dólares (11). Sabe-se que a incidência de osteoporose entre mulheres chilenas acima de 50 anos de idade é de 22% (12). No Brasil, há escassez de dados referentes à população acometida pela osteoporose (9). Estima-se que aproximadamente 10 milhões de brasileiros sofram com osteoporose no país (13), sendo que 2,4 milhões sofrem fraturas anualmente e destes, cerca de 200 mil morrerão em decorrência direta de suas fraturas (14). Calcula-se que a osteoporose afete cerca de 35% das mulheres acima de 45 anos de idade em nosso país (15).

O DEXA é considerado como o método “padrão-ouro” em estudos de validação de métodos e equações para a avaliação da composição corporal. Por ser uma das técnicas densitométricas mais usadas no mundo para determinação da densidade óssea, isto faz com que tenha um destaque na aplicabilidade clínica. Pois há falta de marcadores bioquímicos de apoio ao diagnóstico, especialmente em indivíduos muito idosos (16,17).

Este trabalho pretende investigar a possibilidade de associação dos genótipos e níveis de OPN com distúrbios ósseos em indivíduos muito idosos, com vistas a estudar sua aplicabilidade como marcador molecular para integridade óssea nesse grupo etário.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Envelhecimento Populacional

O envelhecimento é um fenômeno complexo que ultimamente tem despertado grande interesse científico. O próprio envelhecimento populacional vem sendo apresentado como um dos maiores desafios da saúde pública contemporânea. O processo de transição demográfica caracterizada pela diminuição das taxas de mortalidade e de fecundidade tem proporcionado o aumento da população idosa mundial. Nos países desenvolvidos, a transição demográfica ocorreu gradativamente, facilitando a adaptação às condições necessárias para assistir aos idosos (17). O Brasil vem acompanhando essa tendência mundial, uma vez que entre as décadas de 40 e 70, houve grande aumento da expectativa de vida da população, devido, sobretudo às ações de saúde pública: vacinação, saneamento básico e aos avanços médico-tecnológicos (18,19). Esse processo intensificou-se a partir da década de 60, e a expectativa de vida ao nascer atingiu 68,6 anos em 2000 (17). A partir dos anos 80, o envelhecimento tornou-se um fenômeno que atinge grande parte do mundo, incluindo tanto países desenvolvidos como aqueles em desenvolvimento (20). O processo de envelhecimento no Brasil está associado, em geral, com as melhorias das condições médico-sanitárias, enquanto nos países desenvolvidos o processo está associado tanto com a evolução médico-sanitária como com a melhoria das condições de educação, saneamento básico, infraestrutura, condições sócio-econômicas dentre outros fatores (17,21).

Em nosso país, estima-se que em 2025, a população brasileira será cinco vezes maior que a de 1950, ao passo que o número de pessoas com idade superior a 60 anos terá aumentado cerca de quinze vezes. Essas alterações colocarão o Brasil na condição de portador da sexta maior população de idosos do mundo, em termos absolutos (22).

Algumas projeções pela Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que, entre 1990 e 2025, a população idosa aumentará de sete a oito vezes em países como Colômbia, Malásia, Quênia, Tailândia e Gana. As mesmas projeções indicam que, em 2025, o Brasil apresentará um número estimado de 27 milhões de pessoas acima de 60 anos de idade (23). Em paralelo às modificações observadas na

pirâmide populacional, as doenças próprias do envelhecimento ganham maior expressão no âmbito social. Em geral, a população de idosos apresenta uma alta prevalência de doenças crônicas, onde cerca de 90% deste contingente manifesta a menos uma DCNT (Doença Crônica Não Transmissível) (24). O grupo das DCNTs compreende majoritariamente as doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e doenças respiratórias crônicas, entre outras (25).

Claramente, um dos resultados dessa dinâmica consiste em uma demanda crescente por serviços de saúde. O idoso consome mais internações hospitalares assim como uma ocupação de leito por mais tempo quando comparado a outras faixas etárias. No geral, as doenças dos idosos são crônicas e múltiplas, perdurando por vários anos e exigindo acompanhamento constante, cuidados permanentes, assim como medicação contínua e exames periódicos (26).

Recentemente, os distúrbios ósseos, com ênfase para a osteoporose, têm sido reconhecidos como um dos maiores problemas de saúde pública do mundo, devido principalmente às altas taxas de morbi-mortalidade relacionadas com fraturas, particularmente entre mulheres idosas e em regiões anatômicas específicas, como quadril, vértebras e antebraço (27,28,29,30). A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica caracterizada por diminuição da massa óssea e deteriorização microarquitetural do tecido ósseo, com conseqüente aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade à fratura (27,31,32,33). No entanto, a perda de massa óssea consiste em uma conseqüência do processo de envelhecimento que, por si só, não explica a diversidade de etiologias para as fraturas observadas na prática clínica (34). Alterações da microarquitetura dos ossos que não afetam sua densidade aparente parecem contribuir para a fragilidade encontrada no segmento geriátrico da população. Entretanto, no indivíduo com osteoporose, a perda de massa óssea torna-se tão aparente que passa a constituir a principal variável de preocupação por parte da equipe clínica (28,35).

Sendo assim, torna-se indispensável o desenvolvimento de pesquisas que possam contribuir para o entendimento das alterações fisiológicas decorrentes do processo de envelhecimento, bem como das patologias associadas a este processo para que assim se possam criar mecanismos de intervenção terapêutica que auxiliem na melhoria da qualidade de vida do idoso.

2.2 Osso

2.2.1 Estrutura e Composição Óssea

O osso é um tecido bem organizado, baixo peso, e que fornece estrutura de suporte. Sua composição varia dependendo da sua localização, da idade, do histórico de alimentação além de outros aspectos do estilo de vida do indivíduo bem como pela existência de doenças (36). Categorizamos o osso em quatro componentes microestruturais: células, matriz orgânica, matriz inorgânica e fatores solúveis. Em termos de composição, o tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea, e que, portanto possui parte inorgânica e outra parte orgânica. A resistência óssea depende desta deposição assim como da arquitetura mineral (38,42). A matriz óssea é uma substância do tecido ósseo constituído de componentes orgânicos (35%) e inorgânicos (65%), e é encontrado em lacunas onde estão situados os osteócitos. A parte inorgânica do osso é constituída principalmente por uma matriz mineral de cálcio e fosfato, mas podem também ser encontrados íons de potássio, magnésio, citrato, sódio e bicarbonato. O cálcio e o fosfato formam os cristais, que em estudo de difração de raios-X, mostram ter uma estrutura de hidroxiapatita. Já a parte orgânica da matriz é constituída por grande quantidade de fibras colágenas de tipo I (90%) e uma pequena quantidade de glicoproteínas e proteoglicanas. Dentre as proteínas não colagenosas estão a osteocalcina, osteopontina e a osteonectina (42). A dureza e a resistência do osso deve-se a associação das fibras colágenas tipo I com hidroxiapatita. Os ossos funcionam como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada por uma intrincada rede neuro-hormonal, para manter constante a concentração desses importantes íons nos líquidos corporais (42).

Os ossos do esqueleto são, em regra, constituídos por camada cortical externa densa que envolve estrutura interna esponjosa, com maior área, também denominada osso trabecular (38). Por isso, o tecido ósseo pode ser entendido em dois componentes macroestruturais integrados em hierarquias distintas: o osso cortical e o osso esponjoso (37).

O osso cortical forma 80% do esqueleto; distingue-se pela dureza, maior densidade, além de formar a parte externa de vários ossos além do corpo dos ossos longos. Suas unidades constituintes são os ósteons e as regiões ósseas intersticiais, ou sistema haversiano. Os ósteons possuem formato cilíndrico e são compostos de lamelas ou camadas concêntricas paralelamente dispostas ao longo do eixo do osso. Os sistemas haversianos estão localizados no centro dos ósteons e acomodam vasos sanguíneos para facilitar o suprimento de nutrientes para células ósseas (osteócitos). O osso cortical possui uma porosidade considerada baixa, de 5 a 30% de sua área, sendo rígido e suportando um valor razoável de tensão antes de fraturar quando submetido à pressão (39,40,41).

Já o osso esponjoso compõe 20% do volume do esqueleto humano, possuindo uma estrutura altamente porosa encontrada nos corpos vertebrais e na parte final dos ossos longos. Formado por numerosas e pequenas trabéculas interconectadas, que tendem a se orientar ao longo da direção da tensão principal, em adaptação às pressões ambientais. O osso esponjoso possui uma porosidade considerada alta, de 30 a 90% de sua área, sendo capaz de suportar alongamentos e deformações antes de se fraturar quando submetido à tensão. De 75 a 95% do volume do osso esponjoso é constituído por poros interconectados e preenchido com medula óssea (39,40).

As principais células que compõem o tecido ósseo são os osteócitos, os osteoblastos e os osteoclastos. Os osteoblastos são as células responsáveis pela formação da matriz que será posteriormente mineralizada. Entre as substâncias que produz, podemos citar a fosfatase alcalina, osteocalcina (proteína GLA – ácido gama-carboxiglutâmico), grandes quantidades de colágeno do tipo I e uma variedade de outras proteínas da matriz (42,43).

Os osteócitos estão localizados em cavidades ou lacunas no interior da matriz óssea (42). Os osteoclastos são as células precursoras dos osteócitos, o componente celular mais abundante no tecido ósseo (44). Podem apresentar-se como células sinciciais gigantes, intensamente ramificadas, que estão presentes principalmente nas partes mais altas das lacunas de reabsorção dos ossos trabeculares (43). Eles secretam íons de hidrogênio, colagenases e hidrolases para dentro da matriz óssea, digerindo a matriz óssea e dissolvendo os cristais de sais de cálcio. A atividade desta célula é comandada pela calcitonina e paratormônio. Além

da reabsorção do tecido ósseo, há uma participação nos processos de remodelagem dos ossos (45).

As unidades de remodelamento são independentes e individuais, compondo-se cada qual de osteoblastos e osteoclastos, para formação e reabsorção, respectivamente (43). Mudança contínua acontece em todo osso ao longo de vida. Estas mudanças acontecem em ciclos e são atribuíveis à atividade de grupos de osteoclastos e osteoblastos.

A tendência natural do organismo é de sofrer uma redução gradativa da densidade mineral óssea (DMO), que é a quantificação da massa óssea, expressa em g/cm² (47). O pico de massa óssea é atingido por volta dos 35 anos de idade em homens e mulheres. Após essa idade, as mulheres perdem aproximadamente 1% de massa óssea por ano e podem perder até 6% por ano durante os primeiros 5 anos após a menopausa. Os homens apenas começam a perder cerca de 0,3% da massa óssea por ano por volta dos 50 anos (43,48).

Vale lembrar que, nos indivíduos após os 35 anos de idade, principalmente no sexo feminino, a formação óssea não consegue repor de forma completa a massa óssea perdida durante a atividade osteoclástica (35). Há redução da massa esquelética e os ossos tornam-se progressivamente porosos. Esta redução de massa óssea ao longo do tempo é conhecida como perda óssea involutiva (49).

2.2.2 Qualidade Óssea

A qualidade óssea é determinada por sua composição e estrutura, em um processo contínuo de renovação por meio do qual o osso velho ou danificado é substituído por um osso mecanicamente saudável e a homeostase do cálcio é mantida. As propriedades estruturais ósseas incluem sua geometria (tamanho e formato dos cristais), microarquitetura (configuração trabecular e porosidade cortical), grau de mineralização e composição não mineral da matriz, como também histórico de microdanos e seus reparos (50,51,52). Estes componentes são largamente interdependentes, de modo que uma anomalia primária em um frequentemente conduz a alterações nas demais dimensões (51,52).

O recente interesse na qualidade óssea surgiu a partir de observações de que a medida tradicional de resistência óssea na prática clínica, ou seja, a densitometria óssea, nem sempre é confiável para prever o risco de fratura (53). A avaliação *in vivo* da qualidade do osso é limitada pela escassez de marcadores e de métodos para estimar remodelação óssea assim como evolução de alguns aspectos da geometria e arquitetura óssea (51,52).

No entanto, utilizando-se biópsia óssea ou amostras de autópsia, um número de abordagens foram desenvolvidas, o que têm aumentado a compreensão sobre como a qualidade do osso contribui para a resistência óssea em doenças tratadas e não tratadas (52).

2.2.2.1 Remodelação/Renovação Óssea

A remodelação óssea contribui para a qualidade óssea. O equilíbrio entre a reabsorção óssea e sua formação consiste no componente chave na preservação da qualidade óssea e da reparação de danos na microarquitetura, pois mantém a DMO e reduz o risco de fratura (52).

Na reabsorção óssea acelerada, há perda irreversível de algumas trabéculas, e desta perda resulta um osso mais fraco e um risco aumentado de fratura. Como não é possível avaliar rotineiramente a conectividade das trabéculas em pacientes com ou sem suspeita clínica de distúrbio ósseo, a remodelação óssea é mais comumente avaliada na prática clínica através de marcadores bioquímicos de remodelação óssea (52).

Como marcadores bioquímicos de reabsorção, destacam-se medidas séricas de osteocalcina, de fosfatase alcalina óssea e de N-pró-peptídeo do colágeno do tipo 1 (P1NP). Já os níveis séricos dos telo-(C- e N-)peptídeos de colágeno do tipo 1 (CTX, NTX), de desoxipiridinolina e da fosfatase do tipo 5b resistente ao tartarato (51) podem ser considerados marcadores de renovação óssea. Produto de osteoblastos, níveis elevados do CTX geralmente significam remodelação óssea acelerada (52).

Certamente que marcadores baseados em avaliações séricas refletem a remodelação óssea total, ou seja, em nível global das estruturas ósseas do corpo, assim fornecendo uma avaliação predominantemente representativa da conjuntura de ossos corticais do organismo, por constituir 80-90% do esqueleto humano. Ademais, ressalta-se que estas aferições vêm demonstrando considerável variabilidade, tanto intra- quanto inter-indivíduos, o que pode ser atribuído à dieta, às variações étnicas assim como à interação com fatores ambientais e de estilo de vida (51). No entanto, a medição de marcadores de renovação óssea, em conjunto com a aferição da DMO, tem sido proposta como o índice substituto mais eficaz para prever o risco de fratura em comparação com escores de DMO considerados isoladamente (54).

Outra técnica utilizada para avaliar remodelação óssea consiste na histomorfometria óssea, tendo como marcador a tetraciclina antes da realização da biopsia (52,55). A histomorfometria consiste na análise quantitativa dos parâmetros de reabsorção do osso, formação de estrutura e em secções histológicas, sendo

largamente considerado o padrão ouro para a avaliação da remodelação óssea. Uma vez que é o único método disponível para análise direta *in situ* de células do osso e da sua atividade. Esta técnica pode avaliar microarquitetura óssea 2D (duas dimensões), permitindo medições tais como a espessura e a conectividade das trabéculas. Além disso, a análise computadorizada de amostras da biópsia pode avaliar as características da cavidade de reabsorção em termos quantitativos, como média e máxima da profundidade corroído, e área de erosão. No entanto, o volume de osso em biópsias de crista ílfaca pode não refletir mudanças em outros locais do esqueleto. Como a natureza deste procedimento é invasivo, isto pode colocar como uma desvantagem para o seu uso generalizado (56).

2.2.2.2 Microarquitetura óssea

Alterações na microarquitetura óssea contribuem de modo importante para a resistência óssea, contribuição que pode nem sempre ser capturada por meio de medições da densidade mineral óssea. Tanto a arquitetura cortical quanto a esponjosa são importantes a esse respeito. No osso esponjoso, o tamanho e forma das trabéculas e sua conectividade e orientação (anisotropia) contribuem para a resistência óssea, enquanto no osso cortical, sua largura e porosidade são os principais determinantes. Embora algumas destas características arquitetônicas pudessem ser avaliadas em seções histológicas de amostras de biopsia do osso utilizando abordagens em 2D (57), métodos mais sofisticados têm sido desenvolvidos para permitir visualização e quantificação em 3 dimensões (3D). Estes métodos incluem ressonância magnética em imagem de alta resolução (HR-MRI), tomografia computadorizada quantitativa de alta resolução periférica (HR-pQCT), tomografia computadorizada em resolução micrométrica de radiação síncrotron (μ CT) (58). Estes são presentemente ferramentas de pesquisa que, *in vivo*, podem ser aplicadas ao esqueleto periférico embora avanços tecnológicos possam, eventualmente, estender sua utilização para elementos do esqueleto central (51).

Mudanças na microarquitetura óssea em doença tratada e não tratada resulta de alterações inerentes à taxa e velocidade da remodelação óssea. Elevada taxa de remodelação assim como atividade aumentada dos osteoclastos predis põem a dano sobre a matriz trabecular, perda de conectividade entre elementos, afinamento e aumento da porosidade cortical. Já baixos níveis de remodelação e de redução da formação óssea estão associados a relativa preservação da microarquitetura óssea, porém a um desgaste trabecular mais intenso (51).

2.2.2.3 Mineralização e matriz óssea

Relativamente pouco se sabe sobre como matriz óssea e composição mineral efetivamente contribuem para a resistência óssea. Mudanças na ligação cruzada entre moléculas de colágeno do tipo 1 (59) assim como modificações pós-traducionais como hidroxilação em lisina, glicosilação e β -isomerização dos resíduos de aspartato em telopeptídeos carboxiterminais podem ter implicações biomecânicas podendo provocar alterações no tamanho e estrutura mineral do osso (60,61). Uma vez que a estrutura de colágeno e a mineralização estão tão estreitamente associadas, é provável que, quando ocorrem alterações em um, ambos são afetados (62).

Novas abordagens para estudar matriz óssea e composição incluem espectroscopia de infravermelho com transformada de Raman e Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de transmissão (TEM), e a técnica de dispersão de raios-X em pequeno ângulo (SAXS). Estas técnicas podem ser aplicadas apenas *ex vivo* para as amostras de osso. No entanto, ensaios para aferição da beta-isomerização de CTX foram recentemente desenvolvidas e esta abordagem, em conjunto com o desenvolvimento de outras medidas bioquímicas de mudanças na composição do colagénio no soro ou na urina, podem representar uma área importante para a pesquisa no futuro (51). O grau de mineralização e a sua distribuição ao longo do osso pode ser medida *ex vivo* através de vários métodos, incluindo microradiografia, imagem de elétrons retroespalhados quantitativa (qBSEI), técnica de dispersão de raios-X em pequeno ângulo (SAXS) e técnicas espectroscópicas. O grau de mineralização é capturado por meio de medições da DMO, mas a sua contribuição em relação a outros fatores que influenciam a DMO não pode ser diretamente deduzida (51,52).

Com o aumento da mineralização, o tecido torna-se mais frágil e requer menor impacto para fraturar. Portanto, é possível para um osso que é hipermineralizado seja mais frágil do que um osso com um menor grau de mineralização (51). Este efeito pode explicar parcialmente através dos resultados de Riggs e colaboradores (63), que demonstraram que, apesar de um aumento dramático na DMO com o tratamento por fluoreto, houve aumento significativo no número de pacientes com fraturas não vertebrais no grupo tratado em comparação

com o grupo placebo. Inversamente, quando a reabsorção óssea começa antes da conclusão de mineralização, um déficit acumulado na mineralização surge, levando a uma resistência óssea diminuída e força (52,63).

2.2.2.4 Avaliação dos microdanos / microlesões

Microlesões no osso consiste de microfissuras e microfraturas. A relação entre estes, se algum, é desconhecido e, apesar de ambas as formas de microdanos aumentarem com a idade, seus efeitos sobre a resistência óssea não são claras (64). Avaliação de microlesões atualmente pode ser feita somente por meio de técnicas histológicas (51).

A matriz óssea sofre reiteradas cargas cíclicas, e o dano resultante da fadiga na matriz óssea é expresso através de microfissuras ou microlesões. Microdanos são geralmente definidos como fissuras lineares detectáveis por microscopia de luz. Embora o método ideal para quantificar microdanos no osso esteja em debate, vários estudos têm demonstrado que a acumulação de danos enfraquece o osso. Além disso, parece que os microdanos desencadeia remodelação, presumivelmente para reparar o tecido danificado (65). Por outro lado, a acumulação de danos microscópicos pode resultar de um aumento da mineralização secundária à supressão de remodelação, tornando o osso mais frágil (52).

Há um debate em curso sobre o nível ideal de renovação óssea para evitar a deterioração arquitetônica, preservando a capacidade de osso para manter a homeostase do cálcio, responder a cargas mecânicas alteradas, e para reparar microlesões. Apesar de a acumulação de microdanos ter sido proposta como fator que pode contribuir para o aumento da fragilidade do esqueleto, uma relação entre microdanos com fraturas relacionadas com a idade ainda precisa ser estabelecida (66).

Técnicas para detectar microfissuras requerem tecnologias caras e treinamento. A maioria dos dados foi obtida em modelos animais, bem como a aplicabilidade de alguns resultados experimentais para os seres humanos ainda não está clara. Estudando microdanos em humanos, especificamente para determinar o impacto das drogas ósseas, depende de biópsias ósseas da crista ilíaca, a qual pode não ser apropriada, devido à baixa densidade de fissuras numérico neste local, em comparação com os outros. Técnicas não invasivas devem ser desenvolvidas para melhorar a avaliação de danos microscópicos *in vivo* (67).

2.3 Densidade mineral óssea

Os agravos relacionados à massa óssea dos indivíduos, incluindo as doenças crônico-degenerativas não transmissíveis, constituem prioridade para a saúde pública em países desenvolvidos e naqueles em desenvolvimento, tanto nas regiões metropolitanas quanto nos municípios de pequeno porte. Atinge todos os gêneros e idades, apesar de apresentar importância crescente conforme a progressão da idade, figurando como achado frequente entre idosos. Em 2000, a Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs uma estratégia mundial para prevenção e controle das doenças crônico-degenerativas não transmissíveis, dentre elas os distúrbios de massa óssea. Essa estratégia concentrou-se sobre fatores de risco tradicionais, como tabagismo, dietas aterogênicas, inatividade física, mas de maneira integrada, considerando a interação existente entre eles (68).

A densidade mineral óssea (DMO, ou BMD do inglês *bone mineral density*) é um termo médico que se refere à quantidade de matéria mineral por centímetro quadrado de ossos, permitindo uma caracterização quantitativa da massa óssea (69,70,71). Sendo uma medida pontual estática, não avalia as alterações dinâmicas que determinado tecido ósseo sofre em curto período de tempo (72). A partir desta técnica, foram estabelecidos padrões de normalidade que podem ser distintos para diferentes grupos populacionais. Estudos mostram que indivíduos de ancestralidade africana sub-saariana apresentam maior DMO quando comparados às populações caucasianas, os quais por sua vez apresentam maior DMO que indivíduos de ancestralidade asiática (69,70,71). Para além da etnia, muitos outros fatores influenciam a massa óssea exibida pelos indivíduos com destaque para os aspectos não modificáveis, como sexo e hereditariedade, e modificáveis, como peso corporal, dieta, atividade física e *status* hormonal (73,74,75,76,77).

O advento das técnicas de quantificação da massa óssea tornou possível identificar a monitoração da massa óssea de pacientes e, com isso, estratificar o risco de desenvolvimento de fraturas e suas complicações. O método mais utilizado consiste na densitometria óssea com raio-X de dupla energia (*dual energy X-ray absorptiometry* - DEXA), que permite a avaliação direta da massa óssea de regiões específicas, a exemplo da coluna lombar, região proximal do fêmur e terço distal do rádio, regiões mais acometidas por distúrbios como osteoporose (78).

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica progressiva caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, com um conseqüente aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade às fraturas (79,80). Fraturas ocorrem como resultado de uma lesão suficiente para provocar rompimento do osso normal, e constitui entidade clínica cujo risco pode ser estratificado em função da massa óssea alcançada até a maturidade, e por eventos no decurso da vida, a exemplo do início do período pós-menopausa, e influenciado por outros fatores de risco. Os fatores genéticos exercem uma influência significativa no pico de massa óssea e, presumivelmente, a perda óssea relacionada à idade (81,82,83). A diminuição da massa óssea e uma microarquitetura alterada são causadas por uma perturbação em que a remodelação de reabsorção óssea excede a formação óssea (84).

Anteriormente, havia ênfase no conteúdo mineral e massa óssea (aferidos por DEXA) para estratificação do risco de fraturas conforme o escore atingido pelo sujeito em análise. Apesar de a abordagem centrada nos achados por DEXA ainda ser prevalente na prática clínica, a compreensão moderna de osteoporose atribui maior importância à qualidade óssea e à arquitetura do osso, entre outras propriedades intrínsecas do osso representadas pelo teor de colágeno e mineralização, além de sua micro e macro arquitetura representadas pela porosidade do osso cortical e da espessura, e da conectividade das trabéculas (85,86). Outros fatores mecânicos podem também desempenhar um papel na tendência de um osso longo de fratura (87). No entanto, a DMO aferida por DEXA prossegue até o momento como ferramenta mais acessível na clínica para se estimar a resistência óssea (88).

2.3.1 Densitometria óssea (DEXA)

A densitometria óssea (DEXA) em si consiste em um método não invasivo para se avaliar a massa óssea, que se baseia na propriedade física do osso de absorver fótons. Permite analisar os pacientes e detectar sujeitos com alto risco de doença metabólica óssea, de estimar a gravidade clínica da perda de matriz mineral óssea e assim verificar o risco de fraturas e de acompanhar a evolução dos tratamentos (89).

O método DEXA utiliza radiação ionizante onde uma fonte de radionuclídeos ou um tubo de raios-X são usados para gerar um feixe de radiação que é absorvido parcialmente pelo tecido ósseo. O método baseia-se na atenuação ou absorção da energia emitida por uma fonte de raio-X pelo tecido ósseo na região estudada. São utilizados dois feixes de raios-X, e o feixe de menor energia penetra nos tecidos moles, enquanto que o feixe de maior energia penetra tanto no tecido ósseo quanto nos tecidos moles circundantes. Um detector mede os raios que atravessam a região estudada, e um programa computacional segmenta a área para quantificar e subtrair os valores obtidos com os dois feixes de energia. Um sistema detector avalia a quantidade de radiação absorvida e os dados coletados são computadorizados e comparados a padrões internacionais (ou grupo específicos) obtidos de uma população com densidade mineral óssea (DMO) normal (90). O conteúdo mineral ósseo (CMO) é a quantidade de todos os minerais presentes na extensão do osso avaliada. Por convenção, usa-se o grama (g) como unidade para o CMO aferido pelo DEXA (91).

A densidade de um material é medida pela relação entre sua massa e seu volume, e sua unidade de medida é o grama por centímetro cúbico (g/cm^3). No entanto, a DMO mensurada pelo DEXA consiste na relação entre a quantidade de todos os minerais ósseos (hidroxiapatita) presente em uma área projetada, ou seja, constitui avaliação bidimensional de uma variável tridimensional, empregando grama por centímetro quadrado (g/cm^2) como unidade de medida (91,92,93).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o diagnóstico de osteoporose é a mensurada por meio da medida de pico da DMO de um indivíduo, comparando-o com o valor médio de um conjunto de indivíduos jovens do mesmo sexo. Sendo assim, obtém-se o *T-score*, que constitui a representação do número

de desvios-padrão em que se posiciona a DMO do indivíduo na curva de distribuição dos valores do grupo controle jovem (94,95). O sujeito com seu *T-score* entre -1 e -2,5 desvios-padrão é considerado osteopênico, enquanto um valor de *T-score* inferior a -2,5 corresponde a osteoporose. Apesar de não constituir fator preditivo absoluto para eventos de fratura óssea, consensos da literatura médico-científica dão conta de que redução de massa óssea aferidas por este método correlacionam-se diretamente com o risco de fratura, sendo que para cada diminuição da DMO em 1 desvio-padrão, duplica-se o risco de fratura (95).

2.4 Osteopontina

2.4.1 Função (OPN)

A osteopontina (OPN) consiste em uma fosfoproteína O-glicosilada sintetizada por uma variedade de tecidos e células e secretada para os fluidos corporais. Foi inicialmente identificada como uma proteína de matriz óssea e posteriormente identificada como fator humoral produzido por células T ativadas e linhagens de células transformadas (96,97,98). Conjuntamente com a osteocalcina, OPN é referida na literatura como marcador clássico para diferenciação de osteoblastos, e podem ser encontrados diversos estudos que utilizam estes marcadores, entre outros, como meio para confirmar a ocorrência do processo de osteogênese (99,100).

É sugerido que sítios da osteopontina interagem com a osteocalcina, e esta, por fim, expõe domínios da osteopontina que suportam a nucleação e crescimento de hidroxiapatita (101). A biossíntese de osteopontina parece estimulada pelo calcitriol, conhecido precursor exógeno da vitamina D (102,103). Dentre os receptores conhecidos para OPN, destacam-se certas integrinas (104,105,106) e variantes de CD44 (107,108,109). É considerada como uma proteína de matriz por conter motivo RGD (Arg-Gly-Asp), que é o local de ligação de integrinas, portanto com propriedade adesiva para diferentes tipos celulares da matriz óssea. Estes receptores medeiam à adesão celular, migração e sobrevivência em uma variedade de tipos de células (110).

O potencial da OPN de interagir com receptores de superfície celular expressos de forma ubíqua a torna um mediador atuante em muitos processos fisiológicos e inclusive patológicos, incluindo cicatrização de feridas, remodelação óssea, tumorigênese, inflamação, isquemia e respostas imunitárias. O nível de expressão do receptor desta proteína aumenta em resposta a vitamina D e a níveis elevados de fosfato. Beck e colaboradores, por exemplo, sugerem que a expressão da osteopontina é regulada fortemente em resposta aos níveis elevados de fosfato extracelular e vários outros fatores, como ácido ascórbico, TGF- β (Transforming growth factor beta), ácido retinóico, endotelinas, BMPs (*Bone morphogenetic*

proteins - Proteínas morfogenéticas ósseas) e vitamina D, estimulam a expressão dos transcritos primários de OPN (111).

No sistema imunitário, OPN é expressa por muitos tipos diferentes de células, incluindo macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células NK (Natural killer) e linfócitos T e B, sendo super-expressa em resposta à lesão e inflamação em todos os órgãos examinados, a exemplo do tecido cardíaco, rins, pulmão, osso, cérebro, trato gastrointestinal, articulações, fígado, tecido adiposo (112), e na maioria dos tumores (109). OPN tem sido identificada como um biomarcador para vários tipos de câncer e de doenças inflamatórias (113,114). A expressão excessiva ou desregulada de OPN tem sido relacionada com a patogénese de diferentes doenças auto-imunes, tais como esclerose múltipla (115), lúpus eritematoso sistémico (116), artrite reumatoide (117), aterosclerose (118), e de outras doenças inflamatórias, incluindo doenças cardiovasculares (119), doença pulmonar obstrutiva crónica (120), doença inflamatória intestinal (121), a doença de fígado (122) e asma (123). Provas consideráveis estabeleceram que OPN é também uma citocina solúvel, mediador capaz de estimular vias de transdução de sinal em muitos tipos de células diferentes. Recentemente, a OPN tem surgido como um mediador chave de tensão, por exemplo, modulando a resposta dos órgãos do sistema imunológico (baço, timo) a algumas formas de stress (110).

2.4.1 Estrutura

Os motivos funcionais da molécula de OPN podem fornecer pistas para grandes funções biológicas da OPN. Ela é uma proteína altamente carregada negativamente que não tem estrutura secundária extensa (97,110). Ela é codificada por um único gene localizado no cromossomo 4 em seres humanos, pertence ao grupo de proteínas da família das integrinas, proteínas N-glicosiladas de ligação (124,125,126), sendo descrita inicialmente por Senger *et al* em 1979 por análise de proteínas secretadas por células epiteliais transformadas (127). O seu promotor é sensível a um número de fatores de transcrição diferentes (106,128). O comprimento completo da OPN é composto de cerca de 300 aminoácidos (297 em ratos; 314 em humanos), mas que também pode apresentar produtos de clivagem ou de *splicing* diferencial que sejam biologicamente funcionais (113,129,130,131). Embora expressa como uma proteína nativa de aproximadamente 33 kDa, extensas modificações pós-traducionais aumentam sua massa molecular aparente para cerca de 44 kDa (97,113), havendo isoformas com migração eletroforética na faixa de 50-75 kDa (97). Ambos os motivos de sequências altamente conservadas e modificações pós-traducionais contribuir para diferentes atividades funcionais de OPN (132,133). Esta amplitude de isoformas em que OPN pode ser encontrada pode justificar em parte a plêiade de atividades biológicas relatadas para a proteína. No entanto, relatos de inativação funcional da proteína OPN em modelos animais descreve atraso da cicatrização de feridas (134) e redução da infiltração por macrófagos assim como proteção contra a perda do conteúdo mineral em ossos de roedoras oofrectomizadas (137).

3 – JUSTIFICATIVA

Há embasamento teórico que subsidie uma associação entre massa óssea e genótipos assim como níveis séricos da osteopontina em seres humanos. Com base nesse pressuposto, níveis de OPN podem ser um marcador promissor para o diagnóstico precoce de desordens ósseas.

4 – OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho consistiu em investigar a associação de níveis e de genótipos de osteopontina (OPN) com a densidade mineral óssea (DMO) encontrada em indivíduos brasileiros muito idosos.

5 – MANUSCRITO

Osteopontin in bone mineral density of very-old Brazilians

Artigo submetido ao periódico Journal of Bone and Mineral Metabolism

Comprovante de Recebimento pelo periódico
Journal of Bone and Mineral Metabolism.

Otávio Nóbrega

De: em.jbmm.0.2bd2ec.4fc5c2d6@editorialmanager.com em nome de Editorial Office JBMM <jbmm@ac-square.co.jp>
Enviado em: domingo, 17 de junho de 2012 21:54
Para: Otavio T Nobrega
Assunto: JBMM: A manuscript number has been assigned to Osteopontin in bone mineral density of very-old Brazilians

Dear Dr Nobrega,

Your submission entitled "Osteopontin in bone mineral density of very-old Brazilians" has been assigned the following manuscript number: JBMM-D-12-00142.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://jbmm.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Yoshiki Seino
Editor-in-Chief
Journal of Bone and Mineral Metabolism

Osteopontin in bone mineral density of very-old Brazilians

Vinícius C. Souza^{1,2}, Wladimir M. Freitas^{1,3}, Luiz A. Quaglia⁴, Simone N. Santos¹,

Cláudio Córdova², Andrei C. Sposito^{1,4} and Otávio T. Nóbrega^{1,*}.

¹ University of Brasilia (UnB), Brasília, DF, Brazil

² Catholic University of Brasília (UCB-DF), Brasilia, DF, Brazil

³ Instituto de Cardiologia Biocardios, Brasília, DF, Brazil

⁴ State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

Short title: “osteopontin and bone density in the very-old”

Sources of funding: Research supported by the CNPq with grant # 471872/2011-3 and with a fellowship for productivity in research to A.C. Sposito. V.C. Sousa received a student fellowship from CAPES, Brazil.

***Corresponding author and address for correspondence:**

Otávio T. Nóbrega

Address: Campus Universitário Darcy Ribeiro

Asa Norte, Brasília – DF, 70910-900, Brazil

Phone (+55 61) 3107 1916

E-mail: nobrega@pq.cnpq.br; otavionobrega@unb.br

Abstract

Recent evidences suggest that changes in plasma levels of osteopontin (OPN) may be a promising marker for early diagnosis of bone disorders. We hypothesized that a frequent OPN gene polymorphism may be useful for identifying very-old individuals with alterations in plasma OPN levels and consequently at risk to abnormal bone density scores. Men and women (80 years or older) living in the Brazilian Federal District underwent assessments with dual energy X-ray absorptiometry for bone mineral density (BMD) of the femoral neck, femoral head and lumbar-sacral (L1 to S5) regions. Clinical inspection was performed to assess other physical traits and to exclude co-morbidities (cardiovascular, autoimmunity, infections or neoplastic diseases). Serum concentrations of OPN were determined with an enzyme-linked immunosorbent assay, whereas the A7385G polymorphism (rs1126772) was determined by direct sequencing of a polymerase chain reaction product. Among the two hundred and ten subjects enrolled, no differential scores for bone mineral density could be observed across genotypes, but a greater content of circulating OPN was found among carriers of the A allele ($P \leq 0.05$) even after adjustments. Serum OPN levels were negatively correlated with the femoral neck density ($P = 0.050$ for BMD; $P = 0.032$ for T-scores) but not with scores of the other regions investigated. Analyses with the sample dichotomized to age and body mass revealed that this inverse relationship was noticeable only among those aged within the highest and weighed within the lowest intervals. Our findings indicate elevated circulating osteopontin levels in patients with decreased bone mineral density, consistent with a modest contribution of an OPN allelic variation to its expression. Attesting clinical relevance of our findings demands forthcoming studies.

Key-words: osteoporosis; bone remodeling; polymorphism; biomarker; ageing.

Introduction

Osteoporosis is a systemic skeletal disorder and is characterized by progressive bone deterioration that is devoid of apparent clinical symptoms and often only brought to attention after a fracture. Loss of bone mineral density (BMD) among the very-old population is significantly increased not only due to settled meno/andropausal hormonal-related changes but also due to increased loss of functional independency along with other age-related diseases, which causes long-term unloading on the skeletal system [1,2]. But fracture risk should not be interpreted as an outcome that derives from trauma events and demineralization levels alone since bone toughness turns out to depend on the mineralization quality and on the content of organic constituents of the bone matrix.

Biomarkers are sought worldwide to predict occurrence of loss of bone quality. Consistent with the notion that variations in components of the matrix play a major role in bone integrity, osteopontin (OPN) has been associated with the regulation of bone strength in many animal studies [3-5]. OPN is an acidic phosphoprotein secreted by immune cells, osteoblasts and osteoclasts, found to be important for bone remodeling and maintenance of bone strength [6,7]. Noncollagenous proteins as OPN comprise a relatively small percentage of the bone's volume or weight, but may contribute to the matrix quality in a number of ways, basically due to its binding properties to calcium ions [8], calcium oxalate crystal [9] and hydroxyapatite crystal [10], either guiding mineral deposition and influencing crystal shape and size. OPN deficient mice, for instance, have bones that are irregularly hypermineralized and more fragile than those from wild-type counterparts.

Despite all above, the association of OPN genotypes and serum concentrations with osteoporosis in humans is still unclear. Based on the assumption that OPN levels may be a promising marker for early diagnosis of bone disorders, we hypothesized that a polymorphism in its gene might account to differential serum levels of the mediator and thus to the bone density statuses in the Healthy Ageing Cohort of very-old adults of the Brazilian Federal District, Brazil. Because factors such

as age, body composition and common co-morbidities affect circulating levels of OPN, our report poses a contribution by taking these variables into account.

Material and Methods

Subjects

Brasília (national capital) is located in the Midwest of Brazil. The present cross-sectional analyses were performed using data obtained from apparently healthy outpatients aged 80 years or older and living in the urban Federal District. These subjects are participants in the ongoing Brazilian Study on Healthy Aging, a prospective study designed to identify markers for primary prevention of cardiovascular events in our settings and that recruits outpatients who have never manifested myocardial infarction, stroke or peripheral arterial disease [11]. For this report, a subset that has never manifested bone fractures or recurrent falls was enrolled. Additional selection criteria were the absence of autoimmune disease (including rheumatic disorders), chronic or recurrent infections, prior or current neoplastic disease, or use of steroidal or nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the past 30 days. Current use of BMD-related drugs was investigated for each patient. The present report presents analyses of admission data of subjects who fulfilled inclusion criteria.

At baseline, individuals underwent a detailed clinical examination including assessment of anthropometric data. After 12 h of overnight fasting, the study participants underwent blood drawing for biochemical analysis and freezing at -80 °C of serum and whole blood samples. To determine body mass index [BMI; weight (kg)/height (m²)], patients were weighed wearing light clothing, and their height was measured without shoes to the nearest millimeter. Waist circumference (WC; cm) was measured midway between the iliac crest and the lower costal margin.

Type-2 diabetes was characterized by fasting blood glucose ≥ 126 mg/dl or use of insulin or oral anti-diabetic drugs. Hypertensive cases were defined following to the V Brazilian Guidelines of Hypertension [12].

This study was approved by the institutional ethics committee and conducted attending the Helsinki Declaration. Participation was voluntary, and written informed consent was obtained from each participant.

Dual Energy X-Ray Absorptiometry Measurements

Participants underwent bone mineral density (BMD) assessments of the femoral neck, femoral head and lumbar sacral (L1 to S5) regions with dual energy X-ray absorptiometry (DXA; (Lunar Prodigy Advance, GE Healthcare, USA) according to standard protocol to measure BMD (g/cm^2). The difference between an individual's BMD and the mean BMD for a reference population was expressed in standard deviation term (T-score).

OPN analysis

Serum OPN concentration was determined using the enzyme-link immunosorbent assay (ELISA) method with the Human Osteopontin Quantikine[®] Immunoassay Kits (R&D Systems, USA) according to manufacturer instructions. This kit measures total concentration of OPN (phosphorylated and nonphosphorylated forms). Samples were analyzed in duplicate and the experimental threshold of detection was set at 0.01 ng/ml.

The A7385G polymorphic site in the human OPN gene (also known as +1083A/G or rs1126772) was selected based on evidence that variations in its 3' UTR have more influence on the gene's expression and on the sOPN levels of healthy individuals than variation in its exons or

promoter region [13,14]. Genotypes were determined by direct sequencing of a polymerase chain reaction (PCR) product. A 506-bp region was amplified using a pair of specific primers: 5'-TGCATCTTCTGAGGTCAATTTAA -3' (sense) and 5'-CTGGACAACCGTGGGAAAAC -3' (antisense), which flank the polymorphism. The reaction tubes contained 100 ng DNA, 10 mM Tris-HCl, pH 9.2, 75 mM KCl, 3.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 20 pmol of each primer, 0.5 µg of purified chicken albumin, and 1 unit of Taq DNA polymerase (Phoneutria[®], Brazil) in a final volume of 25 µL. After 1 min of hot start at 80°C and an initial denaturation for 2 min at 94°C, the amplifications were carried out for 36 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 62°C, and 40 s at 72°C followed by a final 5-min extension at 72°C. Each PCR product was directly sequenced on an ABI PRISM 3700 DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using alternately the sense and antisense primers. Each sequence obtained was examined using the Staden software package (MRC, Cambridge, UK), and confirmed by visual inspection.

Statistical analysis

Violation of the Hardy-Weinberg equilibrium was tested using Fisher's exact test. The Kolmogorov-Smirnov test was used to verify normal distribution of continuous data. Because of the intercorrelated nature between dependent variables, multivariate analysis of variance (MANOVA) was used to compare means of anthropometric/clinical/serum variables (age, BMI, WC, blood pressure, bone density and serum OPN) across genotypic groups. Otherwise, the Student *t*-test was applied. For the non-parametric purpose of evaluating gender distribution as well as cases of hypertension, type-2 diabetes and bone-active drug use between genotypes, the chi-square test was employed.

Association of sOPN concentrations with the absolute (BMD) and relative (T-scores) levels of bone mineral density were evaluated by Pearson's correlation coefficient. A similar association was assessed with other continuous anthropometric/clinical variables to obtain regression coefficient for

sOPN and potential confounding factors among all subjects. Whenever an interaction was noticed, partial correlation analyses were run to test adjustments. Then, all subjects were segregated according to the median value of the confounding variable in the sample and the correlation between OPN and BMD variables was reassessed on the lower and on the higher intervals. Finally, linear multivariate regression analysis, stepwise method, was performed to assess to which extent genotypes explain sOPN concentrations and how this latter may explain BMD variability. All analyses were performed with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows (version 10.0). A P value ≤ 0.05 (two-tailed) was considered significant.

Results

After applying the exclusion criteria, 210 very-old subjects were eligible for analysis. The prevalence of the A and G alleles of the rs1126772 polymorphism was 78.8% and 21.2%, respectively. Genotype frequencies did not deviate from the Hardy-Weinberg equilibrium ($P = 0.14$). The clinical and laboratory characteristics of the subjects analyzed are summarized in Table 1. In a co-dominant model, no significant differences in mean age, anthropometric and blood pressure levels or in the distribution of gender and of hypertensive and diabetic cases were observed between carriers of the three genotypes. Most notably, no differential scores for bone mineral density in the lumbosacral and femoral regions could be observed across genotypes regardless of the 1.60 fold greater content of sOPN ($P = 0.050$) found assuming a dominant model of analysis (A carriers *versus* G homozygotes) or the 1.27 fold increase in sOPN ($P = 0.021$) found using the contrasting, recessive model (A homozygotes *versus* G carriers).

To assess homogeneity across gender, clinical (age, SBP, DBP, % hypertension, % type 2 diabetes, % use of BMD-related drugs), anthropometric (BMI, WC) and laboratory (sOPN) data

considered at admission were explored and found to be identical (not shown). As expected, mineral density scores were significantly reduced for women compared to the male counterparts at all osseous sites investigated ($P \leq 0.001$). But our results tend not to be biased due to admitting both gender in the sample since the male/female ratio did not vary across OPN ($\chi^2 = 2.704$; $P = 0.440$), BMI ($\chi^2 = 1.816$; $P = 0.661$) or age ($\chi^2 = 3.847$; $P = 0.279$) quartiles. Also during clinical assessments, 117 (56%) of the very-old subjects were found to be users of anti-reabsorptive drugs. Nonetheless, we do not believe that our finding reflect pharmaceutically-influenced results since the chi-square test failed to reveal quantitative variances in the distribution of users and non-users of these drugs across the three genotypes ($P > 0.05$). Moreover, because of the possible association of OPN expression with the hyperglycaemic or hypertensive states or with variables such as age, sex and adiposity, differences between genotypes were investigated adjusting to these confounding factors. In brief, the contribution of the A allele to more pronounced sOPN concentrations resisted all adjustments, whilst no other difference in quantitative traits became significant after correction (not shown).

Serum osteopontin concentrations were negatively correlated with the femoral neck mineral density expressed as g/cm^2 and T-score (Table 2), but not with BMD of the other regions investigated, suggesting that sOPN acts as biomarker for bone disorder at this site. Moreover, our results show that sOPN concentrations have significant positive correlation with age and negative correlation with body mass in the group. Adjustments for age and BMI resulted in non-significant association of sOPN levels with either the absolute ($r = -0.076$; $P = 0.275$) or the relative ($r = -0.087$; $P = 0.213$) femoral neck density along with the other densities assessed. Using statistical models (described in Methods) in which age and BMI were used to dichotomize subjects according to their corresponding median value in the sample ($<$ or ≥ 84 years for the former, and $<$ or $\geq 26 \text{ kg/m}^2$ for the latter variable), we uncovered an important interaction in the relationship between sOPN and the femoral neck density: a context-sensitive relationship between enhanced osteopontin concentrations and reduced BMD that is noticeable only among those aged within the highest and weighed within the lowest intervals (Table 3). In multivariate regression analysis, sOPN

concentrations were significant predictors for T-scores of the femoral neck only ($P = 0.032$), although the variance was small ($R = 0.148$).

Discussion

The bone microarchitecture is a dynamic structure, constantly changing in response to morphogenetic, metabolic, mechanical, inflammatory, and endocrine demands. With age, enhanced matrix remodeling reduces its overall strength and predisposes to fractures, which are important predictors of morbidity and mortality among very-old individuals. As sophisticated as current working models are, relatively little is known regarding the effect of common allelic variations/levels of key bone constituents in determining the structure and resistance of the bone. In part, this void may result from the complex interplay between these mediators and the individuals' clinical milieu. For instance, OPN was shown as a glucose-inducible mediator, upregulated in the context of metabolic syndrome (diabetes and hypertension) via the bipartite upstream stimulatory factor/activator protein-1 element pathway [15,16]. Also, the intercorrelated nature of OPN concentration with age and body mass, as observed herein and elsewhere [17], are the most common confounding factors in human models, and previous reports that ignored the clinical environment of the sample (especially classic cardiovascular risk factors [18,19]) should be interpreted with caution. Therefore, the potential of sOPN to predict fracture remains open to debate. Our work tends to pose a contribution by ruling out symptomatic individuals for cardiovascular disorders, minimizing the influence of major vascular/metabolic unbalances in our analyses.

In our investigation, we start showing that an association between the common A7385G polymorphism of the human OPN gene and circulating concentrations of its product was detectable among the very-old adults investigated. Stepwise multivariate regression showed that the OPN polymorphism was the first most predictive variable in the model, which, along with age and body

mass, accounted for 25% of the variance in the marker's humoral content. Nonetheless, no direct genotype-phenotype association was established between the polymorphism itself and actual bone density scores, probably due to sOPN concentrations being a poor predictor of the bone mineralization status among the very-old subjects investigated, coupled with the limited, non-probabilistic character of the sample. For similar reasons, sOPN levels were associated to bone mineral density only in a site-restricted manner, basically attaining to the femoral neck.

Our findings are in accordance with previous reports indicating elevated circulating osteopontin levels in ageing patients with decreased bone mineral density [17,20]. In line, analysis in old age resembling, ovariectomized mice indicate greater porosity and trabecular bone loss in the epiphyseal portion of the long bones of OPN-bearing wild-type animals compared to OPN-deficient littermates [21]. Because OPN-deficient mice do not show any structural alterations in their bones at birth or growth period, OPN does not appear to be required for normal development [22]. On the other hand, our data and the results revised above suggest that the effect of OPN presence seems to become apparent in circumstances of accelerated bone turnover. But given the cross-sectional design of our study and the comprehension that abnormal hypermineralization is a phenotype that may as well derive from OPN deficiency, assuming whether higher or lower levels of the cytokine predispose to fractures is beyond the scope of our report. The complexity of this scenario may be illustrated by our understanding that organisms may adapt to ageing using OPN overexpression to compensate for low osteoblastic activity by assuming a more efficient pattern of matrix construction, in an attempt to produce better quality bones even with relatively lower BMD. Accordingly, it does not surprise that the significant associations only resisted adjustment among the frailest subjects (≥ 84 years or BMI < 26), where BMD scores are naturally lower and more of this adapting mechanism would be required. Nonetheless, despite BMD is the most common diagnostic used to assess fracture risk, it is important to have in mind that less than half of nonvertebral fractures can be explained by BMD alone (13). Therefore, direct assessments of bone toughness in animal models along with clinical follow-ups aiming at fracture incidence in humans across carriers of distinct basal

concentrations of the mediator or genotypic architecture would help elucidating causal relationships between OPN and bone disorders.

Despite the standardization of subjects in terms of age, body composition and cardiovascular statuses, the present study has limitations mostly related to confounding factors inherent to the Brazilian scenario but not investigated herein, such as the remarkable interethnic variation owing to genetic mix [23], the escalating prevalence of metabolic disorders among the aged [24,25], levels of functional independency and the diversity of food consumption habits throughout the country.

In conclusion, we found an association between of the common A7385G transition in the OPN gene with serum levels of the mediator in very-old humans, consistent with increased systemic OPN expression by the A allele. Also, OPN levels were inversely correlated, and in a clinical-sensitive matter, with absolute and relative BMD scores of the femoral neck, but not with other bone regions investigated. This indicates that in the aged human model, expression of the OPN mediator explains at least in part the complex phenotype of bone structure and resistance. However, attesting clinical relevance of the findings presented herein and abroad still depends on forthcoming studies.

Acknowledgments: None.

Conflict of interest: None

Author contributions:

VC Sousa: genotyped all subjects, conducted the immunoassay, analyzed and interpreted data used in the study.

LA Quaglia, SN Santos: executed the radiological component of the study.

WM Freitas: supervised and executed the medical component of the study.

C Córdova: advised on the analysis and interpretation of results.

AC Sposito, OT Nóbrega: designed and coordinated the study, analyzed and interpreted the results.

VC Souza, WM Freitas, AC Sposito and OT Nóbrega: participated in the preparation of the original manuscript as well as of its revised version.

REFERENCES

- 1 Ahlborg HG, Johnell O, Turner CH, Rannevik G, Karlsson MK (2003) Bone loss and bone size after menopause. *N Engl J Med* 349:327-334.
- 2 Karlsson MK, Gerdhem P, Ahlborg HG (2005) The prevention of osteoporotic fractures. *J Bone Joint Surg Br* 87:1320-1327.
- 3 Thurner PJ, Chen CG, Ionova-Martin S, Sun L, Harman A, Porter A, Ager JW, 3rd, Ritchie RO, Alliston T (2010) Osteopontin deficiency increases bone fragility but preserves bone mass. *Bone* 46:1564-1573.
- 4 McCann RM, Colleary G, Geddis C, Clarke SA, Jordan GR, Dickson GR, Marsh D (2008) Effect of osteoporosis on bone mineral density and fracture repair in a rat femoral fracture model. *J Orthop Res* 26:384-393.
- 5 Malaval L, Wade-Gueye NM, Boudiffa M, Fei J, Zirngibl R, Chen F, Laroche N, Roux JP, Burt-Pichat B, Duboeuf F, Boivin G, Jurdic P, Lafage-Proust MH, Amedee J, Vico L, Rossant J, Aubin JE (2008) Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J Exp Med* 205:1145-1153.
- 6 Rittling SR, Denhardt DT (1999) Osteopontin function in pathology: Lessons from osteopontin-deficient mice. *Exp Nephrol* 7:103-113.
- 7 Scatena M, Liaw L, Giachelli CM (2007) Osteopontin: A multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:2302-2309.
- 8 Chen Y, Bal BS, Gorski JP (1992) Calcium and collagen binding properties of osteopontin, bone sialoprotein, and bone acidic glycoprotein-75 from bone. *J Biol Chem* 267:24871-24878.
- 9 Hoyer JR, Otvos L, Jr., Urge L (1995) Osteopontin in urinary stone formation. *Ann N Y Acad Sci* 760:257-265.
- 10 MacNeil RL, Berry J, D'Errico J, Strayhorn C, Piotrowski B, Somerman MJ (1995) Role of two mineral-associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein, during cementogenesis. *Connect Tissue Res* 33:1-7.

- 11 Freitas WM, Quaglia LA, Santos SN, Soares AA, Japiassu AV, Boaventura V, Dos Santos Barros E, Cordova C, Nobrega OT, Sposito AC (2011) Association of systemic inflammatory activity with coronary and carotid atherosclerosis in the very elderly. *Atherosclerosis* 216:212-216.
- 12 [V Brazilian Guidelines in Arterial Hypertension] (2007) *Arq Bras Cardiol* 89:e24-79.
- 13 D'Alfonso S, Barizzone N, Giordano M, Chiocchetti A, Magnani C, Castelli L, Indelicato M, Giacopelli F, Marchini M, Scorza R, Danieli MG, Cappelli M, Migliaresi S, Bigliardo B, Sabbadini MG, Baldissera E, Galeazzi M, Sebastiani GD, Minisola G, Ravazzolo R, Dianzani U, Momigliano-Richiardi P (2005) Two single-nucleotide polymorphisms in the 5' and 3' ends of the osteopontin gene contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 52:539-547.
- 14 Han S, Guthridge JM, Harley IT, Sestak AL, Kim-Howard X, Kaufman KM, Namjou B, Deshmukh H, Bruner G, Espinoza LR, Gilkeson GS, Harley JB, James JA, Nath SK (2008) Osteopontin and systemic lupus erythematosus association: A probable gene-gender interaction. *PLoS One* 3:e0001757.
- 15 Shao JS, Sierra OL, Cohen R, Mecham RP, Kovacs A, Wang J, Distelhorst K, Behrmann A, Halstead LR, Towler DA: Vascular calcification and aortic fibrosis (2011) A bifunctional role for osteopontin in diabetic arteriosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:1821-1833.
- 16 Bidder M, Shao JS, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Semenkovich CF, Towler DA (2002) Osteopontin transcription in aortic vascular smooth muscle cells is controlled by glucose-regulated upstream stimulatory factor and activator protein-1 activities. *J Biol Chem* 277:44485-44496.
- 17 Chang IC, Chiang TI, Yeh KT, Lee H, Cheng YW (2010) Increased serum osteopontin is a risk factor for osteoporosis in menopausal women. *Osteoporos Int* 21:1401-1409.
- 18 Golledge J, Muller J, Shephard N, Clancy P, Smallwood L, Moran C, Dear AE, Palmer LJ, Norman PE (2007) Association between osteopontin and human abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:655-660.
- 19 Aryan M, Kepez A, Atalar E, Hazirolan T, Haznedaroglu I, Akata D, Ozer N, Aksoyek S, Ovunc K, Ozmen F (2009) Association of plasma osteopontin levels with coronary calcification evaluated by tomographic coronary calcium scoring. *J Bone Miner Metab* 27:591-597.
- 20 Chiang TI, Chang IC, Lee HS, Lee H, Huang CH, Cheng YW (2011) Osteopontin regulates anabolic effect in human menopausal osteoporosis with intermittent parathyroid hormone treatment. *Osteoporos Int* 22:577-585.
- 21 Yoshitake H, Rittling SR, Denhardt DT, Noda M (1999) Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:8156-8160.
- 22 Rittling SR, Matsumoto HN, McKee MD, Nanci A, An XR, Novick KE, Kowalski AJ, Noda M, Denhardt DT (1998) Mice lacking osteopontin show normal development and bone structure but display altered osteoclast formation in vitro. *J Bone Miner Res* 13:1101-1111.
- 23 Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, Rocha J, Bydlowski SP, Pena SD (2006) Color and genomic ancestry in Brazilians: A study with forensic microsatellites. *Hum Hered* 62:190-195.
- 24 Nobrega OT, Faleiros VP, Telles JL (2009) Gerontology in the developing Brazil: Achievements and challenges in public policies. *Geriatr Gerontol Int* 9:135-139.

25 Karnikowski M, Cordova C, Oliveira RJ, Karnikowski MG, Nobrega OT (2007) Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in brazilian middle-aged and older adults. Sao Paulo Med J 125:333-337.

Table 1. Characteristics of the 210 very-old subjects according to genotypes of the rs1126772 polymorphism of the osteopontin gene.

	A/A (n = 134)	A/G (n = 63)	G/G (n = 13)	P(A/A vs. A/G vs. G/G)
Age (years-old)	84.6 ± 4.4	84.2 ± 3.5	84.4 ± 5.2	0.799
Male (%)	82.8	69.8	92.3	0.054 [§]
BMI (kg/m ²)	26.2 ± 4.4	26.8 ± 5.2	25.5 ± 4.0	0.541
Waist circumference (cm)	94.2 ± 11.2	95.0 ± 13.5	90.1 ± 11.9	0.402
Systolic blood pressure (mm Hg)	144.1 ± 19.2	147.1 ± 22.8	147.4 ± 21.3	0.580
Diastolic blood pressure (mm Hg)	76.0 ± 10.6	73.5 ± 10.4	73.5 ± 10.9	0.285
Hypertension (%)	79.1	73.0	76.9	0.637 [§]
Type-2 diabetes (%)	23.1	23.8	14.7	0.421 [§]
Use of BMD-related drugs (%)	58.2	54.0	38.5	0.371 [§]
Lumbosacral BMD (g/cm ²)	0.82 ± 0.13	0.84 ± 0.16	0.79 ± 0.13	0.328
Lumbosacral T-score	-2.12 ± 1.14	-1.91 ± 1.36	-2.28 ± 1.19	0.427
Femural Head BMD (g/cm ²)	0.79 ± 0.14	0.82 ± 0.14	0.78 ± 0.12	0.300
Femural Head T-score	-1.36 ± 1.00	-1.15 ± 0.96	-1.41 ± 0.95	0.330
Femural Neck BMD (g/cm ²)	0.64 ± 0.11	0.66 ± 0.09	0.61 ± 0.12	0.301
Femural Neck T-score	-1.95 ± 0.94	-1.83 ± 0.70	-2.12 ± 1.14	0.292
Serum osteopontin (ng/ml)	1.06 ± 0.77	0.88 ± 0.44	0.62 ± 0.33	0.031

Data are means ± SD or percentage within genotype. P values for comparison of differences between genotypes in a co-dominant model using MANOVA or the Chi-square[§] test. BMI = body mass index.

BMD = bone mineral density.

Table 2. Correlation analysis between levels of serum osteopontin and clinical/anthropometric findings among the 210 very-old subjects investigated.

	sOPN	BMD			T-scores		
		LS	FH	FN	LS	FH	FN
sOPN	--	-.015; .828	-.097; .160	-.134; .050	-.010; .876	-.107; .121	-.147; .032
Age	.182; .008	-.033; .639	-.024; .003	-.250; .000	-.030; .656	-.218; .001	-.256; .000
BMI	-.139; .045	.129; .062	.294; .000	.148; .032	.139; .043	.333; .000	.166; .016
WC	-.118; .089	.118; .087	.249; .000	.135; .051	.112; .104	.274; .000	.136; .049
SBP	.050; .467	.004; .954	.033; .635	.028; .689	.010; .891	.039; .576	.022; .752
DBP	-.028; .684	.077; .268	.066; .343	.033; .638	.065; .351	.041; .558	.009; .898

The Pearson's correlation test was used. Data are expressed in correlation index and significance level (r ; P). BMI = body mass index; WC = waist circumference; SBP = systolic blood pressure; DBP = diastolic blood pressure; BMD = bone mineral density; LS – lumbar-sacral; FH = Femoral Head; FN = Femoral Neck; sOPN = serum osteopontin.

Table 3. Correlation analysis between serum levels of serum osteopontin and bone mineral density findings among the very-old subjects grouped according to age and BMI.

Group	n	OPN	BMD			T-scores		
		(ng/ml)	LS	FH	FN	LS	FH	FN
Age < 84	105	,90 ± ,06	-,101; ,303	-,025; ,804	-,095; ,337	-,071; ,469	,009; ,926	-,096; ,332
Age ≥ 84	105	1,06 ± ,07	,073; ,459	-,115; ,241	-,133; ,176	,050; ,616	-,165; ,093	-,208; ,038
BMI < 26	106	1,07 ± ,07	-,014; ,884	-,094; ,338	-,191; ,050	-,008; ,936	-,090; ,358	-,213; ,028
BMI ≥ 26	104	,89 ± ,06	,027; ,788	-,033; ,737	-,029; ,772	,033; ,741	-,049; ,622	-,035; ,728

The Pearson's correlation test was used. Data are expressed as correlation index and significance level (*r*; *P*). BMI = body mass index; BMD = bone mineral density; LS – lumbar sacral; FH = Femoral Head; FN = Femoral Neck.

6 – DISCUSSÃO COMPLEMENTAR

A microarquitetura do osso é uma estrutura dinâmica, em constante mudança em resposta a mecanismos de adaptação genética e a demandas metabólicas, mecânicas, inflamatórias e endócrinas. Com a progressão da idade, um remodelamento mais acentuado da matriz óssea reduz sua resistência global e predispõe a fraturas, que são importantes preditores de morbidade e mortalidade de indivíduos muito-idosos. Por mais sofisticados que sejam os atuais modelos de trabalho, relativamente pouco é conhecido sobre o efeito das principais variantes alélicas conhecidas e dos níveis dos constituintes ósseos mais fundamentais na determinação da estrutura e resistência do osso. Em parte, esta lacuna pode resultar da interação complexa entre estes mediadores e as condições clínicas de base dos indivíduos assistidos clinicamente. Por exemplo, OPN foi originalmente descrita como mediador sérico induzível por glicose, super-expressa em um contexto de síndrome metabólica (diabetes e hipertensão) (136,137). Além disso, a interrelação existente entre concentrações séricas de OPN e aspectos como idade e massa corporal, como observado neste e em outros estudos (138), são os fatores de confusão mais comuns em modelos humanos, e relatos anteriores ignoraram o ambiente clínico da amostra (especialmente clássicos fatores de risco cardiovascular) que devem ser interpretados com cautela (139).

Portanto, o potencial de OPN para prever fratura permanece aberto ao debate. Nosso trabalho tende a representar uma contribuição para a literatura especializada sobre o assunto por experimentalmente excluir indivíduos sintomáticos para doenças cardiovasculares, minimizando a influência de grandes desequilíbrios vasculares/metabólicos em nossas análises. É importante ressaltar que este estudo foi conduzido entre pacientes ambulatoriais muito idosos recrutados por nunca terem manifestado infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral ou periférica (140). Sabendo que diversos relatos associam OPN com risco para eventos cardiovasculares, uma interferência sobre os nossos resultados proveniente de um risco cardiovascular não controlado pôde ser minimizada. Ademais, nosso estudo foi conduzido com um subconjunto que jamais manifestou fraturas ósseas ou quedas recorrentes. Critérios de seleção adicionais foram ausência de doenças auto-imune (incluindo doenças reumáticas), infecções crônicas ou recorrentes, doença neoplásica prévia ou atual, ou uso de esteróides ou não esteróides anti-inflamatórios nos últimos 30 dias, além do uso atual de medicamentos relacionados com a DMO. Ao se realizar semelhante estudo entre indivíduos com bom estado geral de saúde e mobilidade preservada, controla-se experimentalmente para co-morbidades não controladas em estudos revisados até aqui.

Em nossa investigação, começamos por demonstrar uma associação entre o conhecido polimorfismo A7385G do gene humano para OPN e as concentrações circulantes de seu produto detectado nos indivíduos muito idosos investigados. Regressão multivariada do tipo *stepwise* mostrou

que o polimorfismo de OPN foi a mais importante variável preditiva do modelo, a qual, conjuntamente com a idade e a massa corporal, foram responsáveis por 25% da variação do conteúdo humoral do marcador. No entanto, nenhuma associação genótipo-fenótipo direta foi estabelecida entre o polimorfismo em si e os escores de densidade dos ossos investigados, provavelmente devido ao fato de a concentração de OPN ser um preditor pobre do estado de mineralização óssea entre os sujeitos muito de idade investigados, em conjunto com a natureza não-probabilística da amostra e numericamente limitada em sujeitos. Por razões semelhantes, os níveis de OPN foram associados a densidade mineral óssea apenas de forma sítio-específica, basicamente restrita ao colo do fêmur.

Nossos achados estão de acordo com relatos anteriores que indicam níveis elevados de osteopontina circulantes em pacientes com diminuição da densidade mineral óssea (138,141). Dado o desenho transversal do nosso estudo e a compreensão de que uma hipermineralização anormal pode derivar de deficiência de OPN, assumir que níveis aumentados ou reduzidos da citocina predisõem a fraturas está além do escopo do nosso trabalho. A complexidade deste cenário pode ser ilustrada pela nossa compreensão de que os organismos podem adaptar-se ao envelhecimento, usando a superexpressão de OPN, por exemplo, para compensar uma atividade osteoblástica diminuída, assumindo um padrão mais eficaz da construção da matriz na tentativa de produzir ossos de melhor qualidade, mesmo em um contexto de DMO relativamente mais baixa. Assim, não surpreende que as associações significativas resistiram a ajustes estatísticos apenas entre os sujeitos mais frágeis (≥ 84 anos ou $IMC < 26 \text{ kg/m}^2$), onde níveis de DMO são naturalmente mais baixos e um mecanismo adaptativo mais intenso seria necessário. No entanto, apesar da DMO ser a ferramenta diagnóstica mais comum utilizado para avaliar risco de fratura, é importante ter em mente que menos da metade das fraturas não vertebrais podem ser explicada considerada apenas a DMO isoladamente (142). Portanto, as avaliações diretas da resistência óssea em modelos animais, juntamente com acompanhamento clínico visando aferir incidência de fraturas em seres humanos agregados conforme portadores de distintas concentrações basais do mediador ou diferentes arquiteturas genóticas ajudariam a elucidar as relações causais entre distúrbios do OPN e a qualidade do osso.

Apesar da normalização dos sujeitos em termos de idade, composição corporal e *status* cardiovasculares, o presente estudo tem limitações na sua maioria relacionados a fatores de confusão inerentes ao cenário brasileiro mas não foram investigados aqui, tais como a notável miscigenação genética do contingente brasileiro (143), a prevalência crescente de doenças metabólicas entre os idosos (144,145), e a diversidade de hábitos de consumo de alimentos em todo o país.

7 – CONCLUSÃO

A análise dos dados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- Foi encontrado uma associação entre a transição A7385G comum no gene OPN com níveis séricos do mediador em indivíduos muito idosos, em consonância com uma expressão sistêmica aumentada de OPN pelo alelo A.
- Além disso, os níveis de OPN foram negativamente correlacionadas, e de um modo sensível ao contexto clínico dos pacientes, com valores de DMO do colo do fêmur tanto em termos absolutos quanto relativos, mas não com outras regiões ósseas investigadas.
- No modelo humano, a expressão do mediador OPN explica ao menos em parte o fenótipo complexo da estrutura e resistência ósseas. No entanto, atestar relevância clínica dos achados apresentados aqui ainda depende de estudos futuros.
- O estudo forneceu a primeira evidência genética para associação entre polimorfismo comum do gene da OPN, sua quantificação em termos de níveis séricos e sua relação com a densidade mineral óssea.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01** Nasri F. The aging population in Brazil. Einstein (São Paulo); 6(supl.1):S4-S6, 2008.
- 02** Carvalho JAM, Garcia RA. O Envelhecimento da população Brasileira: um enfoque demográfico. Cad Saúde Publica. 2003; 19:725-33.
- 03** Chaimowicz F. A saúde dos idosos brasileiros às vésperas do século XXI: problemas, projeções e alternativas. Rev Saúde Publica. 1997; 31(2):184-200.
- 04** Nieman DC. Exercício e saúde. Como se prevenir de doenças usando o exercício como seu medicamento. 1ªed. São Paulo: Manole 1999; 105-18.
- 05** Danowski JS. Osteoporose conceito, classificação e clínica. ARS CVRANDI Clínica Médica 1996; 29: 21 apud Rennó ACM, Driusso P, Ferreira V. 2001.
- 06** Yuaso DR, Sguizzatto GT. Fisioterapia em pacientes idosos. In: Netto MP. Gerontologia – A velhice e o envelhecimento em visão globalizada. São Paulo: Atheneu 2002; P.324-47.
- 07** Datasus: Banco de dados. [on line] 2003. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br/>
- 08** Rennó ACM, Driusso P, Ferreira V. Atividade física e osteoporose: uma revisão bibliográfica. Fisioter Mov 2001; 13(2): 49-54.
- 09** Chan KM, Anderson M, Lau EMC. Exercise interventions: defusing the world's osteoporosis time bomb. Bull W Health Organ 2003; 81(11).
- 10** Meinão IM, Pippa MGB, Romanelli PRS, Zerbini CAF. Doenças Osteometabólicas. In: Moreira C, Carvalho MAP. Noções práticas de reumatologia. Belo Horizonte: Health 1998; 2:379-404.

- 11** Arriagada M, Arinoviche R, Galenus 1997; 34: 33-6 apud IOF International Osteoporosis Foundation. Congresso Mundial de Osteoporose da OIF - o primeiro congresso mundial na região com foco na doença que torna ossos frágeis; 2004 Maio 14-18; Rio de Janeiro, Brasil.
- 12** International Osteoporosis Foundation (OIF). Congresso Mundial de Osteoporose da OIF - o primeiro congresso mundial na região com foco na doença que torna ossos frágeis; 2004 Maio 14-18; Rio de Janeiro, Brasil.
- 13** Jornal Riograndense reference of the Brazilian Society of Osteoporosis (SOBRAO) apud IOF International Osteoporosis Foundation, 2004.
- 14** Costa-Paiva L, Filardi S, Pinto-Neto AM, Samara A, Marques-Neto JF. Impact to degenerative radiographic abnormalities and vertebral fractures on spinal bone density of women with osteoporosis. São Paulo Med J 2002; 120(1).
- 15** Khan K, et al. Physical activity and bone health. Champaign: Human Kinetics. 2001; 276p.
- 16** Silva LK. Avaliação tecnológica em saúde: densitometria óssea e terapêuticas alternativas na osteoporose pós-menopausa. Cad Saude Publica 2003; 19(4):987-1003.
- 17** Oliveira FA, Reis MA, Castro ECC, Cunha SFC, Teixeira VPA. Doenças infecciosas como causas de morte em idosos autopsiados. Rev soc bras med trop. 2004; 37:33-36.
- 18** Chaimowicz F. Age transition of tuberculosis incidence and mortality in Brazil. Rev saúde pública. 2001; 35:81-87.
- 19** Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo Demográfico. Rio de Janeiro, 1991.

- 20** Veloz MCT, Nascimento-schulze CM, Camargo BV. Representações sociais do envelhecimento. *Psicol reflex crit.* 1999; 12:479-501.
- 21** Franceschi C, Bonafé M. Centenarians as a model for healthy aging. *Biochem soc trans.* 2003; 31:457-461.
- 22** Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo Demográfico. Rio de Janeiro, 2010.
- 23** Costa MFL, Guerra HL, Barreto SM, Guimarães RM. Diagnóstico da Situação de Saúde da População Idosa Brasileira: um Estudo da Mortalidade e das Internações Hospitalares Públicas. *Inf epidemiol SUS.* 2000; 9(1):23-41.
- 24** Ramos LR. Fatores determinantes do envelhecimento saudável em idosos residentes em centro urbano: Projeto Epidoso, São Paulo. *Cad saúde pública.* 2003, 19(3):793-798.
- 25** Achutti A, Azambuja MIR. Doenças crônicas não-transmissíveis no Brasil: repercussões do modelo de atenção à saúde sobre a seguridade social. *Ciênc. saúde coletiva.* 2004; 9(4):833-840.
- 26** Lima-costa MF, Veras R. Saúde pública e envelhecimento. *Cad. saúde pública,* Rio de Janeiro. 2003; 19(3):700-701.
- 27** Chesnut CH. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Compr Ther.* 1984; 10:14-17 apud Aisenbrey JA. 1987.
- 28** Whedon GD. Osteoporosis. *N Engl J Med.* 1981; 6:397-398 apud Aisenbrey JA. 1987.
- 29** Brewer V, Meyer BM, Keele MS, et al. Role of exercise in prevention of involuntional bone loss. *Med Sci Sports Exerc.* 1983; 15:445-449 apud Aisenbrey JA. 1987.

- 30** Marques Neto JF, Lederman R. Osteoporose Brasil 2000.Ed. Limay.1995.p.37 apud Costa-Paiva L, Filardi S, Pinto-Neto AM, Samara A, Marques-Neto JF. Impact to degenerative radiographic abnormalities and vertebral fractures on spinal bone density of women with osteoporosis. São Paulo Med J. 2002; 120(1).
- 31** Consensus Development Conference (CDC). Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. Am j med. 1993 apud Rennó ACM, Driusso P, Ferreira V. 2001.
- 32** Sinaki M. Postmenopausal spinal osteoporosis: Physical therapy and rehabilitation principles. Mayo clin proc. 1982; 57:699-703 apud Aisenbrey JA. 1987.
- 33** Navas LR, Lyles KW. Osteoporose. In: Duthie, Katz. Geriatria Prática. 3ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2002. p.211- 220.
- 34** Nordin BEC, Chatterton BE, Need A, Horowitz M. The definition, diagnosis and classification of osteoporosis. Phys med rehabil clín north am. 1995; 6(3):395-414.
- 35** Lukert BP. Diagnosis and management of osteoporosis. Compr ther. 1984;10:8-14 apud Aisenbrey JA. 1987.
- 36** Kaplan SJ, Hayes W C, Stone JC, Beaupre GS. Tensile strength of bovine trabecular bone. J biomech. 1985; 18(9):723-727.
- 37** Hollinger JO, Buck DC, Bruder SP. Biology of bone healing: Its impact on clinical therapy. Chicago. Quintessence. 1999; 17-53p.
- 38** Szejnfeld VL. Reumatologia. In: Prado FC, Ramos J, Valle JR. Atualização terapêutica. 20ªed. São Paulo: Artes Médicas. 2001; 18:1434-1437.
- 39** Martin TJ, Dempster DW. Bone structure and cellular activity. In: Stevenson JC, Lindsay R. Osteoporosis. Princeton University Press: Chapman & Hall Medical, 1998.
- 40** Einhorn TA. The bone organ system: form and function. In Osteoporosis. Edited by Marcus R, Feldman D, Kelsey J. San Diego, CA: ACADEMIC PRESS. 1996;3-22.

- 41** Athanasiou KA, Zhu CF, Lanctor DR, Agrawal GM, Wang X. Tissue Engineering. Mary nn Liebert, Inc. 2000.
- 42** Kierszembraum, A.L. Histologia e Biologia Celular: Uma introdução à patologia. Rio de Janeiro. *Elsevier*, 2004.
- 43** Plapler PG. Osteoporose e exercícios. Rev hosp clín fac med S Paulo. 1997; 52(3):163-170.
- 44** Muschler GF, Midura RJ. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. Clin orthop relat res. 2002; 395:66-80.
- 45** Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblast become osteocytes. Dev dyn. 2006; 235(1):176-190.
- 46** Frame B, Mckenna MJ. Osteoporosis: Postmenopausal or secondary? Hosp pract. 1985; 20:37-46 apud Aisenbrey JA. 1987.
- 47** Paccini MK, Glaner MF. Bone mineral density and dual-energy x-ray absorptiometry. Rev bras cineantropom desempenho hum. 2008; 10(1):92-99.
- 48** Borelli A. Envelhecimento ósseo: osteoporose. In: Filho ETC, Netto MP. Geriatria – Fundamentos, clínica e terapêutica. 1ªed. São Paulo: Atheneu. 2000; 22:297-307.
- 49** Aloia JF, Cohn SH, Ostuni JA, et al. Prevention of involutinal bone loss by exercise. Ann intern med. 1978; 89:356-358 apud Aisenbrey JA. 1987.
- 50** Fratzi P, Gupta H, Paschalis E, Roschger P. Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone. J mater chem. 2004; 14:2115–2123.
- 51** Compston J. Bone quality: what is it and how is it measured? Arq bras endocrinol metab [online]. 2006 Aug; 50(4):579-585.

- 52** Martin RM, Correa PHS. Bone quality and osteoporosis therapy. *Arq bras endocrinol metab* [online]. 2010; 54(2):186-199.
- 53** Delmas PD, Seeman E. Changes in bone mineral density explain little of the reduction in vertebral or nonvertebral fracture risk with anti-resorptive therapy. *Bone*. 2004; 34:599-604.
- 54** Felsenberg D, Boonen S. The bone quality framework: determinants of bone strength and their interrelationships, and implications for osteoporosis management. *Clin ther*. 2005; 27(1):1-11.
- 55** Frost HM. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcif tissue res*. 1969; 3:211-237.
- 56** Chesnut CH 3rd, Rosen CJ. Reconsidering the effects of antiresorptive therapies in reducing osteoporotic fracture. *J bone miner res*. 2001 Dec; 16(12):2163-2172.
- 57** Croucher PI, Garrahan NJ, Compston JE. Assessment of cancellous bone structure: comparison of strut analysis, trabecular bone pattern factor and marrow space star volume. *J bone miner res*. 1996; 11:955-961.
- 58** Järvinen TLN, Sievånen H, Jokihaara J, Einhorn TA. Revival of bone strength: the bottom line. *J bone miner res*. 2005; 20:717-720.
- 59** Paschalis EP, Verdelis K, Doty SB, Boskey AL, Mendelsohn R, Yamauchi M. Spectroscopic characterization of collagen cross-links in bone. *J bone miner res*. 2001; 16:1821-1828.
- 60** Wang XF, Shen X, Li X, Agrawal CM. Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone*. 2002; 31:1-7.
- 61** Vashishth D, Gibson GJ, Khoury JI, Schaffler MB, Kimura J, Fhyrie DP. Influence of non-enzymatic glycation on biomechanical properties of cortical bone. *Bone*. 2001; 28:1-7.

- 62** Paschalis EP, Shane E, Lyritis G, Skarantavos G, Mendelsohn R, Boskey AL. Bone fragility and collagen cross-links. *J bone miner res.* 2004; 19:2000-2004.
- 63** Riggs BL, O'Fallon WM, Lane A, Hodgson SF, Wahner HW, Muhs J, et al. Clinical trial of fluoride therapy in postmenopausal osteoporotic women: extended observations and additional analysis. *J bone miner res.* 1994; 9(2):265-275.
- 64** Burr DB. Targeted and non-targeted remodelling. *Bone.* 2002;30:2-4.
- 65** Ruppel ME, Burr DB, Miller LM. Chemical makeup of microdamaged bone differs from undamaged bone. *Bone.* 2006; 39(2):318-324.
- 66** Burr DB, Forwood MR, Fyhrie DP, Martin RB, Schaffler MB, Turner CH. Bone microdamage and skeletal fragility in osteoporotic and stress fractures. *J bone miner res.* 1997; 12(1):6-15.
- 67** Chapurlat RD, Delmas PD. Bone microdamage: a clinical perspective. *Osteoporos Int.* 2009; 20(8):1299-1308.
- 68** Chopra M, Galbraith S, Darnton-Hill I. A global response to a global problem: the epidemic of overnutrition. *Bull world health organ.* 2002; 80:952-958.
- 69** Conh SH, Abesamis C, Yamasura S et al. Comparative skeletal mass and radial bone mineral content in black and white women. *Metabolism.* 1977; 26: 171-178.
- 70** Bell NH, Shary J, Stevens J et al. Demonstration that bone mass is greater in black than in white children. *J bone miner res.* 1991; 6:719-723.
- 71** Heaney RP, Matkovic V. Inadequate peak bone mass. In Riggs BL, Melton III LJ (eds): *Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management*, 2nd ed. Philadelphia, Raven Press. 1995; 115-131.
- 72** Saraiva GL, Lazaretti-Castro M. Marcadores bioquímicos de remodelação óssea na pratica clínica. *Arq bras endocrinol metab.* 2002; 46(1): 72-78.

73 Richelson LS, Wahner HW, Melton LJ 3rd, Riggs BL. Relative contributions of aging and estrogen deficiency to postmenopausal bone loss. *New engl j med.* 1994; 311:1273-1275.

74 Pocock NA, Eisman JA, Hopper JL et al. Genetic determinants of bone mass in adults: a twin study. *J clin invest.* 1987; 80:706-710.

75 Reid IR, Plank LD, Evans MC. Fat mass is an important determinant of whole body bone density in premenopausal women but not in men. *J clin endocrinol metab.* 1992; 75:779-782.

76 Reid IR, Ames RW, Evans MC, Sharpe SJ, Gamble GD. Determinants of the rate of bone loss in normal postmenopausal women. *J clin endocrinol metab.* 1994; 79:950-954.

77 Bandeira F, Macedo G, Caldas G, Griz L, Faria M. Osteoporose. Rio de Janeiro: Medsi, 2000.

78 Szejnfeld VL. Osteoporose. *Rev bras med.* 2004; 61(7):417-428.

79 Ali JC. Osteoporose. *Acta ortop. bras.* [online]. 2001; 9(2): 53-62.

80 National Institutes of Health (NHI). Consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. *South med j.* 2001; 94:569–573. [PubMed: 11440324]

81 Grant SF, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston SH. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nat genet.* 1996; 14:203–205.

82 Uitterlinden AG, Pols HA, Burger H, Huang Q, van Daele PL, Van Duijn CM, Hofman A, Birkenhager JC, van Leeuwen JP. A large-scale population-based study

of the association of vitamin D receptor gene polymorphisms with bone mineral density. *J bone miner res.* 1996; 11:1241–1248.

83 Ioannidis JP, Ralston SH, Bennett ST, Brandi ML, Grinberg D, Karassa FB, Langdahl B, van Meurs JB, Mosekilde L, Scollen S, Albagha OM, Bustamante M, Carey AH, Dunning AM, Enjuanes A, van Leeuwen JP, Mavilia C, Masi L, McGuigan FE, Nogues X, Pols HA, Reid DM, Schuit SC, Sherlock RE, Uitterlinden AG. Differential genetic effects of ESR1 gene polymorphisms on osteoporosis outcomes. *Jama.* 2004; 292(17):2105–2114.

84 Eriksen EF, Hodgson SF, Eastell R, Cedel SL, O'Fallon WM, Riggs BL. Cancellous bone remodeling in type I (postmenopausal) osteoporosis: quantitative assessment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and cellular levels. *J bone miner res.* 1990; 5:311–319.

85 NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis. *Jama.* 2001; 285:785–795.[PubMed: 11176917]

86 Tzaphlidou M. Bone architecture: Collagen structure and calcium/phosphorus maps. *J biol phys.* 2008; 34:39–49.

87 Crabtree NJ, Kroger H, Martin A, Pols HA, Lorenc R, Nijs J, Stepan JJ, et al. Improving risk assessment: Hip geometry, bone mineral distribution and bone strength in hip fracture cases and controls. The Epos study. *Osteoporosis int.* 2002; 13(1):48–54.

88 Raef H, Al-Bugami M, Balharith S, Moawad M, El-Shaker M, Hassan A, Al-Shaikh A, Al-Badawid I. Updated recommendations for the diagnosis and management of osteoporosis: a local perspective. *Ann saudi med.* 2011 Mar-Apr; 31(2): 111–128.

89 Neco GPB. Proposta cinesioterápica no tratamento da mulher climatérica. *Fisioter mov.* 1994; 7(1): 30-48.

- 90** Kreipe, R.E. Bones of today, bone of tomorrow. *Am j dis child.* 1992; 146(1):22-25.
- 91** Chan YY, Bishop NJ. Clinical management of childhood osteoporosis. *Int j clin pract.* 2002; 56(4):280-286.
- 92** Slosman DO, Rizzoli R, Bonjour JP. Bone absorptiometry: a critical appraisal of various methods. *Acta paediatr suppl.* 1995 Sep; 411:9-11.
- 93** Consensus Development Conference (CDC). Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am j med.* 1993; 94:646-50.
- 94** Kanis JA. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet.* 2002; 359:1929-1936.
- 95** World Health Organization (WHO). Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO Technical report series 843. Geneva, 1994.
- 96** Patarca R, Saavedra RA, Cantor H. Molecular and cellular basis of genetic resistance to bacterial infection: the role of the early Tlymphocyte activation-1/osteopontin gene. *Crit rev immunol.* 1993; 13:225–246.
- 97** Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit rev oral biol med.* 2000; 11:279–303.
- 98** Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J clin invest.* 2001; 107:1055–1061.
- 99** Zuk PA, Zhu MIN, Ashjian P, Ugart DA, Huang JI, MizunoH. *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol biol cell.* 2002; 13(12):4279-4295.

- 100** Zhou Y, Liu Y, Tan J. Is 1,25-dihydroxyvitamin D3 an ideal substitute for dexamethasone for inducing osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells *in vitro*? *Chin med j (Engl)*. 2006; 119(15):278-1286.
- 101** Gericke A, Qin C, Spevak L, Fujimoto Y, Butler WT, Sørensen ES, Boskey AL. Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif tissue int*. 2005 Jul; 77(1):45-54. Epub 2005 Jul 14.
- 102** Prince CW, Butler WT. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the biosynthesis of osteopontin, a bone-derived cell attachment protein, in clonal osteoblast-like osteosarcoma cells. *Collagen relat res*. 1987; 7:305-313.
- 103** Oldberg A, Jirskog-Hed B, Axelsson S, Heinegard D. Regulation of bone sialoprotein mRNA by steroid hormones. *J cell biol*. 1989; 109:3183-3186.
- 104** O'Regan A, Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int j exp pathol*. 2000; 81:373–390.
- 105** Yokosaki Y, Tanaka K, Higashikawa F, Yamashita K, Eboshida A. Distinct structural requirements for binding of the integrins $\alpha v \beta 6$, $\alpha v \beta 3$, $\alpha v \beta 5$, $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha 9 \beta 1$ to osteopontin. *Matrix biol*. 2005; 24:418–427.
- 106** El-Tanani MK, Campbell FC, Kurisetty V, Jin D, McCann M, Rudland PS. The regulation and role of osteopontin in malignant transformation and cancer. *Cytokine growth factor rev*. 2006; 17:463–474.
- 107** Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ, Cantor H. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science*. 1996; 271:509–512.
- 108** Katagiri YU, Sleeman J, Fujii H, Herrlich P, Hotta H, Tanaka K, et al. CD44 variants but not CD44s cooperate with $\beta 1$ -containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine–glycine–aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer res*. 1999; 59:219–226.

- 109** Sodek J, Batista Da Silva AP, Zohar R. Osteopontin and mucosal protection. *J dent res.* 2006; 85:404–415.
- 110** Wang KX, Denhardt DT. Osteopontin: Role in immune regulation and stress responses. *Cytokine growth factor rev.* 2008; 19:333–345
- 111** Beck GR, Zerler B, Moran E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc natl acad sci USA.* 2000; 97(15): 8352-8357.
- 112** Gomez-Ambrosi J, Catalan V, Ramirez B, Rodriguez A, Colina I, Silva C, et al. Plasma osteopontin levels and expression in adipose tissue are increased in obesity. *J clin endocrinol metab.* 2007; 92:3719–3727.
- 113** Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends cell biol.* 2006; 16:79–87.
- 114** Ramaiah SK, Rittling S. Pathophysiological role of osteopontin in hepatic inflammation, toxicity and cancer. *Toxicol sci.* 2008; 103:4– 13. Epub 2007 Sep 22.
- 115** Steinman L, Martin R, Bernard C, Conlon P, Oksenberg JR. Multiple sclerosis: deeper understanding of its pathogenesis reveals new targets for therapy. *Annu rev neurosci.* 2002; 25:491–505.
- 116** Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. SLE and infections. *Clin rev allergy immunol.* 2003; 25:29–40.
- 117** Xu G, Nie H, Li N, Zheng W, Zhang D, Feng G, et al. Role of osteopontin in amplification and perpetuation of rheumatoid synovitis. *J clin invest.* 2005; 115:1060–1067.
- 118** Ohsuzu F. The roles of cytokines, inflammation and immunity in vascular diseases. *J atheroscler thromb.* 2004; 11:313–321.

- 119** Zhao X, Johnson JN, Singh K, Singh M. Impairment of myocardial angiogenic response in the absence of osteopontin. *Microcirculation*. 2007; 14:233–240.
- 120** Woodruff PG, Koth LL, Yang YH, Rodriguez MW, Favoreto S, Dolganov GM, et al. A distinctive alveolar macrophage activation state induced by cigarette smoking. *Respir crit care med*. 2005; 172: 1383–1392.
- 121** Gassler N, Autschbach F, Gauer S, Bohn J, Sido B, Otto HF, et al. Expression of osteopontin (Eta-1) in Crohn disease of the terminal ileum. *Scand j gastroenterol*. 2002; 37:1286–1295.
- 122** Banerjee A, Apte UM, Smith R, Ramaiah SK. Higher neutrophil infiltration mediated by osteopontin is a likely contributing factor to the increased susceptibility of females to alcoholic liver disease. *J pathol*. 2006; 208:473–485.
- 123** Xanthou G, Alissafi T, Semitekolou M, Simoes DC, Economidou E, Gaga M, et al. Osteopontin has a crucial role in allergic airway disease through regulation of dendritic cell subsets. *Nat med*. 2007; 13:570–578.
- 124** Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem biophys res commun*. 2001; 280:460–465.
- 125** Brown LF, Papadopoulos-Sergiou A, Berse B, Manseau EJ, Tognazzi K, Perruzzi CA, Dvorak HF, Senger DR. Osteopontin expression and distribution in human carcinomas. *Am j pathol*. 1994; 145:610-23.
- 126** Katagiri YU, Sleeman J, Fujii H, Herrlich P, Hotta H, Tanaka K, Chikuma S, Yagita H, Okumura K, Murakami M, Saiki I, Chambers AF, Uede T. CD44 variants but not CD44s cooperate with beta1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer res*. 1999; 59:219-26.

127 Senger DR, Wirth DF, Hynes RO. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell*. 1979; 16:885-93.

128 Denhardt DT, Mistretta D, Chambers AF, Krishna S, Porter JF, Raghuram S, et al. Transcriptional regulation of osteopontin and the metastatic phenotype: evidence for a Ras-activated enhancer in the human OPN promoter. *Clin exp metastasis*. 2003; 20:77–84.

129 Young MF, Kerr JM, Termine JD, Wewer UM, Wang MG, McBride OW, Fisher LW. "cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN)". *Genomics*. 1990; 7(1):491–502.

130 Kiefer MC, Bauer DM, Barr PJ. "The cDNA and derived amino acid sequence for human osteopontin." *Nucleic acids res*. 1989; 17(1):3306.

131 Crosby AH, Edwards SJ, Murray JC, Dixon MJ. "Genomic organization of the human osteopontin gene: exclusion of the locus from a causative role in the pathogenesis of dentinogenesis imperfecta type II". *Genomics*. 1995; 27(1):155–160.

132 Kazanecki CC, Kowalski AJ, Ding T, Rittling SR, Denhardt DT. Characterization of anti-osteopontin monoclonal antibodies: binding sensitivity to post-translational modifications. *J cell biochem*. 2007; 102:925–935.

133 Kazanecki CC, Uzwiak DJ, Denhardt DT. Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding. *J cell biochem*. 2007; 102:912–924.

134 Liaw L, Birk DE, Ballas CB, Whitsitt JS, Davidson JM, Hogan BL. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (*spp1*). *J.clin.invest*. 1998; 101:1468-1478.

135 Hashimoto M, Sun D, Rittling SR, Denhardt DT, Young W. Osteopontin-deficient mice exhibit less inflammation, greater tissue damage, and impaired locomotor

recovery from spinal cord injury compared with wild-type controls. *J neurosci.* 2007; 27:3603-3611.

136 Shao JS, Sierra OL, Cohen R, Mecham RP, Kovacs A, Wang J, Distelhorst K, Behrmann A, Halstead LR, Towler DA. Vascular calcification and aortic fibrosis: a bifunctional role for osteopontin in diabetic arteriosclerosis. *Arterioscler thromb vasc biol.* 2011; 31:1821-1833.

137 Bidder M, Shao JS, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Semenkovich CF, Towler DA. Osteopontin transcription in aortic vascular smooth muscle cells is controlled by glucose-regulated upstream stimulatory factor and activator protein-1 activities. *J boil chem.* 2002; 277:44485-44496.

138 Chang IC, Chiang TI, Yeh KT, Lee H, Cheng YW. Increased serum osteopontina is risk factor for osteoporosis in menopausal women. *Osteporos int.* 2010; 21:1401-1409.

139 Golledge J, Muller J, Shephard N, Clancy P, Smallwood L, Moran C, Dear AE, Palmer LJ, Norman PE. Association between osteopontina and human abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler thromb vasc boil.* 2007; 27:655-660.

140 Freitas WM, Quaglia LA, Santos SN, Soares AA, Japiassu AV, Boaventura V, Dos Santos Barros E, Cordova C, Nobrega OT, Sposito AC. Association of systemic inflammatory activity with coronary and carotid atherosclerosis in the very elderly. *Atherosclerosis.* 2011; 216:212-216.

141 Chiang Ti, Chang IC, Lee HS, Lee H, Huang CH, Cheng YW. Osteopontin regulates anabolic effect in human menopausal osteoporosis with intermittent parathyroid hormone treatment. *Osteoporos int.* 2011; 22:577-585.

142 D'Alfonso S, Barizzone N, Giordano M, Chiochetti A, Magnani C, Castelli L, Indelicato M, Giacopeli F, Marchini M, Scorza R, Danieli MG, Cappeli M, Migliaresi S, Bigliardo B, Sabbadini MG, Baldissera E, Galeazzi M, Sebastiani GD, Minisola G, Rayazzolo R, Dianzani U, Momigliano-Richiardi P. Two single-nucleotide

polymorphism in the 5' and 3' ends of the osteopontin gene contribute to susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis rheum.* 2005; 52:539-547.

143 Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, Rocha J, Bydlowski SP, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum hered.* 2006; 62:190-195.

144 Nobrega OT, Faleiros VP, Telles JL. Gerontology in the developing Brazil: achievements and challenges in public policies. *Geriatr gerontol int.* 2009; 9:135-139.

145 Karnikowski M, Cordova C, Oliveira JR, Karnikowski MG, Nobrega OT. Non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in Brazilian middle-aged and older adults. *São Paulo med j.* 2007; 125:333-337.

ANEXO A – APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de Projeto: CEP-FM 061/2011.

Título: "Associação de marcadores imunológicos e genômicos com doença aterosclerótica no paciente ambulatorial idoso".

Pesquisador Responsável: Otávio de Tolêdo Nobrega.

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

Data de entrega: 22/08/2011.

Parecer do (a) relator (a)

Aprovação

Não aprovação.

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB: 10/10/2011.

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB: 26/12/2011.

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, a coordenação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** "ad referendum" do CEP-FM, conforme parecer do (a) relator (a), o projeto de pesquisa acima especificado quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM, sendo o 1º previsto para 20 de julho de 2012.

Brasília, 18 de Janeiro de 2012.


Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina-UNB

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“Associação de marcadores imunológicos e genômicos com doença aterosclerótica no

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UNB

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA – UCB

INSTITUTO DE CARDIOLOGIA - BIOCÁRDIOS

paciente ambulatorial idoso.”

O envelhecimento pode ocasionar doenças ou o agravamento de suas manifestações no organismo, diminuindo a qualidade de vida da pessoa. Por isso, nós do Instituto de Cardiologia Biocárdios no Distrito Federal e do Hospital da Universidade Católica de Brasília (HUCB), em conjunto com pesquisadores da Universidade de Brasília (UnB), estamos trabalhando na busca por sinais clínicos e de laboratório que permitam antever o desenvolvimento de doenças associadas ao envelhecimento, sobretudo aquelas doenças relacionadas a problemas em importantes artérias do corpo humano, a exemplo da artéria coronariana e das artérias carotídeas.

Assim sendo, com o objetivo de encontrar características do organismo que possam contribuir para o diagnóstico precoce de distúrbios nestas artérias, necessitamos do seu consentimento para realizamos uma avaliação médica e por exames laboratoriais, incluindo a realização de testes genéticos. Esta pesquisa poderá possibilitar uma melhoria da compreensão do processo de envelhecimento do ser humano, o que por sua vez permitirá melhorar o atendimento e o aconselhamento prestados aos idosos assistidos tantos pelos programas públicos e quantos privados de saúde.

Dependendo dos resultados e da avaliação, o(a) senhor(a) poderá ser incluído no grupo de portadores ou não-portadores de uma doença ou achado clínico importante sobre as artérias estudadas.

Termo de consentimento

Fui informado que o protocolo experimental consistirá basicamente em uma avaliação médica e por exames laboratoriais, e que tais procedimentos não comprometerão minhas atividades cotidianas e não serão diferentes daqueles procedimentos rotineiramente recomendados pela prática clínica moderna. Responderei algumas perguntas sobre os medicamentos que utilizo, e como sigo o(s) tratamento(s) recomendado(s), mas terei plena liberdade de me recusar a responder caso eu não queira. Fui informado(a) ainda que este trabalho não oferecerá riscos expressivos à minha saúde, já que não realizarei movimentos anormais, não terei mudança de rotina, não entrarei em contato com quaisquer substâncias nocivas, nem terei qualquer instrumento introduzido em meu corpo, a não ser por ocasião de uma única coleta de um pequeno volume (15 mililitros) de sangue, onde me será assegurada utilização de agulhas descartáveis. A equipe do projeto se responsabilizou por prestar esclarecimentos a mim a qualquer momento da pesquisa, inclusive relativos a exames de laboratório realizados, disponibilizando para tanto as formas de contato presentes no rodapé desta página.

O pesquisador garantiu sigilo sobre a identidade do paciente pois os dados ficarão sob sua guarda, não sendo permitido acesso por pessoas não relacionadas à pesquisa. O pesquisador responsabilizou-se por qualquer dano que eu venha a sofrer, e também explicou que as amostras coletadas poderão ser estocadas para outras pesquisas, mas que serei contatado para conceder minha autorização para cada nova utilização.

Assim, por este documento, dou meu consentimento à exploração dos dados coletados por este projeto de pesquisa.

Brasília, _____ de _____ de 20____.

Nome do paciente

Nome do profissional que prestou informações

Assinatura do paciente

Assinatura do profissional que prestou informações

Responsável: Prof. Dr. Otávio Nóbrega.

Termo de consentimento livre e esclarecido

***Campus Universitário Darcy Ribeiro
Av. L2 604/605 Norte, Brasília - DF***

***Fone: 0xx61 8451-3718
e-mail: otavionobrega@unb.br***