



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**

**LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI (LIKA)**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE**

**TIAGO DE ARRUDA PONTES**

**TESE DE DOUTORADO**

**ESTUDO METABONÔMICO DE PACIENTES PORTADORES DE  
OSTEOPOROSE PÓS-MENOPAUSA**

**RECIFE, 2019**

**TIAGO DE ARRUDA PONTES**

**ESTUDO METABONÔMICO DE PACIENTES PORTADORES DE  
OSTEOPOROSE PÓS-MENOPAUSA**

*Tese de doutorado apresentado ao  
Programa de Pós-graduação em  
Biologia Aplicada à Saúde da  
Universidade Federal de  
Pernambuco como requisito para  
obtenção do título de Doutor em  
Biologia Aplicada à Saúde.*

**Área de concentração:**  
Biotecnologia e Inovação em Saúde

**Orientador: Mário Ribeiro de Melo-Junior**

Professor Associado, Depto. Patologia – CCM/UFPE

Pesquisador do Setor de Patologia – LIKA/UFPE

**Co-orientador: Ricardo Oliveira da Silva**

Professor Adjunto, Depto. Química Fundamental – CCEN/UFPE

Pesquisador do setor de Ressonância Magnética Nuclear do DQF/CCEN/UFPE

Catálogo na fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Pontes, Tiago de Arruda

Estudo metabônico de pacientes portadores de osteoporose pós-menopausa / Tiago de Arruda Pontes. – 2019.

92 f. : il.

Orientadora: Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo-Junior.

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências.

Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2019.

Inclui referências e anexo.

1. Mulheres – Doenças. 2. Osteoporose em mulheres. 3. Pós-menopausa. I. Melo-Júnior, Mário Ribeiro de (Orientador). II. Silva, Ricardo Oliveira da (Coorientador). III. Título.

616.716

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 - 200

**TIAGO DE ARRUDA PONTES**

**TESE DE DOUTORADO**

**ESTUDO METABONÔMICO DE PACIENTES PORTADORES DE OSTEOPOROSE  
PÓS MANOPAUSA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovado (a) em: 26/ 02/ 2019

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profº. Dr. Mario Ribeiro de Melo Junior  
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profº. Dr. Luiz Bezerra Carvalho Júnior  
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profª. Drª. Beate Saegesser Santos  
Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profª. Drª Claudete Fernandes Pereira  
Programa de Pós Graduação em Química  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profª. Drª. Paulo Antônio Galindo Soares  
Departamento de Bioquímica - UFPE

Dedico essa tese ao meu padrinho José Fernando Pessoa Pontes (*in memoriam*) por todo incentivo e estímulo para meus estudos. E também a todos os meus professores e professoras que com sabedoria e dedicação ajudaram a construir a pessoa que sou. A todos deixo essa homenagem e meu eterno agradecimento e respeito!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, sabedoria e discernimento necessários para se chegar onde estou. Foram muitas etapas, desde os 5 anos de idade, quando entrei na alfabetização até o doutorado na UFPE, 26 anos ininterruptos de estudo, leitura e aprendizado. Juntos com muitos colegas de caminhada, passei por momentos difíceis e outros tantos de alegria. Porém, tudo valeu a pena porque tive fé em Deus e Ele me ajudou a fazer as escolhas certas.

A meus pais, Orlando e Tida, por me darem uma boa educação, confiarem em mim e estimularem o meu desenvolvimento. Vocês foram fundamentais, amo vocês.

A meus irmãos, Menelau e Fernando, que sempre demonstraram confiança em mim e isso fez com que eu tivesse ainda mais responsabilidade em realizar as minhas atividades. Amo vocês.

As minhas queridas avós do coração Irene Pontes (*in memoriam*) e Didi por todas as vezes que foram me levar e buscar no Grupo Escolar Severino Ferreira Pontes, onde estudava. As caminhadas pela estrada de terra renderam muitas histórias e lembranças inesquecíveis da minha trajetória escolar.

Aos meus queridos avós maternos Biu Bianor (*in memoriam*) e Irene Brasileira que sempre orou e torceu pelo meu futuro.

A meu avô paterno Zuca Pontes (*in memoriam*) que embora tenha partido nos meus primeiros anos de vida, seu legado de ética e moralidade ajudaram a construir o meu caráter.

Aos meus tios, tias, primos, primas e cunhada que sempre torceram por mim e têm nas minhas conquistas um motivo de orgulho. Vocês são especiais pra mim.

Aos muitos amigos que fiz durante toda essa trajetória: amigos de infância em Sairé-PE, amigos de juventude em Bezerros-PE e os amigos da UFPE sobretudo aqueles que fiz no período que morei na casa do estudante, esses são irmãos que a vida me deu.

A um casal de amigos-irmãos-tios, Gerlânia e Neto, que me acompanham desde o ensino médio e sempre me acudiram em momentos de dificuldade. Amo vocês.

A todos os meus professores, em especial a meu orientador Mario Ribeiro por ter abraçado a ideia de desenvolver esse projeto em parceria com a química e ao meu amigo e orientador Ricardo Oliveira que foi de uma dedicação ímpar no acolhimento, ensinamento e execução desse trabalho, muito obrigado!

Ao Grupo Metabonômica do qual faço parte, sobretudo as pessoas de Ronaldo Dionísio, Carlos Jonnatam e Tássia Brenda, que me deram todas as dicas no uso da espectroscopia e quimiometria. Vocês foram uma peça chave, muito obrigado.

Ao Departamento de Química Fundamental (DQF/UFPE) que me acolheu desde os primeiros anos de iniciação científica, através da profa Rosa Maria Souto Maior, em 2008 e continuou com a equipe da Central Analítica que foram instrumentos para que eu pudesse concluir esse trabalho. A esse departamento e seus colaboradores, meu muito obrigado.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA) pela acolhida e o empenho em manter sempre uma boa estrutura para realização dos experimentos. A todos os funcionários, muito obrigado. Faço um agradecimento a equipe de pesquisa BioMol que foram muito gentis em me ajudar na coleta dos soros, em especial a Camilla Lima, Werbson Guaraná, muito obrigado pela parceria e amizade.

Ao amigo Dr. Alexandre Domingues, que colaborou comigo durante todo o processo de criação do projeto, seleção de pacientes e discussão de resultados. Seu apoio foi fundamental, muito obrigado.

E por fim, mas não menos importante, agradeço a minha esposa Susi Pontes pela compreensão, paciência e estímulos para que eu chegasse até aqui. Te amo muito.

A todos, que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho e que não tive como mencionar aqui, meu “muito obrigado”!

## RESUMO

No intuito de contribuir com o diagnóstico de doenças do metabolismo ósseo, como a osteoporose, foram realizadas análises espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênios (RMN- $^1\text{H}$ ) do soro do sangue de pacientes a fim de traçar, junto com a quimiometria, um perfil metabonômico capaz de separar grupos portadores de doença, daqueles saudáveis. Foram coletadas 78 amostras de mulheres pós menopausadas, divididas em três grupos, controle (CO), osteoporose (OST) e osteopenia (OPN). Os espectros obtidos foram pré processados e os resultados foram tratados estatisticamente através de técnicas quimiométricas. O modelo obtido conseguiu separar os três grupos analisados, através do formalismo LDA (Análise de Discriminante Linear) com uma exatidão de 88%, especificidade de 88,5% e sensibilidade de 88%. Os metabólitos significativos identificados através dos gráficos dos *loadings* e do VIP (*Variable Importance in the Projection*) foram: alantoína, lactato, lipídios insaturados e carboidratos. Alterações nesses metabólitos são relacionadas com as vias de metabolismo dos lipídios, de carboidratos e de aminoácidos, algumas das quais envolvem o sistema oxidante do metabolismo. O modelo metabonômico proposto conseguiu separar os grupos portadores de doença (OST e OPN) do grupo controle, através da análise de componentes principais (PCA) com variância explicada 67,2% com duas componentes principais (PC), chegando a 86,2% considerando cinco PC's; o grupo de osteopenia foi distinguido do grupo osteoporose usando o método estatístico Projeções Ortogonais para Análise Discriminante de Estruturas Latentes (OPLS-DA) que obteve  $Q^2=0.41$ ,  $R^2Y=0.87$  e  $p<0,01$ . Os parâmetros clínicos foram avaliados quanto a sua influência no modelo e apenas os dados de densitometria óssea tiveram valor estatístico ( $p<0,05$ ), como esperado. Também foi apresentada uma correlação entre os metabólitos do soro e a presença de osteoporose, um achado relevante para aplicação na clínica médica, uma vez que fraturas podem ser prevenidas quanto mais cedo forem diagnosticadas as perdas de massa óssea.

Palavras-chave:  $^1\text{H}$ -NMR. Metabonômica osteopenia osteoporose pós-menopausa

## ABSTRACT

To contribute to the diagnosis of diseases of bone metabolism, such as osteoporosis, spectroscopic analyzes of the serum of patients were carried out in order to draw a metabomic profile capable of separating disease-carrying groups from those who are healthy. The 78 (voluntary) samples selected were divided into three groups: control (CO), osteoporosis (OST) and osteopenia (OPN); and analyzed individually through the Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance ( $^1\text{H-NMR}$ ). The spectra obtained were pre-processed and the results were treated statistically by chemometric techniques. The obtained model was able to separate the three analyzed groups through the formalism LDA (Analysis of Linear Discriminants) with an accuracy of 88%, specificity of 88.5% and sensitivity of 88%, these results were considered very good for the model. The significant metabolites identified through the loadings and VIP graph were: allantoin, lactate, unsaturated glycerides and glycines. Changes in these metabolites are related to lipid, carbohydrate and amino acid metabolism pathways, some of which involve the oxidizing system. The proposed metabolic model was able to separate the disease - bearing groups (OST and OPN) from the control group through the principal components analysis (PCA) with variance explained of 67.2% already in the first two main components (PC), reaching 86, 2% up to the 5th PC; the osteopenia group was distinguished from the osteoporosis group using the orthogonal formalism of the partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA) with  $Q^2 = 0.41$ ,  $R^2Y = 0.87$  and  $p < 0.01$ . The clinical parameters were evaluated for their influence on the model and only the bone densitometry data had statistical value ( $p < 0.05$ ), as expected. There was also a correlation between serum metabolites and the presence of osteoporosis, which is relevant for application in the medical clinic, since fractures can be prevented the sooner the bone mass losses are diagnosed.

Keywords:  $^1\text{H-NMR}$ ; metabonomics. Osteopenia. postmenopausal osteoporosis

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Corte transversal de um osso longo mostrando os dois tipos de tecido ósseo: esponjoso e compacto, além dos canais de Havers e Vakmann. (Fonte: web, domínio público. Disponível em: <a href="https://is.gd/CiY4MR">https://is.gd/CiY4MR</a> ) ..... | 17 |
| Figura 2 - Número de publicações com os termos “metabonomics” or “metabolomics” ao longo dos últimos anos. ....                                                                                                                                                | 29 |
| Figura 3 - Diagrama de energia dos estados de spin para um núcleo com número quântico de spin $I = 1/2$ , em função da intensidade do campo magnético aplicado $B_0$ .....                                                                                     | 31 |
| Figura 4 - Representação da precessão de um núcleo atômico. Fórmula da lei de Larmor : $\omega$ é a frequência de Larmor, $\gamma$ é a razão magnetogírica e $B_0$ o campo magnético aplicado.....                                                             | 32 |
| Figura 5 - Efeito de um pulso de radiofrequência de $90^\circ$ sobre vetor de magnetização $M_0$ . (Disponível em: <a href="http://quimicanova.sbq.org.br">http://quimicanova.sbq.org.br</a> ) .....                                                           | 33 |
| Figura 6 - (A) FID obtido de um pulso de RF de $90^\circ$ no canal de hidrogênios para amostras de soro. (B) Espectro de RMN obtido após Transformada de Fourier no mesmo FID.....                                                                             | 34 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Fases da remodelação óssea (TELLA; GALLAGHER, 2014a).<br>(adaptado) .....                                                                                | 18 |
| Tabela 2 - Classificação da DMO (Densidade Mineral Óssea) de acordo com o<br>T-Score do DXA (Densitometria Óssea). (Segundo a Organização Mundial da<br>Saúde)..... | 21 |

## LISTA DE ABREVIATÖES

|                            |                                                                                                                                         |
|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>B0</i> .....            | Campo Magnético Aplicado                                                                                                                |
| CO .....                   | Grupo CONTROLE                                                                                                                          |
| CPMG.....                  | Sequência de Pulsos de Carl-Purcell-Meiboom-Gill                                                                                        |
| DMO.....                   | Densidade Mineral Ósea                                                                                                                  |
| DMX .....                  | Densitometria Ósea                                                                                                                      |
| FID.....                   | <i>Free Induction Decay</i> (Decaimento Livre de Indução)                                                                               |
| LDA.....                   | <i>Linear Discriminant Analysis</i> (Análise Discriminante Linear)                                                                      |
| LOOCV.....                 | <i>Leave One Out Cross Validation</i> (Validação Cruzada Total)                                                                         |
| OPLS-DA.....               | <i>Orthogonal Partial Least Square – Discriminant Analysis</i> (Projeções Ortogonais para Análise Discriminante de Estruturas Latentes) |
| OPN.....                   | Grupo OSTEOPENIA                                                                                                                        |
| OST.....                   | Grupo OSTEOPOROSE                                                                                                                       |
| PC.....                    | <i>Principal Component</i> (Componente Principal)                                                                                       |
| PCA.....                   | <i>Principal component analysis</i> (Análise de Componentes Principais)                                                                 |
| PLS-DA.....                | Partial Least Squares– <i>Discriminant Analysis</i> (Regressão Por Mínimos Quadrados Parciais – Análise Discriminantes)                 |
| Rf.....                    | Radiofrequência                                                                                                                         |
| RMI .....                  | Ressonância Nuclear Magnética de Imagem                                                                                                 |
| RMN .....                  | Ressonância Magnética Nuclear                                                                                                           |
| RMN de <sup>1</sup> H..... | Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1                                                                                           |
| RMS .....                  | Espectroscopia de Ressonância Magnética                                                                                                 |
| VIP.....                   | <i>Variable Importance in the Projection</i> (Importância das Variáveis na Projeção)                                                    |
| γ.....                     | Razão Magnetogírica                                                                                                                     |
| δ.....                     | Deslocamento Químico                                                                                                                    |
| ω.....                     | Frequência De Larmor                                                                                                                    |

## SUMÁRIO

|          |                                                                                                                        |           |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                | <b>13</b> |
| 1.1      | OBJETIVOS .....                                                                                                        | 14        |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                                                                                      | <b>16</b> |
| 2.1      | TECIDO ÓSSEO E SISTEMA ESQUELÉTICO.....                                                                                | 16        |
| 2.2      | OSTEOPOROSE .....                                                                                                      | 19        |
| 2.2.1    | Classificação Da Osteoporose .....                                                                                     | 20        |
| 2.2.2    | Biomarcadores na Osteoporose .....                                                                                     | 23        |
| 2.2.3    | Tratamento.....                                                                                                        | 25        |
| 2.3      | METABONÔMICA.....                                                                                                      | 27        |
| 2.3.1    | Espectroscopia De Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....                                                            | 29        |
| 2.4      | QUIMIOMETRIA.....                                                                                                      | 35        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODO .....</b>                                                                                        | <b>38</b> |
| 3.1      | COLETA DOS DADOS E ASPECTOS ÉTICOS .....                                                                               | 38        |
| 3.2      | ESPECTROS DE RMN .....                                                                                                 | 38        |
| 3.3      | TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....                                                                                            | 39        |
| 3.4      | PROCESSAMENTO DOS DADOS.....                                                                                           | 39        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS.....</b>                                                                                                 | <b>40</b> |
| 4.2      | ARTIGO SUBMETIDO - OSTEOPENIA-OSTEOPOROSIS DISCRIMINATION<br>IN POSTMENOPAUSAL WOMEN BY 1H NMR-BASED METABONOMICS..... | 40        |
| 5.2      | SHORT COMMUNICATION - AVALIAÇÃO METABONÔMICA DE<br>PACIENTES OSTEOPÊNICOS FRENTE AO TESTE DO FRAX®.....                | 58        |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSÕES .....</b>                                                                                                | <b>67</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                | <b>68</b> |
|          | <b>APÊNDICE I – ESPECTRO RMN DE SORO, NÃO PROCESSADO.....</b>                                                          | <b>77</b> |
|          | <b>APÊNDICE II – ESPECTRO DE RMN APÓS PRESAT .....</b>                                                                 | <b>78</b> |
|          | <b>APÊNDICE III – ESPECTRO DE RMN –H<sup>1</sup> APÓS TÉCNICA DE CPMG .....</b>                                        | <b>79</b> |
|          | <b>APÊNDICE IV – PROTOCOLO DO USO DO ESPECTRÔMETRO VARIAN®<br/>DE 400MHZ.....</b>                                      | <b>80</b> |
|          | <b>ANEXO A – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA .....</b>                                                                       | <b>83</b> |
|          | <b>ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DE USO DOS DADOS .....</b>                                                                    | <b>88</b> |
|          | <b>ANEXO C – CARTA ANUÊNCIA PARA USO DO ESPECTRÔMETRO.....</b>                                                         | <b>89</b> |
|          | <b>ANEXO D - CARTA ANUÊNCIA LIKA.....</b>                                                                              | <b>90</b> |
|          | <b>ANEXO E – CARTA ANUÊNCIA PS VILA ROCA.....</b>                                                                      | <b>91</b> |
|          | <b>ANEXO F – CARTA RESPOSTA ACEITE ARTIGO .....</b>                                                                    | <b>92</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças ósseas metabólicas são alterações generalizadas do esqueleto devido a um desequilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea; esses males, que surgem a partir de distintos processos patológicos crônicos, produzem efeitos deletérios sobre a arquitetura óssea e a sua função. O número de pessoas no mundo afetadas por essas doenças é substancial e crescente com o envelhecimento da população. A mais comum delas é a osteoporose, a qual é caracterizada pela diminuição da densidade mineral óssea e o aumento da fragilidade óssea.

A osteoporose é considerada uma importante doença degenerativa presente na população; ela atinge, sobretudo, mulheres com faixa etária a cima dos 50 anos e pós-menopausadas. Por sua prevalência em idosos, não é incomum a sobreposição do tratamento de osteoporose com o de outras doenças, o que corrobora com um outro problema: os efeitos colaterais pelo uso de muitos medicamentos.

Ao estudar a osteoporose deve-se levar em consideração um outro problema ósseo, a osteopenia, que ocorre em pacientes que possuem uma perda de massa óssea intermediária. Embora se leve a um risco menor de fraturas, comparando com a osteoporose, os osteopênicos são sabidamente mais propícios às fraturas do que os pacientes saudáveis.

A osteoporose surge por um desequilíbrio na homeostase dos processos de formação e reabsorção óssea. Esse último prevalecendo, graças a ação dos osteoclastos sobre osteoblastos. Essas duas células são regidas por substâncias como a vitamina D, diversas citocinas e hormônios. A diminuição hormonal na menopausa é uma das causas mais citadas quando se estuda a fisiopatogenia da osteoporose pós-menopausa.

O diagnóstico da osteoporose é feito com auxílio da Densitometria Óssea (DXO), um método referência, capaz de identificar medir a Densidade mineral óssea e comparar com padrões para idade e sexo. Toda a estratégia de tratamento é realizada a partir dessa medida, junto com anamnese do paciente. A DXO só identifica a perda de massa óssea já estabelecida e há uma linha

tênue entre iniciar uma terapia medicamentosa precoce em pacientes osteopênicos e iniciar o tratamento em pacientes osteoporóticos, diagnosticados tardiamente. Sob o risco de prejudicar o paciente.

Por isso, os estudos de biomarcadores de formação e reabsorção óssea são usados como ferramentas complementares ao diagnóstico, a fim de anteceder as condições de perda irreversível de massa óssea. Entre as ferramentas capazes de investigar possíveis biomarcadores, a metabonômica se apresenta como uma ferramenta de análise de biofluidos capaz de identificar metabólitos e classificar amostras de paciente com osteoporose ou com osteopenia.

A metabonômica fundamenta-se no uso de técnicas quimiométricas empregadas a dados espectrais, principalmente de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), obtidos a partir de amostras de biofluidos como soro. O resultado dessa abordagem é a obtenção de um modelo metabonômico capaz de diferenciar de forma reprodutiva, a partir do perfil metabonômico de cada amostra (metabólitos), os pacientes que são acometidos pela doença daqueles que são saudáveis.

Esta tese consiste em uma pesquisa aplicada, onde verificou-se os resultados clínicos de pacientes com osteoporose e osteopenia, bem como se propôs um modelo metabonômico, através da estatística multivariada, capaz de diferenciá-los e assim abrir caminhos para um futuro uso no diagnóstico dessa doença. Além de agregar na pesquisa médica mais uma opção de estudo, com o uso dessa técnica inovadora.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Geral

O objetivo desse trabalho foi construir um modelo metabonômico capaz de identificar potenciais biomarcadores presentes nos biofluidos (soro do sangue) que tenham valor preditivo para o diagnóstico de osteoporose em mulheres pós menopausa.

### **1.1.2 Específicos**

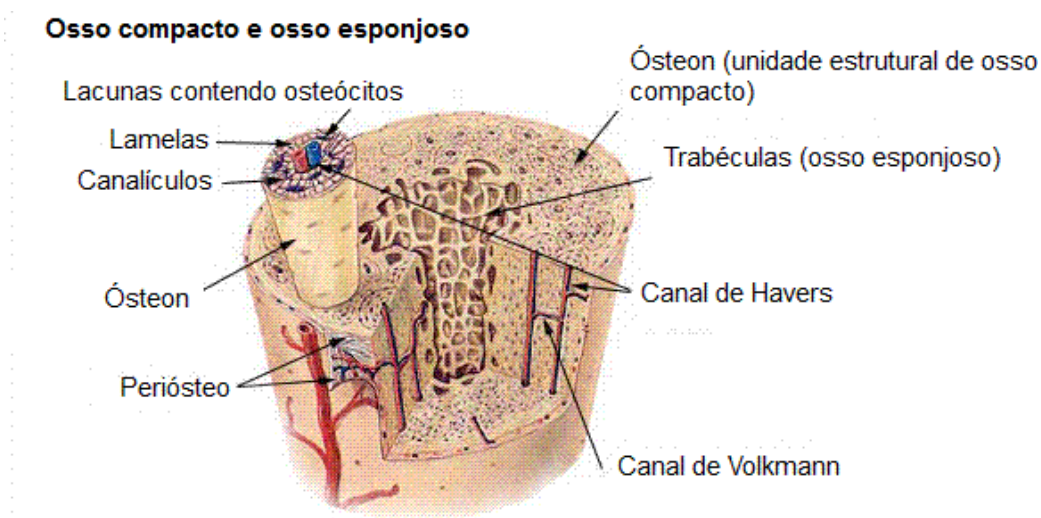
- ✓ Desenvolver modelos metabonômicos que apresentem correlação com a medida de densidade mineral óssea de pessoas com e sem osteoporose diagnosticada;
- ✓ Identificar quais regiões do espectro de RMN são discriminatórias e atribuí-las a metabólitos que são potenciais biomarcadores para diferenciar pacientes acometidos pela osteoporose de pacientes saudáveis;
- ✓ Utilizar o modelo metabonômico para separar grupos de pacientes com osteoporose dos pacientes com osteopenia;
- ✓ Correlacionar os dados clínicos dos voluntários, obtidos em prontuário, com os resultados do modelo metabonômico.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 TECIDO ÓSSEO E SISTEMA ESQUELÉTICO

O osso é um tecido vivo dinâmico e complexo, remodelado continuamente. Cada osso, individualmente, corresponde a um órgão composto de vários tecidos que desenvolvem funções específicas. O conjunto desses órgãos, forma o sistema esquelético, que dentre as suas variadas funções destacam-se: suporte e sustentação para os tecidos moles e fixação de tendões; proteção contra impactos e lesões; assistência ao movimento em conjunto com o sistema muscular; produção de eritrócitos (hematopoese) em sites específicos (medula); homeostasia mineral, principalmente, cálcio e fósforo (TORTORA; DERRICKSON, 2016).

Os ossos são organizados em dois tipos: trabecular (esponjoso), que corresponde 20% da massa óssea dos adultos; e o cortical (compacto) que corresponde a 80% (figura 1). Por possuir maior superfície óssea e consequentemente maior número de células, o osso trabecular possui maior atividade metabólica que o osso cortical. Esse último, desempenha funções importantes na resistência e na formação de canais de comunicação, chamados de canais de Havers e canais de Volkmann (KHAJURIA; RAZDAN; MAHAPATRA, 2014; IOLASCON, 2013; SEEMAN, 2008).



*Figura 1: Corte transversal de um osso longo mostrando os dois tipos de tecido ósseo, esponjoso e compacto. Além dos canais de Havers e Vakmann. (Fonte: U.S. National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program (<http://training.seer.cancer.gov/index.html>). Disponível em: <https://is.gd/CiY4MR>).*

O metabolismo ósseo, em geral, envolve quatro tipos celulares: osteoblasto, osteoclasto, osteócito e as células de revestimento ósseo. Os osteoclastos e os osteoblastos são em menor número e localizam-se nos sítios de remodelamento ósseo. Os osteócitos representam o maior número de células ósseas, são derivados do osteoblasto. Já as células de revestimento, recobrem a superfície do osso (ASADA et al., 2013). Os osteoclastos são células multinucleadas capazes de reabsorver o osso mineralizado, enquanto que os osteoblastos são responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea (MEBAREK et al., 2013; SIDDIQUI; OWEN, 2013).

A matriz óssea corresponde ao material extracelular do osso, ela é formada por componentes proteicos, celulares e minerais. Na matriz óssea inorgânica o componente mineral predominante são os cristais de hidroxapatita. Esses cristais são formados por fósforo e cálcio, que representam 99% do cálcio corporal e 80% do fósforo corporal total (LEWIECKI, 2011a). A matriz óssea orgânica é formada predominantemente, de colágeno tipo 1 (cerca de 90% de toda a matriz); e, os outros 10% são representados por proteínas, como os proteoglicanos (parte proteica), osteocalcina e osteonectina. A matriz orgânica também é um reservatório de fatores de crescimento, como os fatores de crescimento semelhantes à insulina - I e II (IGF-I e II) (BIGUETTI et al., 2019; SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002; SEEMAN, 2008).

A remodelação óssea é o processo homeostático pelo qual o osso vai se renovando ao longo do tempo. O processo normal de remodelação óssea consiste em quatro fases: ativação, reabsorção, reversão e formação da fase de repouso (Tabela 1). A saúde óssea é mantida por um contínuo remodelamento ósseo que depende de um equilíbrio entre as funções dos osteoclastos e osteoblastos. A perda óssea ocorre quando a reabsorção excede a formação óssea (MORI et al., 2013; RAGGATT; PARTRIDGE, 2010).

*Tabela 1: Tabela: Fases da remodelação óssea (TELLA; GALLAGHER, 2014a).  
(Adaptado)*

| <b>FASE</b>       | <b>CARACTERÍSTICA</b>                                                                                                                    |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Ativação</b>   | Osteoclastos são recrutados para a superfície do osso                                                                                    |
| <b>Reabsorção</b> | Osteoclastos geram um microambiente ácido entre a célula e a superfície do osso, dissolvendo ou reabsorvendo o conteúdo mineral do osso. |
| <b>Reversão</b>   | Osteoclastos sofrem apoptose e os osteoblastos são recrutados para a superfície óssea.                                                   |
| <b>Formação</b>   | Osteoblastos depositam colágeno; isso é mineralizado para formar novo osso.                                                              |

O processo de remodelação óssea, mais intenso nas três primeiras décadas de vida, é responsável por criar um pico de massa óssea, além das características físicas como a geometria e a resistência do osso. Os ossos crescem por ossificação endocondral (crescimento em comprimento) e por aposição periosteal (crescimento em largura). Durante a infância a modelação óssea ocorre fundamentalmente na superfície periosteal, e na adolescência sobrevém a ossificação endocondral (MATKOVIC et al., 1990; LIN et al., 2003). O pico de massa óssea é o maior grau de massa ou densidade óssea atingida durante a vida, o seu auge ocorre em torno dos 20 anos de idade para a coluna e o quadril, mas outros ossos, como o rádio, podem atingir um pico aos 40 anos de idade. Existem vários fatores, sobretudo os de origem genética, que influenciam esse pico de massa óssea, mas outros também são relevantes como a etnia, o sexo, a ingestão de cálcio e vitamina D, o sedentarismo, além dos maus hábitos como tabagismo e alcoolismo (LIN et al., 2003; TELLA; GALLAGHER, 2014b).

Ao longo da vida, os ossos são continuamente remodelados pela homeostasia óssea buscando manter a microestrutura óssea que é fundamental para o desenvolvimento das funções do esqueleto. A remodelação começa com a reabsorção óssea pelos osteoclastos e finaliza com a formação óssea pelos osteoblastos. Portanto, a produção dos osteoclastos a partir dos seus precursores hematopoiéticos é fundamental para que ocorra a remodelação

óssea. E os principais agentes envolvidos no processo de diferenciação dos osteoclastos são: a interação entre o Receptor Ativador de Fator Nuclear kappa-B (RANK) e o seu ligante (RANKL) e o Fator Estimulador de Colônia dos Macrófagos (M-CSF) (MABILLEAU et al., 2008). Esse último sofre influência da calcitonina, que ao se ligar no seu receptor inibe a ação do M-CSF, já a ligação RANK-RANKL é contra regulada pela osteoprotegerina (OPG), uma proteína expressa pelos osteoblastos, e regulada por citocinas e hormônios (LEWIECKI, 2011b; XIONG; O'BRIEN, 2012).

A vitamina D [1,25-di-hidroxitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub>D)] atua diminuindo a ação dos osteoclastos por enfraquecer a produção do RANKL. A insuficiência de vitamina D, eleva as concentrações do paratormônio (PTH) circulantes e junto com glicocorticoides (GCs) aumentam a produção de RANKL e inibem a produção de OPG, favorecendo a reabsorção óssea. Já o estrogênio e o Fator de Crescimento Tumoral  $\beta$  (TGF $\beta$ ) aumentam a produção de OPG pelos osteoblastos, inibindo a osteoclastogênese (INADA; MIYAURA, 2010; AGHOLME; ASPENBERG, 2011).

Em idosos, baixos índices de vitamina D são detectados sobretudo devido a: ação do envelhecimento, redução dos processos de sua absorção intestinal, baixa da atividade da enzima 25(OH)D-1 $\alpha$ -hidroxilase e da capacidade de sua síntese na pele, causando baixa massa óssea e fraturas. Além disso, a deficiência de estrogênio é fator importante nas mulheres pós-menopausa onde há uma intensificação nesse processo, chegando a ser registrada mais de 10% de diminuição na Densidade Mineral Óssea (DMO) e cerca de 15 a 20% de aumento no índice de fraturas vertebrais em mulheres após os 60 anos. Na menopausa, a deficiência de estrogênio prejudica o metabolismo ósseo, aumentando a atividade de reabsorção osteoclástica sem um aumento correspondente na atividade osteoblástica. O resultado é o aparecimento da osteoporose pós-menopausa (INADA; MIYAURA, 2010; TELLA; GALLAGHER, 2014a).

## 2.2 OSTEOPOROSE

A osteoporose é uma doença esquelética sistêmica, caracterizada por uma baixa massa óssea e uma deterioração da microarquitetura do tecido ósseo com consequente aumento da fragilidade óssea, o que predispõe o risco aumentado de fraturas. Ela atinge dez milhões de brasileiros, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2018). Dados da *International Osteoporosis Foundation* (IOF, 2018) apontam que a doença atinge mais de duzentos milhões de mulheres e causa quase nove milhões de fraturas anualmente no mundo. De acordo com a Sociedade Brasileira de Reumatologia, as projeções estimadas para os próximos anos revelam que o número de fraturas de quadril osteoporóticas atinja 140 mil pessoas por ano até 2020 (STOLNICKI; OLIVEIRA, 2016).

Na maioria dos casos, a osteoporose é uma condição relacionada ao envelhecimento e pode manifestar-se em ambos os sexos, mas as mulheres são as maiores acometidas: uma em cada três, acima de 45 anos de idade, tem predisposição a desenvolver osteoporose. A incidência da doença pode variar de 14% a 29% em mulheres acima de 50 anos de idade e chegar até 73% em mulheres acima de 80 anos de idade. Em mulheres acima de 50 anos de idade, o risco de fratura do colo do fêmur é de 17,5% e da coluna, de 16%. A presença de uma fratura vertebral dobra o risco de futuras fraturas vertebrais (MATTOS, 2017).

### **2.2.1 Classificação Da Osteoporose**

Para se classificar a osteoporose deve-se levar em consideração a resistência óssea, que reflete a integração de dois parâmetros principais: densidade e qualidade ósseas (NIH, 2001). A resistência do osso a fraturas, é o resultado da sua composição estrutural, mineral e pelas atividades das células ósseas, que são responsáveis pelo metabolismo ósseo e a habilidade de reparar lesões e micro lesões nesse tecido (SEEMAN, 2008).

Os critérios para o diagnóstico da osteoporose foram definidos em 1994 pela Organização Mundial de Saúde, levando em consideração os resultados de exames de Densitometria Mineral Óssea (DXA), uma técnica baseada em dupla

emissão de raios X e não invasiva. Nesta avaliação o item T-Score compara a densidade mineral óssea (DMO) de um indivíduo portador de baixa massa óssea com o valor médio esperado para adultos jovens e expressa essas diferenças sob a forma de desvio padrão (DP) (WHO, 1994). A baixa densidade mineral óssea (expressa em gramas por centímetro quadrado) é um preditivo de fraturas, com um risco relativo de fratura nos sítios de estudo (quadril, coluna e fêmur), sem valor limite absoluto para definir um estado patológico (DEMPSTER, 2011; KHOSLA; MELTON, 2007).

Quando o T-Score é igual ou maior que -1,0 DP, considera-se uma densidade mineral óssea normal. Existe baixa DMO quando o T-Score encontra-se entre -1,0 e -2,5 DP, condição chamada de osteopenia. Já a osteoporose é classificada quando o T-Score é igual ou inferior -2,5 DP (Tabela 2). Chamamos de osteoporose grave ou estabelecida quando o T-Score está a baixo de -2,5 DP e o indivíduo apresenta uma fratura por fragilidade associada (BARBOSA, 2013; KANIS et al., 2009).

*Tabela 2: Tabela 2: Classificação da DMO de acordo com o T-Score do DXA. (Segundo a Organização Mundial da Saúde).*

|                    | <b>T - Score</b>       |
|--------------------|------------------------|
| <b>OSSO NORMAL</b> | <b>Maior que -1</b>    |
| <b>OSTEOPENIA</b>  | <b>Entre -1 e -2,5</b> |
| <b>OSTEOPOROSE</b> | <b>Menor que -2,5</b>  |

Embora o risco de fratura seja maior entre os pacientes com osteoporose do que entre aqueles com osteopenia, o número crescente de pessoas com osteopenia significa que este grupo representa uma parte substancial da

população em risco de fratura. Isso se deve ao fato da osteopenia ser um grupo de risco intermediário (KHOSLA; MELTON, 2007). Para auxiliar na tomada de decisão no grupo de paciente osteopênicos, os profissionais de saúde fazem uso da ferramenta FRAX®, que avalia o risco individual de fraturas do quadril e fraturas osteoporóticas nos próximos 10 anos de vida (FRAX®, 2008). Esse modelo foi desenvolvido a partir de estudos populacionais em todos os continentes e leva em consideração idade, perda de peso, fraturas prévias, etilismo excessivo, tabagismo atual, presença de artrite reumatoide, osteoporose secundária (por uso de medicamentos), imobilidade, consumo de glicocorticoides e histórico familiar de fratura. No entanto, há uma série de limitações por não levar em consideração fatores de risco relacionado a queda e também por não ser útil em pacientes com osteoartrite, que podem ter aumento da DMO de coluna em 10%(KANIS et al., 2011). A prevenção eficaz de fraturas pode ser melhorada através da combinação de medições da densidade mineral óssea com fatores de risco clínicos (CURTIS et al., 2017; DE LAET et al., 2005).

Para auxiliar na identificação de pacientes com osteopenia que estão em risco aumentado de fraturas, são realizados testes adicionais que contribuem na tomada de decisão, principalmente entre pacientes com valores semelhantes para a densidade mineral óssea. São eles:

- Avaliação de fraturas vertebrais - Embora o melhor preditivo de fraturas seja uma fratura anterior, as fraturas vertebrais podem não ser clinicamente aparente. Em pacientes assintomáticos com osteopenia, a radiografia é, portanto, uma ferramenta útil para descobrir quaisquer fraturas vertebrais não reconhecidas (CUMMINGS; MELTON, 2002; KAPTOGE et al., 2006; SZULC, 2018).
- Testes laboratoriais - Devem ser observados os níveis séricos de cálcio e fósforo, testes de função renal e hepática, medição de hormônio estimulante da tireoide. Em situações de pacientes com valores de DMO com T score de -2 ou inferior, uma avaliação dos níveis de deficiência de vitamina D, que são comuns em mulheres pós-menopáusicas e podem contribuir para a perda óssea. A deficiência de vitamina D deve ser tratada antes de iniciar a

terapêutica farmacológica (FINK et al., 2016; GAUGRIS et al., 2005; JAMAL et al., 2005) .

### **2.2.2 Biomarcadores na Osteoporose**

Biomarcadores também são usados como adjuvantes na identificação de pacientes com osteoporose e podem ser identificados em análises laboratoriais. Isso depende da medição de enzimas e outras proteínas liberadas durante a formação do tecido e dos produtos de degradação, produzidos durante a reabsorção óssea. Vários marcadores bioquímicos já foram identificados e permitem uma análise sensível da taxa de formação óssea e a reabsorção óssea do esqueleto. Embora esses marcadores ósseos ainda não sejam muito utilizados no diagnóstico da osteoporose, devido a sua especificidade, parecem ser úteis para o acompanhamento individual de pacientes com osteoporose tratados com agentes anti-reabsorção (EASTELL, 2001; PAGANI; FRANCUCCI; MORO, 2005)

Segundo Watts (1999), os marcadores bioquímicos ósseos são divididos em 3 categorias: (I) enzimas ou proteínas, que são secretadas pelas células envolvidas na remodelação; (II) produtos da quebra do colágeno; (III) produtos oriundos da síntese do novo tecido ósseo. Por se tratar de um processo conjugado, esses marcadores refletem o estado total da remodelação e são, em geral, classificados de acordo com as situações nas quais estão agudamente elevados. Uma vez que o processo de reabsorção é mais curto que o de formação, marcadores de reabsorção respondem mais rápido às mudanças que os de formação (MARQUES et al., 2016; ROSS; KNOWLTON, 1998).

Entre os marcadores de reabsorção óssea destacam-se a Fosfatase Ácida Tartarato-resistente (TRACP) e produtos da degradação do colágeno, como os telopeptídeos (CTX-I e NTX-I). A fosfatase ácida é uma enzima lisossomal presente nos ossos, plaquetas, eritrócitos, baço e próstata. Das suas cinco isoenzimas, a isoforma óssea é tartarato resistente. Existem ensaios para sua quantificação no plasma e soro, sendo os níveis séricos usualmente mais altos que os plasmáticos devido à liberação da fosfatase ácida dos eritrócitos durante a coagulação. Porém, reflete mais o número do que a atividade dos osteoclastos. Já os marcadores de formação óssea são numerosos, os fragmentos pró-

colágeno são secretados por osteoblastos que clivam esses fragmentos nas terminações amino e carboxi-terminais na síntese do colágeno tipo I. Formando os fragmentos amino-terminais (PINP) e carboxi-terminais (PICP) (VASIKARAN et al., 2014).

Uma vez que a reabsorção óssea e formação de osso são processos acoplados, marcadores de reabsorção e a formação óssea podem ser utilizados para avaliar a taxa de remodelação óssea (SEIBEL, 2005). Em estudos populacionais, o aumento da remodelação óssea está associada com um risco aumentado de fratura, independentemente da densidade mineral óssea, e com uma probabilidade mais elevada de perda óssea acelerada (MILLER et al., 1999a; WU et al., 2014).

Componentes séricos como o colesterol também foram relacionados ao metabolismo ósseo, a hipercolesterolemia tem sido associada à baixa densidade mineral óssea em alguns estudos: Orozco (2004) divulgaram que mulheres na pós-menopausa com perfil lipídico alterado tinham DMO lombar e femoral mais baixas e tinham um risco aumentado de osteopenia em comparação àquelas com perfil lipídico normal, sugerindo que a hiperlipidemia poderia estar associada à osteoporose. Em um estudo longitudinal de Tankó et al. (2003) verificaram que em mulheres na pós-menopausa com idade entre 50 e 75 anos, aquelas com aumento no colesterol sérico apresentaram as maiores reduções na DMO da coluna, independentemente da mudança no índice de massa corporal. Poiana et al. (2013) realizaram um estudo de coorte com 610 mulheres osteoporóticas pós-menopáusicas, e correlações significativas entre o perfil lipídico e DMO foram observadas.

Há estudos que correlacionam lipídios insaturados com a saúde esquelética, estes incluem vários mecanismos potenciais, como o aumento da interleucina-6 (IL-6) e da proteína C-reativa (PCR) referentes à idade, relacionando-os com a osteoporose (LENCEL; MAGNE, 2011; SIASOS et al., 2011). Lipídios oxidados, característicos de hiperlipidemia, modulam a reabsorção do hormônio da paratireoide (PTH), induzindo a expressão de RANKL e suprimindo a diferenciação de células do estroma da medula óssea em osteoblastos (SAGE et al., 2011; TARAKIDA et al., 2011; WANG et al., 2018). Majima et al. (2008) relataram que mulheres pós-menopáusicas com perfil

lipídico normal apresentam um nível sérico de fosfatase alcalina específica (BAP) significativamente maior em comparação com mulheres na pós-menopausa com hipercolesterolemia (MAJIMA et al., 2008). Além disso, o telopéptido N-terminal do colágeno tipo I (NTX) apresenta correlação positiva e significativa com o colesterol total (CT) e o colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) nas mulheres (YOU et al., 2011).

Já o estresse oxidativo ou baixos níveis circulantes de antioxidantes, foram propostos como relacionados à redução da densidade mineral óssea (DMO) e percussores de osteoporose (LEE et al., 2015). Os estudos de Lv et al. (2016) trazem informações relevantes a respeito do uso de metabólitos endógenos como potenciais preditivos da osteoporose; foram identificados perturbações metabólicas no ácido araquidônico, leucina, isoleucina, lactato, taurina e colesterol, correlacionadas com a diminuição da massa óssea.

No entanto, a reprodutibilidade a longo prazo de medição do marcador ósseo em um paciente único, que depende das características analíticas e alterações biológicas dos metabólitos, permanece mal documentada (HANNON; EASTELL, 2000; VASIKARAN et al., 2011). Esta informação é de crucial importância para o uso clínico de marcadores bioquímicos onde uma única medida deve permitir a identificação de pacientes em risco a nível individual.

### 2.2.3 Tratamento

Dependendo da avaliação do risco de fratura, intervenções não farmacológicas e farmacológicas são recomendadas (KANIS, 2002). O risco pode ser estratificado de acordo com o sistema FRAX em conjunto com análise dos biomarcadores disponíveis (Tabela 3).

*Tabela 3: Estratificação do risco de fratura versus intervenções recomendadas (TELLA; GALLAGHER, 2014a).*

| RISCO DE FRATURA | INTERVENÇÃO RECOMENDADA |
|------------------|-------------------------|
|------------------|-------------------------|

|          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Baixo    | Recomendar mudanças no estilo de vida e ingestão diária adequada de cálcio total de 1200 mg e vitamina D 800 UI                                                                                                                                                                                                                                          |
| Moderado | A medicação pode ou não ser considerada necessária, além do aconselhamento sobre estilo de vida e ingestão diária adequada de cálcio e vitamina D. Importante discutir opções com o paciente e procurar outros fatores de risco clínicos, como perda de altura vertebral, fraturas, uso prolongado ou repetido de corticosteroides e quedas recorrentes. |
| Alto     | Considerar o tratamento farmacológico, além do aconselhamento sobre estilo de vida e ingestão adequada de cálcio e vitamina D. Os pacientes com fratura de quadril e outras fraturas são considerados de alto risco.                                                                                                                                     |

Com relação a terapia medicamentosa a *Food and Drug Administration* aprovou uma série de medicamentos para a prevenção da osteoporose pós-menopausa, incluindo bisfosfonatos (alendronato, risedronato, e ibandronato), modulador do receptor de estrogênio seletivo (raloxifeno) e estrogênios orais ou transdérmicos (CRANNEY et al., 2002; FDA, 2018). Porém, a decisão de qual tratamento farmacológico usar deve fundamentar-se em fortes evidências de que a intervenção realmente evitará fraturas e suas consequências; e se o esperado benefício excede os riscos e efeitos adversos do uso dos medicamentos (WANNMACHER, 2004).

A terapia de reposição hormonal (TRH) ainda pode ser considerada uma opção de primeira linha para prevenção de perda óssea e fratura no período pós-menopausa precoce, por um período de 5 anos em mulheres com baixo risco de eventos adversos classicamente associados à TRH. Combinações de estradiol e didrogesterona proporcionam um alívio muito eficaz dos sintomas da menopausa e a prevenção da osteoporose (STEVENSON; PANAY; PEXMAN-FIETH, 2013). No entanto, vários estudos apontam os riscos da terapia hormonal,

sugerindo um maior conhecimento das vias biológicas que medeiam a TRH e os biomarcadores para essas doenças (MANSON et al., 2013; PRENTICE, 2014).

As decisões relativas à terapia farmacológica devem considerar o longo período de tratamento (geralmente prescrito durante pelo menos 5 a 10 anos e, por vezes, indefinidamente) e os seus custos substanciais e possíveis efeitos colaterais. Fatores de risco adicionais para fratura como por exemplo, fraturas vertebrais ou uso prolongado de corticoide, são nitidamente candidatos a terapia farmacológica. Entretanto, na ausência de tais indicações convincentes, a avaliação do estilo de vida combinada com acompanhamento da DMO é uma estratégia razoável, desde que o paciente não esteja na faixa osteoporótica, condição favorável a terapia farmacológica, inclusive para a prevenção de mais perda óssea. (MILLER et al., 1999b; KHOSLA; MELTON, 2007).

Alguns entraves na área de doenças metabólicas ósseas ainda não resolvidas, como a incapacidade de distinguir com clareza entre as mulheres com osteopenia nos quais a terapia medicamentosa se justifique e aquelas nas quais as intervenções no estilo de vida são suficientes; a relevância da DMO em outros sítios além do quadril; diferentes medições de DMO obtidas com outros aparelhos (por exemplo, ultrassonografia ou tomografia computadorizada); incerteza nos valores de referência da DMO para pacientes de baixa estatura e a divergência na definição do intervalo ideal para acompanhamento da DMO, também são descritas como dificuldades que podem ser minimizadas pelo uso concomitante de biomarcadores no diagnóstico das doenças do metabolismo ósseo (PASCO et al., 2006; KHOSLA; MELTON, 2007; SCHMIDT et al., 2018).

Embora haja muita expectativa sobre o uso de biomarcadores no diagnóstico da osteoporose, a base de evidências para uso como preditivo de fratura não é robusta o suficiente (VILACA; GOSSIEL; EASTELL, 2017). Além disso existem trabalhos inconclusivos e por muitas vezes conflitantes (POIANA et al., 2013) .

## 2.3 METABONÔMICA

A metabonômica é uma ferramenta inovadora na área de pesquisa de biomarcadores em biofluidos e na aplicação em processos de auxílio no diagnóstico precoce de doenças. Seu caráter pouco invasivo, uma vez que faz uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de biofluidos como soro ou urina, que são de fácil obtenção, torna possível o emprego da metabonômica na prática médica, devido alta performance na identificação de perfil de metabólitos presentes, sensibilidade e especificidade (GODOY et al., 2010).

O termo metabonômica foi usado inicialmente em um estudo publicado por pesquisadores no Reino Unido no final da década de 1990. Nessa publicação, foi definido o termo metabonômica como “a medida quantitativa da resposta metabólica multiparamétrica dinâmica dos sistemas vivos a estímulos fisiopatológicos ou modificações genéticas”. Baseada na espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), a metabonômica surgiu como um método inovador na análise dos metabólitos presentes em amostras biológicas. Além de complementar informações obtidas pela genômica e proteômica. Com a vantagem de que a metabonômica trabalha com a identificação, caracterização e quantificação de mudanças metabólicas em um sistema biológico. (NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999)

A metabonômica, frequentemente, é descrita como sinônimo do termo metabolômica, porém há diferenças entre essas duas abordagens. Metabolômica tem como objetivo a determinação e quantificação de metabólitos em uma amostra biológica, para isso, faz uso de técnicas de separação como a cromatografia e utiliza-se principalmente da espectroscopia de massa como ferramenta de análise. Por conseguinte, a metabonômica busca identificar um perfil dos metabólitos endógenos, presentes nos biofluidos, sem necessariamente ter que isolar ou quantificar todos os componentes. Nessa abordagem a espectroscopia de RMN é a ferramenta mais utilizada, uma vez que é capaz de gerar uma “impressão digital” dos metabólitos e com isso, contribuir na classificação de grupos com alguma alteração metabólica ou status biológicos distintos (NICHOLSON e LINDON, 2008) e (DUNN; ELLIS, 2005).

As aplicações da metabonômica descritas na literatura variam de áreas químicas, alimentícias e mais recente, área médica. Uma revisão publicada em

2012, mostrou o uso da metabonômica no estudo de biofluidos humanos para diversos tipos de câncer, usando a ressonância magnética nuclear de hidrogênio (DUARTE; GIL, 2012). Qiao et al.(2016) estudaram a esquizofrenia de pacientes tratadas com olanprazina, através da metabonômica analisando o plasma sanguíneo. Nosso grupo de pesquisa (DQF/UFPE) desenvolveu um modelo diagnóstico para fibrose periportal por esquistossomose mansônica em pacientes com hepatite, através da abordagem metabonômica (GOUVEIA et al., 2017)

É notável o elevado número de publicações, cujo objeto de estudo é a estratégia metabonômica. Em consulta a plataforma web of Science (webofknowledge.com) pode-se observar várias publicações a partir de buscas com os termos “*metabonomics* or *metabonomic*” em títulos de artigos, resumos e palavras-chave, no intervalo entre os anos de 1999 e 2018. A pesquisa retornou mais de 11 mil artigos publicados, sendo observado um número crescente de artigos publicados a cada ano, evidenciando o interesse acadêmico (Figura 01).

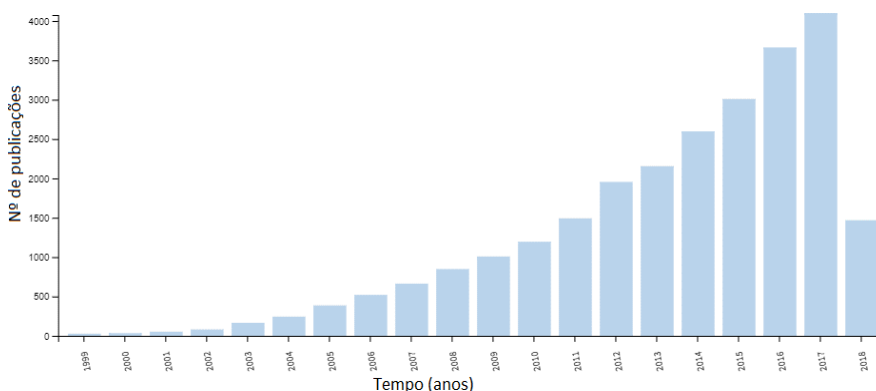


Figura 2: Gráfico mostrando o número de publicações com os termos “*metabonomics*” or “*metabolomics*” ao longo dos últimos anos.

### 2.3.1 Espectroscopia De Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A metabonômica baseia-se, principalmente, na espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) que é uma poderosa ferramenta utilizada para elucidação estrutural de compostos químicos inorgânicos, orgânicos e

biomoléculas. Para isso, se fundamenta nas propriedades magnéticas dos núcleos atômicos presentes em uma determinada amostra, permitindo a detecção e quantificação de compostos químicos localizadas no tecido vivo de forma não invasiva (JUCHEM; ROTHMAN, 2014)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) não deve ser confundida com a Ressonância nuclear magnética de imagem (RMI), mais comumente utilizada na medicina pela capacidade de gerar informações anatômicas e permitindo distinguir tecidos moles com nitidez. Os scanners de RMI mais modernos fazem uso da espectroscopia de ressonância magnética (RMS) para fornecer informações da estrutura química e conseqüentemente, dos metabólitos do tecido, analisado *in vivo*, sendo mais específica em diagnosticar e avaliar doenças do que apenas a informação morfológica adquirida usando a imagem anatômica sozinha, obtida pela RMI. Essas modalidades de ressonância utilizam campos magnéticos da ordem de 1,5 T (Tesla), de baixa resolução, enquanto os espectrômetros usados na metabonômica são superiores a 7T (Tesla) , com alta resolução.(GALLAGHER, 2010; HOLMES; TSANG; TABRIZI, 2006)

A espectroscopia de RMN é adquirida a partir da interação dos núcleos atômicos com a radiação eletromagnética, na presença de um campo magnético externo ( $B_0$ ). Para que um núcleo atômico seja analisável por RMN, é necessário que ele possua spin nuclear ( $I$ ) diferente de 0 (zero). Isso ocorre em núcleos com número atômico e/ou número de massa ímpar. Esse fenômeno está associado à quebra da degenerância (níveis iguais de energia) dos estados de spin ( $I$ ) para um determinado núcleo atômico, na presença de um campo magnético externo ( $B_0$ ). Quando ocorre a quebra da degenerescência há diferença de energia entre os estados de spin ( $\Delta E$ ), ficando um dos estados de energia ligeiramente em excesso (Figura 03). Essa pequena diferença entre as populações dos níveis de

energia é o que permite observar a ressonância magnética nuclear (LEVITT, 2008; PAVIA et al., 2010).

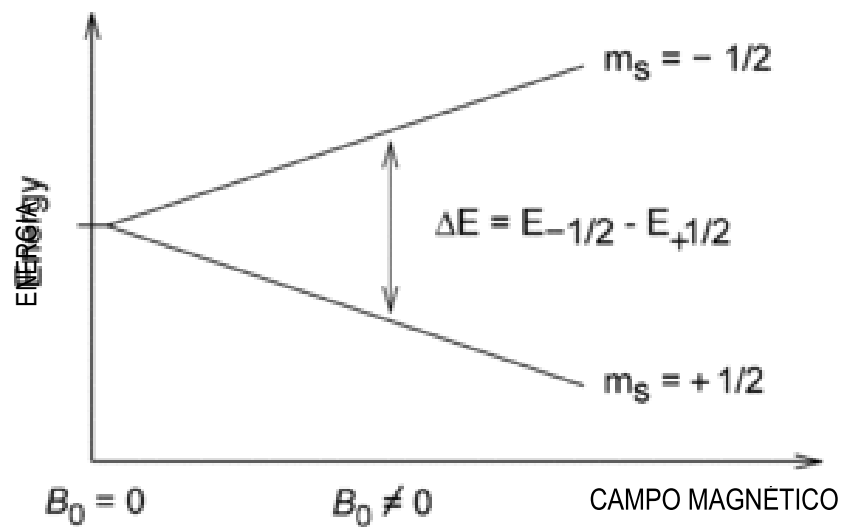


Figura 3: Diagrama de energia dos estados de spin para um núcleo com número quântico de spin  $I = 1/2$ , em função da intensidade do campo magnético aplicado  $B_0$ .

Ao aplicar o campo magnético, os núcleos absorvem energia e começam a mudar de direção sobre seu próprio eixo. Esse movimento é chamado de precessão e se dá ao redor do campo. O momento magnético de spin se move em um cone, com um ângulo constante em relação ao campo. A frequência de precessão depende da força do campo magnético externo - uma relação descrita pela equação de *Larmor* (Figura 04). Quanto mais forte for o campo magnético, maior a frequência de precessão e o excedente populacional gera um vetor de magnetização ( $M_0$ ) no sentido do campo aplicado ( $B_0$ ) (LEVITT, 2008).

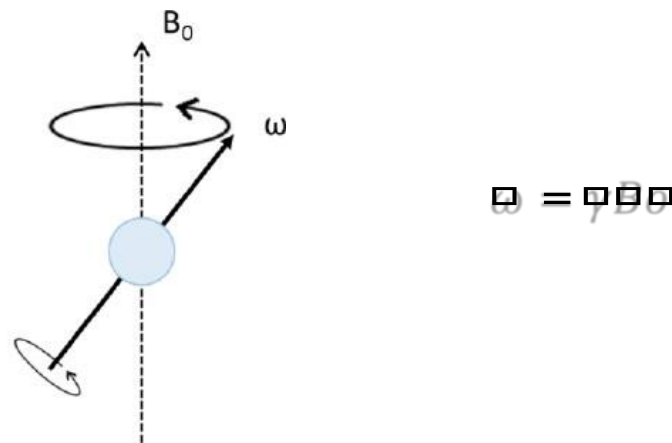


Figura 4: Representação da precessão de um núcleo atômico. Fórmula da lei de Larmor :  $\omega$  é a frequência de Larmor,  $\gamma$  é a razão magnetogírica e  $B_0$  o campo magnético aplicado. (fonte: web, domínio público)

Na presença de um pulso definido de radiofrequência (RF), lançado sobre o sistema com campo magnético externo, que tem a mesma frequência que os prótons (núcleos de  $H^1$ ) em precessão, causa ressonância e transferência de energia, mudando a orientação do vetor magnetização  $M_0$  que estava inicialmente no eixo Z (figura 5). Ao controlar o pulso, o vetor de magnetização  $M_0$  pode girar em diferentes ângulos decompondo o vetor de magnetização em duas componentes – no plano xy ( $M_{xy}$ ) e no eixo z ( $M_z$ ). Antes da aplicação do pulso de RF, a componente  $M_z$  tem intensidade máxima, enquanto a componente  $M_{xy}$  é nula. Após a aplicação de um pulso de  $90^\circ$ , a componente  $M_{xy}$  tem intensidade máxima e a componente  $M_z$  tem intensidade mínima. Quando o pulso de radiofrequência é desligado, o sistema tende a voltar a condição de equilíbrio, por processos denominados de relaxação (figura 5c). No caso ilustrado, o tempo necessário para a componente no plano xy voltar à condição inicial é chamado de tempo de relaxação transversal ( $T_2$ ), enquanto o tempo necessário para a componente no eixo z voltar à condição inicial é chamado de tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) (CHAN et al., 2015; SKOOG, 2012)

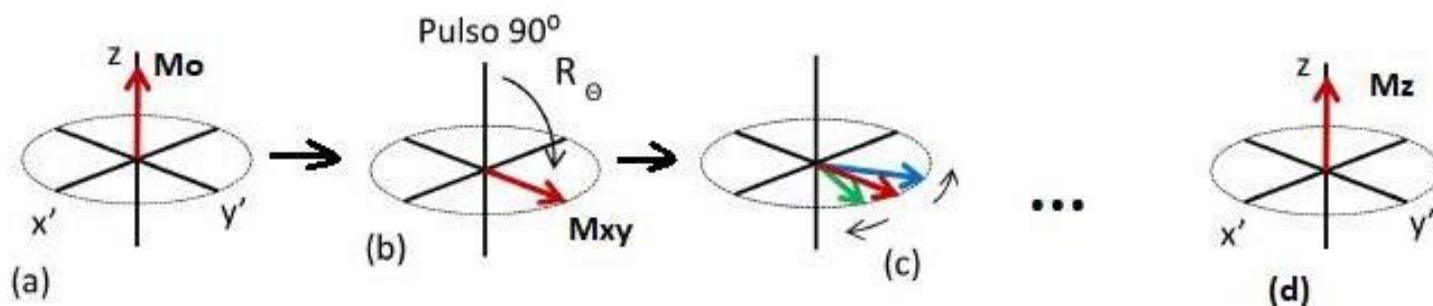
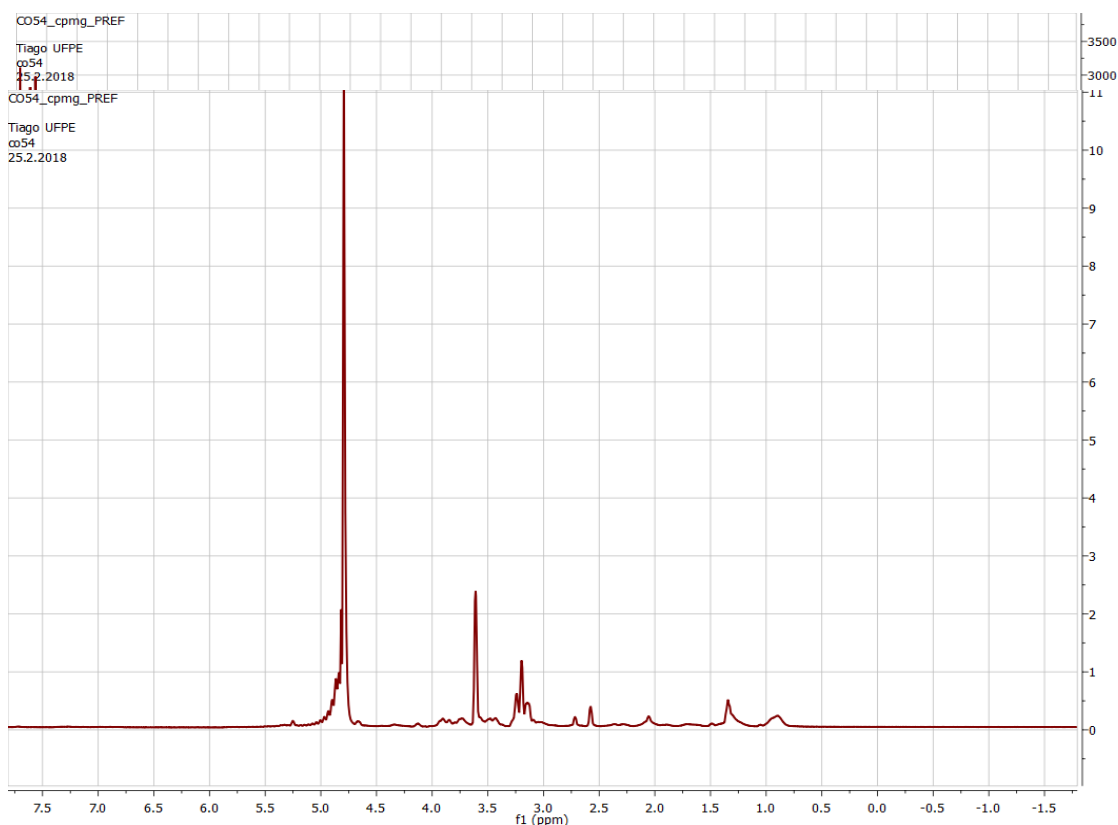


Figura 5: Efeito de um pulso de radiofrequência de  $90^\circ$  sobre vetor de magnetização  $M_0$ . (Disponível em: <http://quimicanova.sbg.org.br> ).

No processo de relaxação há liberação de energia absorvida por sensores capazes de produzir o FID (do inglês *Free Induction Decay*), que é o decaimento livre de indução no tempo. Aplicando-se uma Transformada de Fourier, o sinal no domínio do tempo é convertido no espectro de RMN que representa o núcleo analisado como deslocamentos químicos (figura 6). Cada núcleo, em uma mesma espécie química, apresenta ambientes eletrônicos distintos e a grande utilidade da espectroscopia de RMN é justamente poder identificar esses núcleos baseado nos seus deslocamentos químicos distintos (PAVIA et al., 2010; BARROS, 2017).



*Figura 6:(A) FID obtido de pulso de RF de 90° no canal de hidrogênios para amostras de soro. (B) Espectro de RMN obtido após Transformada de Fourier no mesmo FID.*

A abundância natural do isótopo de hidrogênio-1 é de 99,98% e a sua alta frequência nos biofluidos fazem com que a estratégia metabonômica use preferencialmente a espectroscopia RNM de  $^1\text{H}$  para gerar o perfil de metabólitos desses biofluidos, embora existam outros núcleos, como  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  e  $^{15}\text{N}$ , que também poderiam ser utilizados (KEUN, 2006).

Em soluções verdadeiras, os tempos de relaxação transversal e longitudinal são os mesmos. Porém, em amostras biológicas que apresentam moléculas de diferentes pesos moleculares, esses tempos de relaxação (T1 e T2) tendem a ser ligeiramente diferentes, o que acabam por tornar os sinais do espectro de RMN alargados. Para solucionar esse problema foi utilizado um pulso de RF específico chamado Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG), onde foi acrescido um filtro T2 capaz de minimizar os efeitos indesejáveis das moléculas com alto peso molecular, tornando o espectro mais propício às análises com sinais mais finos (DYSON; PALMER, 2012).

Outro problema encontrado no espectro de RMN de biofluidos é o intenso sinal da água. Por ser a maior composição das amostras, a água também acaba sendo o sinal mais expressivo no espectro, isso interfere na visualização dos sinais adjacentes. Esse problema é solucionado aplicando-se um pulso seletivo capaz de suprimir o sinal da água (PRESAT) e resultando num espectro padrão com maior número de informações disponíveis (DYSON; PALMER, 2012; ZHANG; LIU; MAO, 2017).

Assim como em outros ramos das ciências e tecnologia, a metabonômica, utiliza-se de um número crescente de variáveis obtidas a partir do espectro de RMN em programas computacionais, que dividem o espectro em partes iguais chamadas de *bins* e delas se calcula a área. Essas medidas podem ser organizadas em uma tabela de dados (matriz de dados), onde cada linha constitui uma observação (amostras) e as colunas representam as variáveis. Essas matrizes de dados são extensas e complexas ao ponto de dificultar sua

exploração por métodos estatísticos tradicionais, para tanto é necessário o uso de ferramentas apropriadas como os métodos quimiométricos (WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001; WEBB, 2002).

## 2.4 QUIMIOMETRIA

A Quimiometria é definida, de maneira sucinta, como uma ferramenta que usa conhecimentos matemáticos e estatísticos para planejar e otimizar experimentos a fim de obter o máximo de informação de dados multivariados associados a problemas químicos (SILVA, 2017). A análise multivariada é uma das técnicas usadas pela quimiometria, sobretudo no reconhecimento de padrões, pode ser dividida em dois grupos: técnicas não supervisionadas, que se definem por não fazer uso da informação de classe das amostras e são usadas para estabelecer ou analisar agrupamentos naturais dos dados. Enquanto, as técnicas supervisionadas são aquelas que usam informações de classe e que através de pré-processamentos e validação são capazes de construir modelos matemáticos para aperfeiçoar a separação entre duas ou mais classes (WEBB, 2002) (BRERETON, 2013).

A Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) é uma técnica de análise multivariada não-supervisionada. Ela pode ser descrita como um método para modificar o conjunto de variáveis originais e correlacionadas, em um novo conjunto de variáveis não correlacionadas, designadas componentes principais (CP). Cada componente principal (CP) é uma combinação linear das variáveis originais e elucida parte da variância dos dados que não é explicada por nenhuma outra CP. O estudo desse novo conjunto de dados é chamado de análise exploratória e é indicada para visualização e detecção de agrupamentos, tendências e possíveis amostras anômalas (OLIVEIRA DA SILVA, 2010; DAIS; HATZAKIS, 2013).

A análise multivariada por discriminantes lineares (do inglês, *Linear Discriminant Analysis*), LDA, é uma técnica quimiométrica supervisionada, que se baseia na criação de funções lineares que promovam uma maximização na distância geométrica entre as classes e uma minimização, nas distâncias entre

as amostras de uma mesma classe, auxiliando na sua classificação. A análise LDA também está relacionada a identificação das variáveis que discriminam os grupos (BRERETON, 2013; DIONÍSIO DA SILVA, 2017).

Outro método supervisionado bastante utilizado em quimiometria é a regressão por mínimos quadrados parciais acoplada a análise de discriminantes, PLS-DA (do inglês *Partial Least Squares Discriminant Analysis*), que estabelece um novo conjunto (variáveis latentes) de combinações lineares a partir das variáveis originais. Seu uso é apropriado para otimizar a separação entre diferentes grupos de amostras, na qual é relacionada por duas matrizes, contendo dados espectrais e uma matriz contendo informações de classe referente a cada amostra utilizada no estudo. PLS-DA permite a identificação de sinais interferentes e a avaliação de dados altamente correlacionados como a contribuição de cada variável para a construção dos modelos, pesos, os valores VIP (do inglês, *variance importante on projection*) que podem ser usados para identificação das variáveis mais importantes (BARROS, 2017; BERRUETA; ALONSO-SALCES; HÉBERGER, 2007; DIONÍSIO DA SILVA, 2017).

A PLS-DA possui uma extensão chamada regressão por mínimos quadrados parciais em componentes ortogonais, OPLS-DA (do inglês, *Orthogonal Partial Least Squares*). Que usa a correção ortogonal do sinal uma técnica de pré-processamento usualmente aplicada a dados espectrais, como o RMN. O OPLS-DA possui uma capacidade preditiva semelhante em comparação com o PLS-DA, porém melhora a interpretação dos componentes preditivos e da variação sistemática (PINTO; TRYGG; GOTTFRIES, 2012; DANESHVAR et al., 2015).

A validação cruzada (LOOCV, do inglês *leave-one-out cross validation*) é uma das formas mais usadas para autenticar os modelos obtidos pelas técnicas quimiométricas. Nela, são criados modelos utilizando  $n-1$  amostras (onde  $n$  é o número total de amostras), usando as mesmas variáveis utilizadas no modelo original, e a amostra que foi excluída em cada caso é testada pelo respectivo modelo. Este procedimento é repetido para todos os  $n$  subconjuntos com  $n-1$  amostras. Em especial no formalismo PLS-DA, o LOOCV é capaz de expor parâmetros de qualidade estatística através da determinação dos valores de habilidade preditiva ( $Q^2$ ), do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a exatidão na

classificação das amostras pelo modelo (WESTERHUIS et al., 2008; BARROS, 2017).

### 3 MATERIAIS E MÉTODO

#### 3.1 COLETA DOS DADOS E ASPECTOS ÉTICOS

Foram selecionados 102 pacientes da unidade de saúde PS Vila Roca (Cabo de Santo Agostinho – PE), que procuraram a unidade por demanda espontânea, para avaliar a baixa massa óssea. Eles foram classificados em três grupos de acordo com o diagnóstico: portadores de osteoporose (OST), portadores de osteopenia (OPN) e saudáveis (CO).

Esses pacientes foram submetidos a anamnese que levou em consideração os seguintes critérios de inclusão de exclusão, além de aceitação em participar do estudo através de assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE):

Inclusão: Mulheres pós-menopausadas, sem tratamento farmacológico para baixa massa óssea, idade inferior a 80 anos no dia da coleta e sem doenças crônicas concomitantes que pudessem interferir no estudo (osteoporose secundária).

Exclusão: Homens e mulheres em período reprodutivo; uso de outros medicamentos que possam interferir na DMO.

Após a anamnese, as voluntárias foram submetidas a coleta de sangue, com autorização do comitê de ética (processo nº 1.114.754). A quantidade de participantes após esse processo foi reduzida a 78, tendo em vista as perdas de material durante o processo de coleta e realização das análises.

#### 3.2 ESPECTROS DE RMN

Os soros coletados foram submetidos a análise de RMN- $H^1$ , numa proporção de 400uL de soro para 200uL de  $D_2O$  em tubos de 5 mm de diâmetro. Os espectros de RMN- $H^1$  foram obtidos utilizando uma sequência de pulsos com pré-saturação do sinal da água (PRESAT), combinado com uma sequência de pulsos modificada de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) (BECKONERT et al., 2007), que minimizam os sinais de moléculas de gorduras, em um aparelho VARIAN Unity Plus 400 que opera a 400MHz, com os seguintes parâmetros: janela espectral de 6,4 KHz; tempo de espera (d1) igual a 2 s, tempo de aquisição igual

a 2,56 s, com 88 ciclos e 128 repetições. E o sinal em 1,33 ppm é atribuído ao lactato e foi utilizado como referência de deslocamento químico ( $\delta$ ).

### 3.3 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os parâmetros clínicos dos participantes (idade média, densidade óssea, índice de massa corporal, colesterol total e fosfatase alcalina) foram submetidos à análise estatística através de ANOVA e teste de Tukey. Foi adotado o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) para valor estatístico, usando o GraphPad Prism® versão 7.0 (GraphPad Software Inc., EUA). O teste “post hoc tukey” foi executado para validar as diferenças estatísticas.

### 3.4 PROCESSAMENTO DOS DADOS

Os espectros obtidos por RMN- $H^1$  foram processados um a um, através do *software* MestreNova 9.1 que dividiu a região espectral entre 8.0 ppm e 0.5 ppm em *bins* de 0.04 ppm cada, essa divisão gerou uma matriz com 78 linhas (amostras) e 184 colunas (variáveis), que foi submetida a análise quimiométrica.

O conjunto de dados obtidos foram pré-processados através da normalização pela soma, o que facilita a aplicação dos modelos de processamentos quimiométricos, antes de serem analisados através da plataforma MetaboAnalyst 3.0, disponível na web (<http://www.metaboanalyst.ca>). A análise metabonômica foi realizada com base nos modelos de Análise por Componentes Principais (PCA), Regressão por mínimos quadrados parciais acoplado a Análise por Discriminantes (PLS-DA) e a sua variante ortogonal (OPLS-DA). A Análise por discriminantes lineares (LDA) foi realizada utilizando o programa *Statistica* 10.0. Os modelos foram legitimados pela validação cruzada LOOCV (do inglês *Leaving-One-Out-Cross Validation*) e os resultados foram submetidos ao teste diagnóstico e de rastreamento descrito pela Biblioteca Virtual de Saúde (BSV, 2018).

## 4 RESULTADOS

### 4.2 ARTIGO SUBMETIDO - OSTEOPENIA-OSTEOPOROSIS DISCRIMINATION IN POSTMENOPAUSAL WOMEN BY 1H NMR- BASED METABONOMICS.



Revista PLOS ONE

Fator impacto: 3.057

Qualis em Ciências Biológicas 1 : B1

Carta vide Anexo VI

Resubmetido em 22/02/2019 com as devidas correções

## **Osteopenia-Osteoporosis Discrimination in Postmenopausal Women by 1H NMR-based Metabonomics**

T. A. Pontes<sup>1</sup>, A. D. Barbosa<sup>1</sup>, M. R. Melo-Junior<sup>1</sup> and R. O. Silva<sup>2</sup>

1. Biology Applied to Health Postgraduate Program. LIKA – Laboratory of Immunopatology Keizo Asami. Universidade Federal de Pernambuco. Av Prof Luis Freire, s/n. Cidade Universitaria, Recife-PE, Brazil 50670-901.

2. Fundamental Chemistry Department, CCEN. Chemistry Postgraduate Program. Universidade Federal de Pernambuco. Av. Jornalista Aníbal Fernandes, s/n. Cidade Universitaria, Recife-PE, Brazil 50740-560

### **Abstract**

This is a report on how <sup>1</sup>H NMR-based metabonomics was employed to discriminate osteopenia from osteoporosis in postmenopausal women, identifying the main metabolites associated to the separation between the groups. The Assays were performed using seventy-eight samples, being twenty- eight healthy volunteers, twenty-six osteopenia patients and twenty-four osteoporosis patients. PCA, LDA, PLS-DA and OPLS-DA formalisms were used. PCA discriminated the samples from healthy volunteers from diseased patient samples. Osteopenia-osteoporosis discrimination was only obtained using Analysis Discriminants formalisms, as LDA, PLS-DA and OPLS-DA. The metabonomics model using LDA formalism presented 88.0% accuracy, 88.5% specificity and 88.0% sensitivity. Cross-Validation, however, presented some problems as the accuracy of modeling decreased. LOOCV resulted in 78.0% accuracy. The OPLS-DA based model was better: R<sup>2</sup><sub>Y</sub> and Q<sup>2</sup> values equal to 0.871 (p<0.001) and 0.415 (p<0.001). LDA and OPLS-DA indicated the important spectral regions for discrimination, making possible to assign the metabolites involved in the skeletal system homeostasis, as follows: VLDL, LDL, leucine, isoleucine, allantoin, taurine and unsaturated lipids. These results indicate that

<sup>1</sup>H NMR-based metabolomics can be used as a diagnosis tool to discriminate osteoporosis from osteopenia using a single serum sample.

Keywords: metabolomics; skeletal homeostasis; biomarkers; bone density

## 1. Introduction

Osteoporosis is a multifactorial systemic skeletal disease that causes damage to the microarchitecture of bone tissue, increasing the risk of fractures [1]. Women in the postmenopausal period are the most affected by this problem because of the hormonal deficiency that occurs during this period. Reduction of estrogen levels promotes the homeostatic imbalance of the bone remodeling process, causing an increase in bone resorption, deterioration of the microarchitecture, and a decrease in bone mass. About 40% of women older than 50 years of age are diagnosed with postmenopausal osteoporosis, making it necessary to pay special attention to this patient group [2]. Estrogen replacement therapy (ERT) has been considered the most effective for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. However, investigations showed that estrogen could lead to higher occurrences of endometrial cancer, stroke, cardiovascular diseases and breast carcinoma [3]

According to WHO criteria, the osteoporosis diagnosis is performed from bone mineral density (BMD) determination, using a T-score. Patients with bone mineral density values (in T-score) higher than  $-1.0$  are classified as healthy, while patients with T-score minor than  $-2.5$  are diagnosed with osteoporosis. Patients who have T-scores between  $-2.5$  and  $-1.0$  are not classified as having osteoporosis, but also present risk of fractures higher than the medium of the population. These patients are diagnosed with osteopenia [4].

The pharmacological approach is generally recommended for patients with osteoporosis and osteopenia, as indicated by the fracture risk assessment (FRAX), which takes into account other factors (BMI, used medications, previous fracture, etc.) in addition to BMD. However, the decision of pharmacological treatment carries with it the risk of adverse effects and side effects. Thus, early

diagnosis of bone loss allows an intervention only with changes in patient lifestyle [5,6].

Some serum biomarkers of bone formation (or resorption) are used to this diagnosis. As the reabsorption process is faster than bone formation, levels of bone resorption biomarkers change more rapidly than levels of bone formation markers [7–9]. In addition, others metabolites are studied with correlation in bone metabolism. Tanko et al.[10], Orozco et al.[11] and Poiana et al.[12] have reported that postmenopausal women who presented abnormal lipid profile had lower lumbar and femoral BMD and, therefore, higher risk of fractures. They suggest an association between hyperlipidemia and osteopenia. Moreover, amine-terminal collagen type I (NTX-I) telopeptides, which are markers of bone resorption, present positive correlation with Total Cholesterol and LDL serum levels [13]. Lv et al.[14] identified changes in arachidonic acid, leucine, isoleucine, lactate, taurine and cholesterol serum levels and showed that these changes correlated with loss of bone mass.

Metabonomics applies multivariate statistical formalisms to spectral data aiming to correlate them to biochemical status. In metabonomics strategy, the working hypothesis is that when life system is exposed to an external agent, by homeostasis, there are changes in the concentration of endogenous metabolites which can be associated to patients' biochemical status. Therefore, it is possible develop metabonomics models aiming to diagnose or assess a clinical therapy [15,16]. There are various reports that make use of metabonomics for clinical diagnosis. Duarte and Gil [17] showed the use of metabonomics in the study of human biofluids to identify various types of cancer, using  $^1\text{H}$  NMR spectra. Qiao et al.[18] studied schizophrenia in patients treated with olanzapine through the metabolic analysis of blood plasma. Gouveia et al.[19] developed metabonomics models to investigate periportal liver fibrosis caused by mansonic schistosomiasis among patients diagnosed with viral hepatitis. Batista et al. [20] discriminated intermediate from advanced liver fibrosis in patients using  $^1\text{H}$  NMR- based metabonomics. Godoy et al.[21] used LDA metabonomics model to made hepatitis C virus diagnosis from urine  $^1\text{H}$  NMR spectra.

Statistical formalisms employed in metabonomics assays are divided in two categories: unsupervised, which doesn't use class information, and supervised

methods. Principal Components Analysis (PCA) is the unsupervised method more used to investigate natural grouping and outliers. The samples and original variables are projected in new coordinate system defined by Principal Components (PC), producing case and loading plots, respectively. Each PC explains part of variance contained in dataset. Among unsupervised methods, Discriminants Analysis formalisms are the more employed, with highlight to PLS-DA (Partial Least Discriminants Analysis), OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Discriminants Analysis) and LDA (Linear Discriminants Analysis). The discriminants analysis formalisms are linear combinations of original variables that relate to class matrix (matrix Y). In PLS-DA are build Latent Variables, similar to PCA, but considering the variance contained into matrix Y; in OPLS-DA, the systematic variance contained in matrix X (dataset) is divided in two groups, where first component explains the higher variance contained into matrix Y associated to difference between the classes, while the second group, called orthogonal component, explains intraclass variance; LDA is a linear combination of the some original variables. Therefore, LDA needs to use a variable selection tool to build the discriminant function which will divide to space in two regions, where the samples of each class are projected [15,16,22].

Our study was to use metabonomics strategy to discriminate osteopenia from osteoporosis in postmenopausal women, using  $^1\text{H}$  NMR spectra of serum.

## **2. Materials and Method**

### **Patients and Ethical Procedure**

The study was developed using samples of postmenopausal women arising from Cabo de Santo Agostinho city (Pernambuco/Brazil). These patients were recruited by spontaneous demand when they were to Rheumatology Ambulatory, where were submitted to anamnesis and the bone mineral density (T-scores) was determined using the Hologic Bone Densitometer Discovery Ci. The body mass index (BMI) of each patient and serum level of total cholesterol and alkaline phosphatase were determined. In the study were excluded patients with others

associated chronic disease as well as those who were making use of drugs that affect BMD. After anamnesis, were recruited 78 volunteers who were distributed in three groups: (1) Healthy, containing twenty-eight women; (2) Osteopenia, being twenty-six patients; and (3) Osteoporosis, containing twenty-four patients. This study received approval from the Ethics Committee of the Universidade Federal de Pernambuco Health Sciences Center (Approval number 1.114.754/July 2015) and all volunteers signed the Free and Informed Consent Term.

### Statistical analysis

The clinical parameters of participants (mean age, bone density, body mass index, total cholesterol and alkaline phosphatase) were submitted to statistical analysis through ANOVA and Tukey test with significance level of 5% ( $p > 0.05$ ), using the GraphPad Prism® version 7.0 (GraphPad Software Inc., USA).

### Metabonomics assay

<sup>1</sup>H NMR spectra were performed using a VNMR400 spectrometer operating at 400 MHz. Samples were prepared using 400 µL of serum and 200 µL of D<sub>2</sub>O. Acquisition used the following parameters: T<sub>2</sub>-filter associated to presaturation of water signal (Presat-CPMG) pulse sequence, as follows: spectral window equal to 6.4 kHz, acquisition time equal to 2.56 s, 128 transients, spin echo delay equal to 400 µs, 88 cycles, giving a total echo time equal to 70.4 ms and saturation delay equal to 2.0 s. [23] The signal attributed to methyl group of lactate ( $\delta$  1.33 ppm) was used as chemical shift reference. Spectra were binned in the region between  $\delta$  8.00 and 0.00 ppm, 0.04 ppm/bin, excluding the region between  $\delta$  5.12 and 4.48 ppm. Spectral data were collected in a matrix with 78 cases (lines) and 184 variables (column). Dat aset were preprocessed using normalization by sum (in line) and employed PCA, PLS-DA and OPLS-DA formalisms, using MetaboAnalyst online platform. Metabonomics models were validated using Leaving-One-Out Cross Validation (LOOCV) and permutation test, using 2000

permutations. LDA Model was performed using Statistical® 10.0 software. The selection of variables to build LDA model was performed using Wilk's Lambda.

### 3. Results

Table 1 shows clinical data of participants of each group, while Figure 1 presents a typical  $^1\text{H}$  NMR spectrum of serum obtained in this study and main assignments, identifying associated metabolites.

Table 1. Clinical data of studied volunteers

|                                             | Studied Groups         |                         |                           | Tukey test p-value |
|---------------------------------------------|------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------|
|                                             | Healthy volunteers (1) | Osteopenia patients (2) | Osteoporosis patients (3) |                    |
| Bone Density ( <i>T</i> -scores)*           | -0.11 ( $\pm 0.7$ )    | -1.64 ( $\pm 0.4$ )     | -3.11 ( $\pm 0.5$ )       | <b>&lt;0.01</b>    |
| BMI ( $\text{kg.m}^{-2}$ )                  | 25.35 ( $\pm 3.4$ )    | 27.20 ( $\pm 5.2$ )     | 25.58 ( $\pm 4.8$ )       | 0.07               |
| Cholesterol Total ( $\text{mg.L}^{-1}$ )    | 216.28 ( $\pm 28.2$ )  | 226.4 ( $\pm 37.3$ )    | 217.7 ( $\pm 40.8$ )      | 0.15               |
| Alkaline Phosphatase ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) | 78.0 ( $\pm 36.9$ )    | 75.4 ( $\pm 40.7$ )     | 102.5 ( $\pm 58.1$ )      | 0.14               |
| Age (years old)                             | 60.38 ( $\pm 6.2$ )    | 61.88 ( $\pm 7.9$ )     | 60.80 ( $\pm 6.0$ )       | 0.17               |
| n                                           | 28                     | 26                      | 24                        | -                  |

\* *T*-scores were measured in three regions – lumbar spine (L1-L4), femoral neck and femur total. It was considered the site with minor value. BMD collected until 90 days before  $^1\text{H}$  NMR analysis.

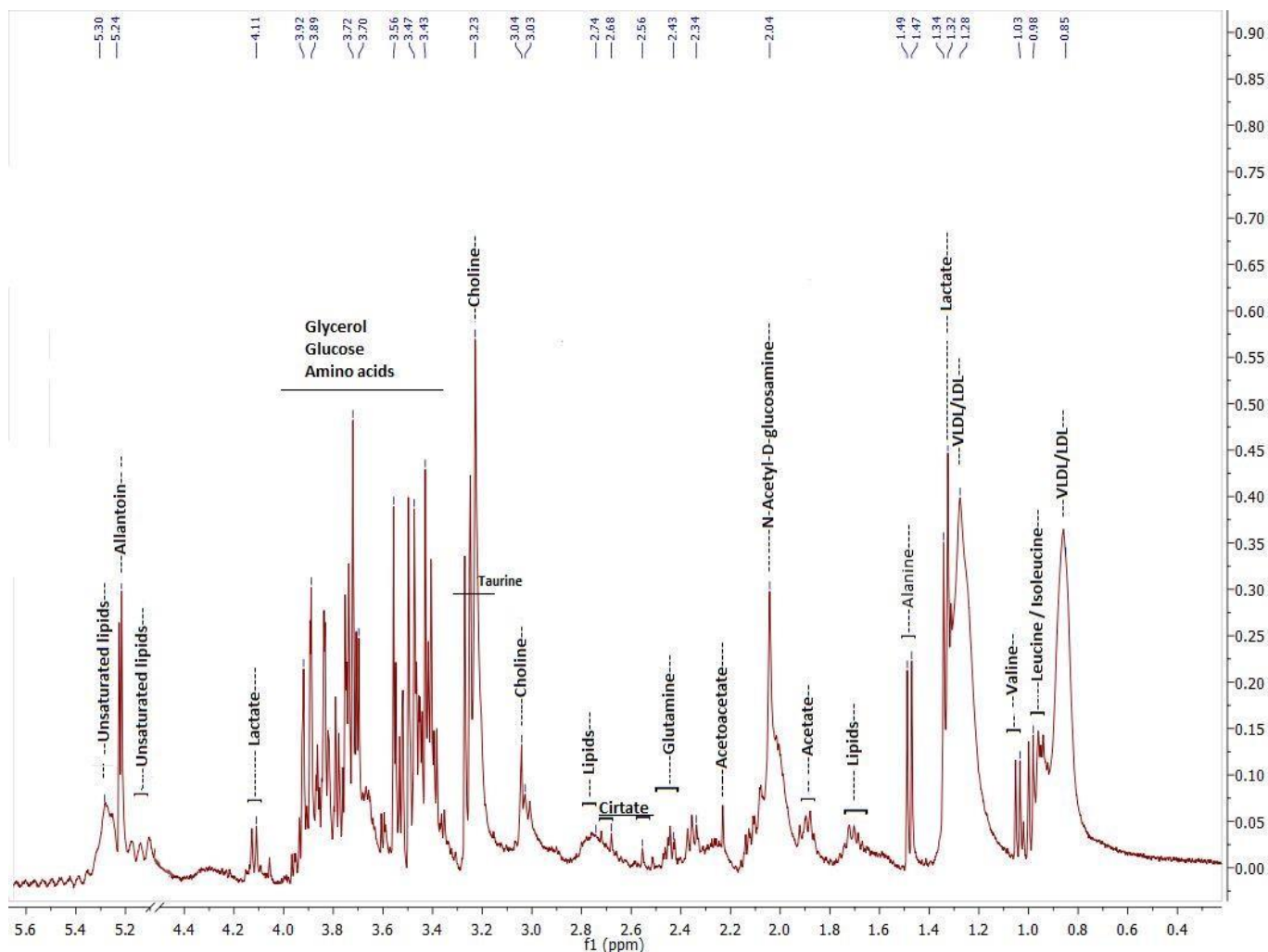


Figure 1. Typical  $^1\text{H}$  NMR spectrum of serum (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , Presat-CPMG pulse sequence) used in the study.

The study used serum samples from 78 volunteers. Exploratory analysis was performed using PCA formalism and results are presented in Figure 2. PC1 and PC2 explain 71% of variance contained in the dataset. Separation between healthy volunteers and patients (osteopenia or osteoporosis) samples can be observed. There is no natural discrimination, however, between the osteopenia and osteoporosis groups. The PCA loading plot indicates that regions  $\delta$  0.88 – 1.32 ppm and  $\delta$  3.12 – 3.28 ppm are important to discriminate diseased from healthy volunteers. The control group presented higher intensity to signal at  $\delta$  3.12 – 3.28 ppm, while diseased volunteers presented a more intense signal at  $\delta$  0.88 – 1.32 ppm.

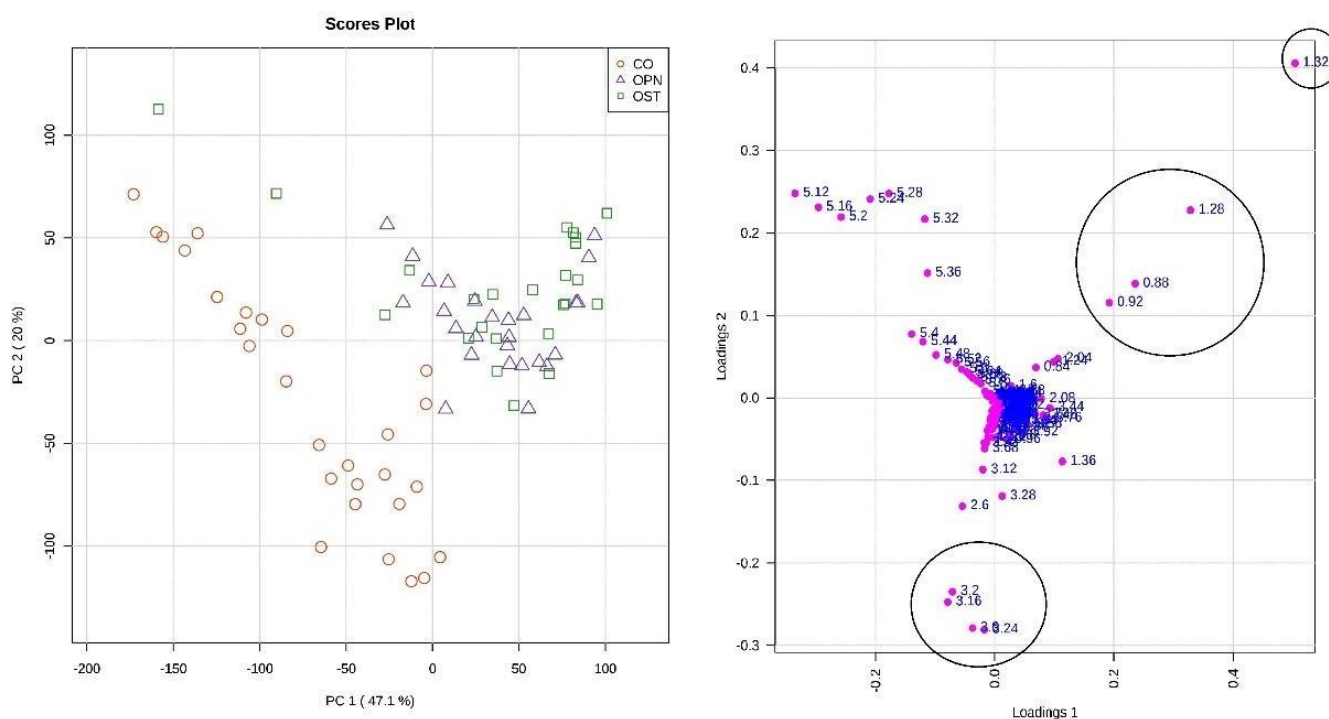


Figure 2. PCA results using all dataset. On the left, score plot (PC1xPC2, 71% of variance) - control (red circles), osteoporosis (green squares) and osteopenia (blue triangles); The right, loading plot indicates the most important variables for discrimination.

When PCA formalism was applied to the osteopenia/osteoporosis data, neither separation was observed. Then, supervised methods were employed, such as LDA (Linear Discriminant Analysis) and OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Square – Discriminant Analysis), aiming to discriminate between the osteopenia and osteoporosis samples. A LDA model was built using six variables, as follows:  $\delta$  0.92, 1.28, 3.24, 3.68, 5.44 and 5.96 ppm. Table 2 shows the classification matrix using the LDA model.

Table 2. Samples classification based on scores obtained from LDA Model using fifty  $^1\text{H}$  NMR spectra – 26 osteopenia and 24 osteoporosis.

## Clinical Diagnosis

| LDA<br>Model |              | Osteopenia |              | Osteoporosis |              |
|--------------|--------------|------------|--------------|--------------|--------------|
|              |              | Osteopenia | Osteoporosis | Osteopenia   | Osteoporosis |
|              | Osteopenia   | 23 (21)*   | 3 (5)*       |              |              |
|              | Osteoporosis | 3 (6)*     | 21 (18)*     |              |              |

$F_{(6,43)}=8.60$   $p<0.001$  \*Classification after LOOCV.

The LDA model presented sensitivity, specificity and accuracy values equal to 88.0%, 88.5% and 88.0%, respectively. The F-test with 6 (variables used) and 43 (50-6-1) degrees of freedom was equal to 8.60 ( $p<0.001$ ). After LOOCV, LDA model presented 78.0% accuracy, 75% specificity and 80.8% sensitivity. Figure 3 presents results obtained applying OPLS-DA formalism to the osteopenia-osteoporosis dataset (fifty samples). OPLS-DA model presented  $R^2_Y$  and  $Q^2$  values equal to 0.871 ( $p<0.001$ ) and 0.415 ( $p<0.001$ ), respectively, after validation by permutation test.

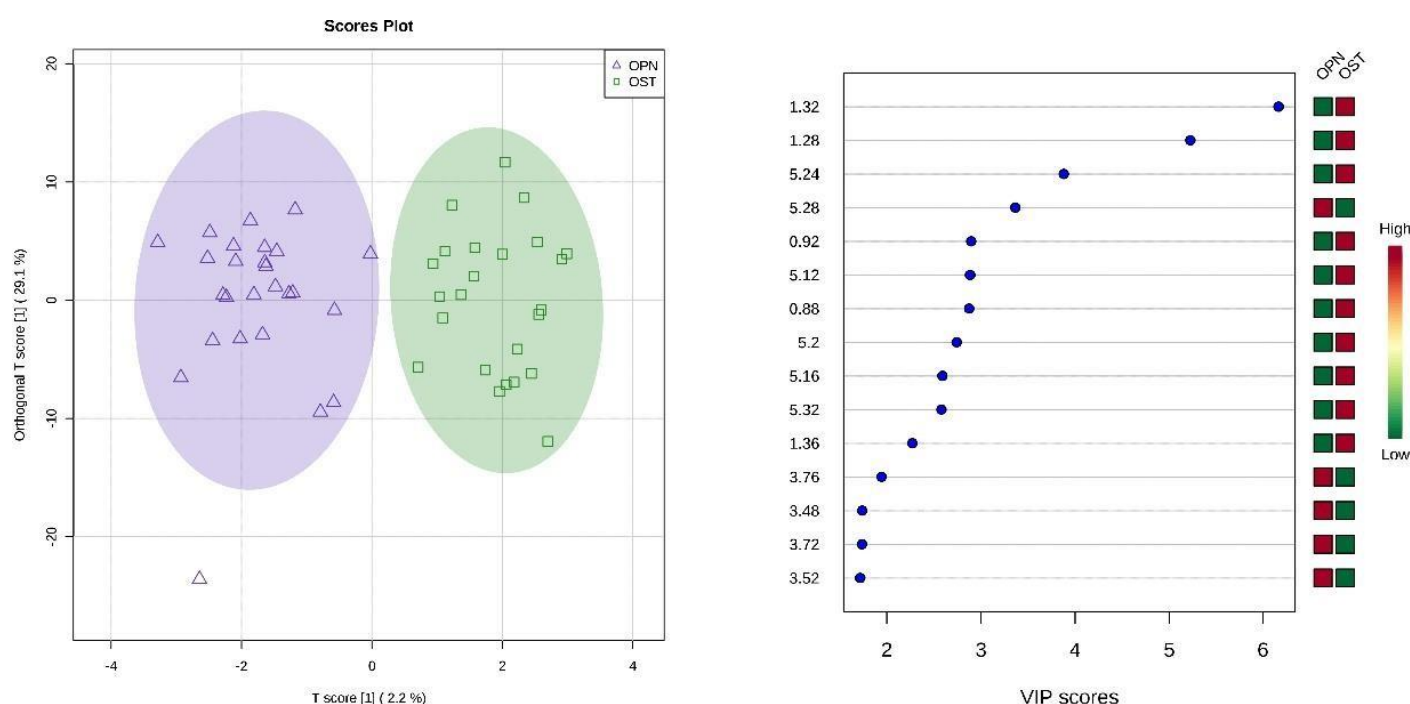


Figure 3. OPLS-DA results using only osteoporosis (green squares) and osteopenia (blue triangles) samples from postmenopausal women. Score plot (at left) and VIP score plot (at right).

The VIP scores plot (Figure 3, right) indicates some spectral regions which are responsible for discrimination, as follows:  $\delta$  3.48 - 3.76 ppm and  $\delta$  5.28 ppm, where the signal intensities are higher in the osteopenia group than in the osteoporosis group;  $\delta$  0.88 - 0.92 ppm; 1.28 - 1.36 ppm; and 5.12 - 5.32 ppm, where the signals are more intense in osteoporosis group.

#### 4. Discussion

International Osteoporosis Foundation [24] data indicate that osteoporosis was diagnosed in more de 200 million women and is associated with 9 million fractures annually in the world. Generally, osteoporosis is associated to women and to aging, but can be diagnosed in the young and also in men. About 33% of women over 45 years old have a positive diagnosis for osteoporosis. When women over 80 are observed, the disease reaches about 73% of this population. This indicates that is important to develop diagnostic tools that are able to discriminate osteoporosis from osteopenia patients in this group (postmenopausal women). The present study investigated only postmenopausal women, aiming to discriminate osteopenia from osteoporosis, using  $^1\text{H}$  NMR- based metabonomics. There were three groups – Healthy (28 volunteers), osteopenia (26 patients) and osteoporosis (24 patients).

Table 1 indicates that there is only significant difference in bone mineral density. This is natural, since bone mineral density is the common criteria to diagnose a patient. The groups were similar in all the other parameters studied. The PCA loading plot (Figure 2) suggests that the lipid profile of patients was slightly different from healthy volunteers, since that variables  $\delta$  0.88 – 1.32 ppm are important to discriminate diseased from healthy samples. The Control group presented greater signal intensity at  $\delta$  3.12 – 3.28 ppm, while osteopenia/osteoporosis patients presented increased integration values at  $\delta$  0.88 – 1.32 ppm. Signals at  $\delta$  3.12 – 3.28 ppm were attributed to choline and taurine, while signals at  $\delta$  0.88 – 1.32 ppm were attributed to methylene and methyl groups of VLDL and LDL. These results are in according with reports that associated decrease in bone mineral density to increased LDL serum level [14,25]. PCA loading plot shows that the control group samples signals were

more intense at  $\delta$  3.16-3.24 ppm, indicating that healthy volunteers had choline and taurine serum levels higher than the osteopenia/osteoporosis patients. This was also reported by Long et al.[26] and Lv et al.[20], who observed a decrease in choline concentration in patients diagnosed with osteoporosis. Taurine is one of the most abundant non-essential amino acids found in bones. This result corroborates with studies correlating taurine as an osteoclast formation inhibitor and osteoblast inductor [2,27,28]. Besides that, choline and tyrosine amino acids were identified as important for the discrimination between healthy volunteers and osteopenia-osteoporosis patients, with higher concentrations observed in the control group. This observation agrees with reports in the literature[14,26],[29,30] which indicate that choline and tyrosine concentrations decreased in patient with osteoporosis. Tyrosine is one of the amino acids present in thyroid hormones (T3 e T4) with an intimate relationship with the osseous metabolism and stimulates the expression of genes in the osteoblasts for the production of collagen [29,30].

Exploratory analysis, however, did not discriminate osteoporosis from osteopenia. Supervised formalisms were employed aiming at this discrimination. A LDA Model was built using six variables which were associated with leucine, isoleucine, lactate, taurine and unsaturated compounds. This metabonomics model is significant statistically, since the F-test with 6 and 43 degrees of freedom was equal to 8.60 ( $p < 0.001$ ). However, there was a grey area in the model, where the classification was doubtful. This was evidenced when LOOCV (Leave-One-Out Cross Validation) was carried out, resulting in a 78.0% accuracy. Alternatively, OPLS-DA was used and the metabonomics model built was able to discriminate between the groups, indicating that there was a significant difference between them. The validation using 2000 permutation resulted in R<sup>2</sup><sub>Y</sub> and Q<sup>2</sup> values equal to 0.871 ( $p < 0.001$ ) and 0.415 ( $p < 0.001$ ), respectively. Figure 3 shows four spectral regions important for discrimination:  $\delta$  0.88 - 0.92 ppm;  $\delta$  1.28 - 1.36 ppm;  $\delta$  3.48 - 3.76 ppm; and  $\delta$  5.12 - 5.32 ppm.

According to the OPLS-DA VIP score (Figure 3), there was an increase in the allantoin serum level in the osteopenia group while the osteoporosis groups presented higher serum levels of cholesterol, lactate and unsaturated lipids. These findings already have been reported by Chen et al.[31], who observed an increase in allantoin serum level after osteoporosis prophylaxis. Maritz et al. [25]

and Lv et al.[20] reported an association between cholesterol serum level and osteoporosis diagnosis. Xue et al.[3] and Dixon and Sims[32] associated lactate serum level with osteoblasts inhibition and osteoclasts formation. While Xue et al.[3], Lv et al.[20] and Parhami et al.[33] all reported that the products of lipids oxidation are associated to osteoblast differentiation inhibition. Table 3 summarizes the metabolites that are associated to observed discriminations in this study, as well as indicates data from the literature that show the relation among these metabolites and the diagnosis of osteoporosis.

Table 3. Identification of metabolites in the metabonomics model responsible for discrimination among groups.

| Compound               | nuclei and ( $\delta$ /ppm)                              | ↑ group | References                    |
|------------------------|----------------------------------------------------------|---------|-------------------------------|
| Cholesterol (VLDL/LDL) | CH <sub>3</sub> (0.88 ppm)<br>CH <sub>2</sub> (1.28 ppm) | OST     | (LV et al., 2016), [25]       |
| Leucine and isoleucine | $\gamma$ -CH <sub>3</sub> (0.92 ppm)                     | OST     | (MA et al., 2013)             |
| Lactate                | CH <sub>3</sub> (1.32 ppm)                               | OST     | [3], [32]                     |
| Tyrosine               | $\beta$ -CH <sub>2</sub> (3.16 ppm)                      | Control | [30], [29]                    |
| Choline                | CH <sub>3</sub> N (3.20 ppm)                             | Control | [26] (LV et al., 2016)        |
| Taurine                | CH <sub>2</sub> N (3.24 ppm)                             | Control | [2,27,28]                     |
| Allantoin              | CH (5.28 ppm)                                            | OPN     | [31].                         |
| Unsaturated lipids     | =CH (5.15 - 5.28 ppm)                                    | OST     | [33], [3], (LV et al., 2016). |

OPN - Osteopenia; OST - Osteoporosis; ↑ higher concentration

Therefore, all formalisms employed indicated that it is possible to discriminate osteopenia from osteoporosis using serum <sup>1</sup>H NMR spectra of patients. The best metabonomics model was built using OPLS-DA formalism which also revealed the metabolites associated to discrimination. These findings are important for clinical practice, since that is nothing change in the routine of patients is employed; the assay is minimally invasive; it is not necessary the presence of patient neither doctor during the analysis, contributing for decrease the length of stay of patients in the hospital environment and decreasing the probability of

infections, for example. However, the main gain associated to introduction of  $^1\text{H}$  NMR-based metabonomics in the clinical practice will be to obtain patients' systemic information in the first exams requested by doctors. Besides of metabonomics models to differential diagnosis of osteopenia-osteoporosis, others various metabonomics models can be built for disease different helping in the early diagnosis.

## 5. Conclusion

In this paper, three multivariate statistical tools were employed in serum  $^1\text{H}$  NMR spectra data aiming at an osteopenia-osteoporosis differential diagnosis. Principal Component Analysis discriminated healthy volunteers from osteopenia-osteoporosis patients, but didn't discriminate osteopenia from osteoporosis. This differentiation was obtained only when supervised methods were used – Linear Discriminant Analysis and Orthogonal Partial Least Square-Discriminant Analysis. The best result was obtained using OPLS-DA which presented  $R^2Y$  and  $Q^2$  values equal to 0.871 ( $p < 0.001$ ) and 0.415 ( $p < 0.001$ ), respectively. Moreover, the metabonomics strategy used identified the metabolites associated with the discrimination observed. This permits us to understand the disease evolution mechanism and make a rapid and early differential diagnosis of osteopenia and osteoporosis in postmenopausal women.

## Acknowledgments

Authors thank Analytical Central Laboratory of Universidade Federal de Pernambuco by  $^1\text{H}$  NMR spectra acquisition.

## REFERENCE

1. Rosen CJ. The Epidemiology and Pathogenesis of Osteoporosis. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. Endotext. South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc.; 2000. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279134/>

2. Xue L, Wang Y, Liu L, Zhao L, Han T, Zhang Q, et al. A <sup>1</sup>HNMR-Based Metabonomics Study of Postmenopausal Osteoporosis and Intervention Effects of Er-Xian Decoction in Ovariectomized Rats. *Int J Mol Sci.* 2011;12: 7635–7651. doi:10.3390/ijms12117635
3. Prentice R. Postmenopausal Hormone Therapy and the Risks of Coronary Heart Disease, Breast Cancer, and Stroke. *Semin Reprod Med.* 2014;32: 419–425. doi:10.1055/s-0034-1384624
4. Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltsev N. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2009;9: 1137–1141. doi:10.1002/jbmr.5650090802
5. Kanis JA, Oden A, Johansson H, Borgström F, Ström O, McCloskey E. FRAX and its applications to clinical practice. *Bone.* 2009;44: 734–743. doi:10.1016/j.bone.2009.01.373
6. Tella SH, Gallagher JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014;142: 155–170. doi:10.1016/j.jsbmb.2013.09.008
7. Vasikaran S, Eastell R, Bruyère O, Foldes AJ, Garnero P, Griesmacher A, et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporos Int.* 2011;22: 391–420. doi:10.1007/s00198-010-1501-1
8. Vasikaran SD, Chubb SP, Ebeling PR, Jenkins N, Jones GR, Kotowicz MA, et al. Harmonised Australian Reference Intervals for Serum PINP and CTX in Adults. *Clin Biochem Rev.* 2014;35: 237–242.
9. Chubb SAP, Byrnes E, Manning L, Beilby JP, Ebeling PR, Vasikaran SD, et al. Reference intervals for bone turnover markers and their association with incident hip fractures in older men: the Health in Men study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100: 90–99. doi:10.1210/jc.2014-2646
10. Tankó LB, Bagheri YZ, Nielsen SB, Christiansen C. Does serum cholesterol contribute to vertebral bone loss in postmenopausal women? *Bone.* 2003;32: 8–14.

11. Orozco P. Atherogenic lipid profile and elevated lipoprotein (a) are associated with lower bone mineral density in early postmenopausal overweight women. *Eur J Epidemiol.* 2004;19: 1105–1112.
12. Poiana C, Radoi V, Carsote M, Bilezikian JP. New Clues that May Link Osteoporosis to the Circulating Lipid Profile. *Bone Res.* 2013;1: 260–266. doi:10.4248/BR201303004
13. You L, Sheng Z, Tang C, Chen L, Pan L, Chen J. High cholesterol diet increases osteoporosis risk via inhibiting bone formation in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2011;32: 1498–1504. doi:10.1038/aps.2011.135
14. Lv H, Jiang F, Guan D, Lu C, Guo B, Chan C, et al. Metabolomics and Its Application in the Development of Discovering Biomarkers for Osteoporosis Research. *Int J Mol Sci.* 2016;17. doi:10.3390/ijms17122018
15. Gao H, Lu Q, Liu X, Cong H, Zhao L, Wang H, et al. Application of <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics in the study of metabolic profiling of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Cancer Sci.* 2009;100: 782–785.
16. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. So what's the deal with metabolomics? *Anal Chem.* 2003;75: 384A-391A.
17. Duarte IF, Gil AM. Metabolic signatures of cancer unveiled by NMR spectroscopy of human biofluids. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.* 2012;62: 51–74. doi:10.1016/j.pnmrs.2011.11.002
18. Qiao Y, Zhang L, He S, Wen H, Yu Y-M, Cao C-H, et al. Plasma metabolomics study of first-Episode schizophrenia treated with olanzapine in female patients. *Neurosci Lett.* 2016;617: 270–276. doi:10.1016/j.neulet.2016.02.031
19. Gouveia LR, Santos JC, Silva RD, Batista AD, Domingues ALC, Lopes EP de A, et al. Diagnosis of coinfection by schistosomiasis and viral hepatitis B or C using <sup>1</sup>H NMR-based metabolomics. Hsieh MH, editor. *PLOS ONE.* 2017;12: e0182196. doi:10.1371/journal.pone.0182196
20. Batista AD, Barros CJP, Costa TBBC, de Godoy MMG, Silva RD, Santos JC, et al. Proton nuclear magnetic resonance-based metabolomic models for

non-invasive diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C: Optimizing the classification of intermediate fibrosis. *World J Hepatol.* 2018;10: 105–115. doi:10.4254/wjh.v10.i1.105

21. Godoy MMG, Lopes EPA, Silva RO, Hallwass F, Koury LCA, Moura IM, et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics: Hepatitis C diagnosis using metabonomics. *J Viral Hepat.* 2010;17: 854–858. doi:10.1111/j.1365-2893.2009.01252.x

22. Schicho R, Shaykhutdinov R, Ngo J, Nazyrova A, Schneider C, Panaccione R, et al. Quantitative Metabolomic Profiling of Serum, Plasma, and Urine by  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopy Discriminates between Patients with Inflammatory Bowel Disease and Healthy Individuals. *J Proteome Res.* 2012;11: 3344–3357. doi:10.1021/pr300139q

23. Beckonert O, Keun HC, Ebbels TMD, Bundy J, Holmes E, Lindon JC, et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat Protoc.* 2007;2: 2692–2703. doi:10.1038/nprot.2007.376

24. IOF. Osteoporosis & Musculoskeletal Disorders [Internet]. 2018. Available: <https://www.iofbonehealth.org/osteoporosis>

25. Maritz FJ, Conradie MM, Hulley PA, Gopal R, Hough S. Effect of statins on bone mineral density and bone histomorphometry in rodents. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21: 1636–1641.

26. Long W-F, Li L, Chen H-Q, Tang Y, He X-L, Jing R-Z. [ $^1\text{H}$ -NMR-based metabonomics analysis of plasma from osteoporotic rats induced by ovariectomy]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2009;40: 843–847.

27. Hanaa HA, Amal HH. Potential Role of Arginine, Glutamine and Taurine in Ameliorating Osteoporotic Biomarkers in Ovariectomized Rats. *Rep Opin.* 2009;1. doi:10.7537/marsroj010609.05

28. Liu Y-R, Huang R-Q, Xiao B-K, Yang J-Y, Dong J-X.  $^1\text{H}$  NMR metabolic profiling analysis offers evaluation of Nilestriol treatment in ovariectomised rats. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;387: 19–34. doi:10.1016/j.mce.2014.02.007

29. Varga F, Rumpler M, Luegmayr E, Fratzl-Zelman N, Glantschnig H, Klaushofer K. Triiodothyronine, a regulator of osteoblastic differentiation: depression of histone H4, attenuation of c-fos/c-jun, and induction of osteocalcin expression. *Calcif Tissue Int.* 1997;61: 404–411.
30. da Silva RA, de Camargo Andrade AF, da Silva Feltran G, Fernandes CJ da C, de Assis RIF, Ferreira MR, et al. The role of triiodothyronine hormone and mechanically-stressed endothelial cell paracrine signalling synergism in gene reprogramming during hBMSC-stimulated osteogenic phenotype in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 2018;478: 151–167. doi:10.1016/j.mce.2018.08.008
31. Chen S-Y, Yu H-T, Kao J-P, Yang C-C, Chiang S-S, Mishchuk DO, et al. An NMR metabolomic study on the effect of alendronate in ovariectomized mice. *PloS One.* 2014;9: e106559. doi:10.1371/journal.pone.0106559
32. Dixon SJ, Sims SM. P2 purinergic receptors on osteoblasts and osteoclasts: Potential targets for drug development. *Drug Dev Res.* 2000;49: 187–200. doi:10.1002/(SICI)1098-2299(200003)49:3<187::AID-DDR9>3.0.CO;2-F
33. Parhami F, Garfinkel A, Demer LL. Role of Lipids in Osteoporosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20: 2346–2348. doi:10.1161/01.ATV.20.11.2346
34. Ma B, Liu J, Zhang Q, Ying H, A J, Sun J, et al. Metabolomic Profiles Delineate Signature Metabolic Shifts during Estrogen Deficiency-Induced Bone Loss in Rat by GC-TOF/MS. Chowen JA, editor. *PLoS ONE.* 2013;8: e54965. doi:10.1371/journal.pone.0054965

## 4.2 SHORT COMMUNICATION - AVALIAÇÃO METABONÔMICA DE PACIENTES OSTEOPÊNICOS FRENTE AO TESTE DO FRAX®

T. A. Pontes<sup>1</sup>,  
A. D. Barbosa<sup>1</sup>,  
M. R. Melo-Junior<sup>1</sup>,  
R. O. Silva<sup>2</sup>

1. Biology Applied to Health Postgraduate Program. LIKA – Laboratory of Immunopathology Keizo Asami. Universidade Federal de Pernambuco. Av Prof Luis Freire, s/n. Cidade Universitaria, Recife-PE, Brazil 50670-901.

2. Fundamental Chemistry Department, CCEN. Chemistry Postgraduate Program. Universidade Federal de Pernambuco. Av. Jornalista Aníbal Fernandes, s/n. Cidade Universitaria, Recife-PE, Brazil 50740-560

### RESUMO

No presente estudo, foi construído um modelo metabonômico baseado nos espectros de RMN- $^1\text{H}$  de soro de pacientes com osteopenia. Os pacientes foram divididos em dois grupos, baseado nos resultados do risco de fraturas osteoporóticas e de quadril em 10 anos (FRAX®), em dois grupos: OPN e OPNFrax. Os espectros de RMN obtidos foram submetidos a análises estatística supervisionadas e não supervisionadas: Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais Esparsos (sPLS\_DA) e Análise dos Componentes Principais (PCA), respectivamente. Os dados clínicos submetidos a análise pelo FRAX indicaram apenas 6 pacientes com risco de fraturas aumentado. Foi obtida uma separação parcial dos dois grupos na técnica supervisionada e uma melhor variância explicada pela técnica não supervisionada, obtendo-se 88%. Esses resultados, embora preliminares, abrem uma janela de perspectivas quanto ao uso da metabonômica para auxiliar no diagnóstico da osteopenia.

Palavras chave: FRAX. Osteopenia. metabonômica

## INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2019) define osteopenia ou baixa massa óssea como uma condição em que a densidade mineral óssea apresenta um T-score entre -1 e -2,5 desvios padrão abaixo do pico de massa óssea encontrada no adulto jovem. Essa condição patológica é responsável por um risco de fraturas relevante e se encontra num estágio intermediário entre o paciente saudável e aquele com diagnóstico de osteoporose estabelecido (MAGALHÃES JÚNIOR, 2014).

O diagnóstico da osteopenia é baseado na medida de baixa densidade mineral óssea (DMO) pela técnica de absorciometria por raios-X com dupla energia (DXA). A DMO é expressa em termos de grama de mineral por centímetro quadrado analisado ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ). Quando a DMO do indivíduo é comparada à de adultos jovens normais do mesmo sexo, obtém-se o T-escore. A diferença entre a DMO do indivíduo e o padrão normal é expressa por desvios padrão acima ou abaixo do valor comparado. Geralmente um desvio padrão equivale a 10%-15% do valor da DMO em  $\text{g}/\text{cm}^2$  (ENSRUD, 2009; MAGALHÃES JÚNIOR, 2014).

O *Fracture Risk Assessment Tool* (FRAX) é uma ferramenta analítica desenvolvida pela *University of Sheffield* (Inglaterra) que tem por objetivo calcular a probabilidade de ocorrer, nos próximos 10 anos, uma fratura de quadril ou outra fratura osteoporótica relevante (definida como uma fratura clínica de vértebra, quadril, antebraço ou úmero). O FRAX® calcula o risco de fratura osteoporótica, em porcentagem, com base na validação internacional de fatores individuais de risco, incluindo idade, sexo, IMC, ocorrência de fratura prévia, história de fratura de quadril em mãe ou pai, tabagismo atual, etilismo, uso de glicocorticoides, artrite reumatoide e DMO do colo femoral. Sendo considerado elevado risco de fratura de quadril a partir de 3% e elevado risco de fratura osteoporótica quando a partir de 20% na ferramenta FRAX. (KANIS et al., 2009).

O diagnóstico da osteopenia deve ser realizada através da associação entre a medida da DMO e o risco estimado de fraturas (via FRAX), evitando assim erros relacionados ao tratamento, como terapia medicamentosa desnecessária. Estudos recentes sobre a osteopenia (LESLIE; MORIN; LIX,

2010; PRAWIRADILAGA et al., 2018; SAMELSON et al., 2019) revelam que o seu diagnóstico precoce reduz o uso desnecessário de terapia medicamentosa e contribui para diminuição do número de efeitos colaterais, sendo cada vez mais necessário investir em técnicas que contribuam para essa finalidade.

A metabonômica é uma ferramenta analítica que possui a capacidade de apontar mudanças no perfil de metabólitos em determinados biofluidos orgânicos como soro (LINDON et al., 2000). A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) tornou-se uma das principais ferramentas para a análise de tais alterações, pois o espectro pode demonstrar metabólitos e suas concentrações (MARCHESI et al., 2007). O perfil dos espectros de RMN é complexo, contendo centenas de informações. Para uma interpretação eficiente, é necessário o uso de ferramentas estatísticas, como análise de componentes principais (PCA), mínimos quadrados parciais (PLS), análise discriminante (DA). O tratamento quimiométrico estatístico dos dados espectrais permite análise de maneira simples, rápida e confiável (LINDON; HOLMES; NICHOLSON, 2001; WEBB, 2002).

Estudos utilizando a ferramenta metabonômica para diagnóstico de doenças são cada vez mais publicados em revistas científicas. Eles abordam temas diversos de interesse médico como o diabetes Mellitus (MA et al., 2018), diagnóstico da hepatite C (GODOY et al., 2010), câncer urológico (ARAÚJO et al., 2017) e até depressão (LIU et al., 2019). Dentre outros que corroboram com o uso da metabonômica para auxiliar no reconhecimento de padrões bioquímicos e consequentemente auxiliar no diagnósticos de várias doenças.

O objetivo do presente estudo foi identificar pacientes com osteopenia que tem indicação de tratamento pelo FRAX e criar um modelo metabonômico capaz de separá-los do grupo de pacientes com osteopenia sem indicação de tratamento pelo FRAX. Para isso, foram realizadas análises de amostras de soro dos pacientes através do RMN de  $^1\text{H}$  combinadas à análise estatística utilizando as ferramentas quimiométricas de redução de dados multivariados e de reconhecimento de padrões.

## METODOLOGIA

Foram analisadas 26 amostras de soro de pacientes com osteopenia, diagnosticados através de medida da densidade mineral óssea (T-Score entre -1 e -2,5) e que aceitaram participar através do termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Esses pacientes também tiveram seus dados clínicos coletados e submetidos a análise da ferramenta FRAX® disponível em: <https://www.sheffield.ac.uk/FRAX/tool.aspx?country=55>.

Essas amostras de soro foram submetidas a análise de RMN- $H^1$  e os espectros obtidos foram processados através de sequências de pulso específicas para melhorias dos sinais: PRESAT e CPMG. O modelo metabonômico foi construído a partir da análise estatística supervisionada (sPLS-DA) e da não supervisionada (PCA), calculado pela ferramenta *on line* (MetaboAnalist 3.0), após pré-processamento dos dados numa matriz obtidas dos espectros de RMN- $H^1$  no software MestreNova®.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados clínicos obtidos após a coleta dos 26 pacientes com osteopenia foram reunidos na tabela 1. Foi observado que apenas 6 amostras apresentam indicação de tratamento pelo risco de fratura elevado em 10 anos, >3% para fratura de quadril e >20% para fratura osteoporótica. Essas amostras foram então reclassificadas em dois novos grupos de osteopenia: 20 amostras no grupo "OPN", apenas osteopenia; e 06 amostras no grupo "OPNFrax", osteopenia com indicação de tratamento pelo Frax.

*Tabela 1: Dados clínicos dos pacientes com osteopenia (OPN) e dos pacientes que apresentam risco de fraturas de quadril ou osteoporóticas com indicação de tratamento pelo Frax (OPNFrax).*

| CÓDIGO | FRAX (FRATURAS) |          | T-Scores | IDADE | IMC | CLASSE  |
|--------|-----------------|----------|----------|-------|-----|---------|
|        | Osteop %        | Quadril% |          |       |     |         |
| OPN08  | 10,0            | 3,00     | -1,6     | 69    | 27  | OPNFRAX |

|       |             |             |      |    |    |         |
|-------|-------------|-------------|------|----|----|---------|
| OPN02 | 5,7         | 0,3         | -1,6 | 49 | 21 | OPN     |
| OPN05 | 2,9         | 0,3         | -1,1 | 60 | 23 | OPN     |
| OPN06 | 3,9         | 1           | -1,9 | 56 | 25 | OPN     |
| OPN07 | 5,9         | 1,9         | -1,9 | 66 | 21 | OPN     |
| OPN09 | 2,5         | 0,2         | -1,1 | 52 | 41 | OPN     |
| OPN14 | 6,9         | 2,7         | -1,4 | 70 | 20 | OPN     |
| OPN15 | 3,9         | 0,7         | -1,9 | 58 | 21 | OPN     |
| OPN16 | 10,0        | 0,5         | -1,2 | 57 | 25 | OPN     |
| OPN17 | 3,1         | 0,5         | -1,1 | 67 | 26 | OPN     |
| OPN18 | 6,6         | 1,4         | -1,2 | 73 | 23 | OPN     |
| OPN19 | <b>20,2</b> | 2,70        | -1,7 | 56 | 35 | OPNFRAX |
| OPN20 | <b>21,0</b> | 2,80        | -1,9 | 56 | 36 | OPNFRAX |
| OPN21 | 5,3         | 0,4         | -1,3 | 52 | 26 | OPN     |
| OPN22 | 5,2         | 1,3         | -1,2 | 63 | 27 | OPN     |
| OPN24 | 7,0         | <b>4,30</b> | -2,3 | 79 | 25 | OPNFRAX |
| OPN26 | 9,5         | <b>3,20</b> | -1,9 | 55 | 27 | OPNFRAX |
| OPN27 | 9,0         | <b>4,00</b> | -2   | 76 | 24 | OPNFRAX |
| OPN28 | 2,8         | 0,2         | -1,2 | 54 | 26 | OPN     |
| OPN29 | 3,7         | 0,9         | -1,9 | 65 | 37 | OPN     |
| OPN30 | 6,2         | 0,4         | -1,6 | 54 | 27 | OPN     |
| OPN32 | 4,5         | 1,2         | -1,4 | 72 | 29 | OPN     |
| OPN33 | 7,8         | 1,1         | -2,1 | 62 | 24 | OPN     |
| OPN34 | 5,6         | 1           | -1,7 | 61 | 33 | OPN     |
| OPN36 | 7,4         | 2,1         | -2,2 | 63 | 30 | OPN     |
| OPN37 | 5,1         | 2,1         | -2,2 | 64 | 28 | OPN     |

Os dois grupos foram submetidos a análise discriminante por mínimos quadrados parciais esparsos (sPLS-DA), uma análise quimiométrica supervisionada dos espectros obtidos por RMN capaz de contribuir no reconhecimento de padrões e normalizados pela soma, o resultado é mostrado na figura 1. Foi observado uma tendência de separação entre os grupos, onde as amostras com indicação de tratamento pelo FRAX ( $\Delta$ ) surgiram num polo oposto no gráfico, porém com baixo índice de explicação nas duas primeiras PCs (componentes principais).

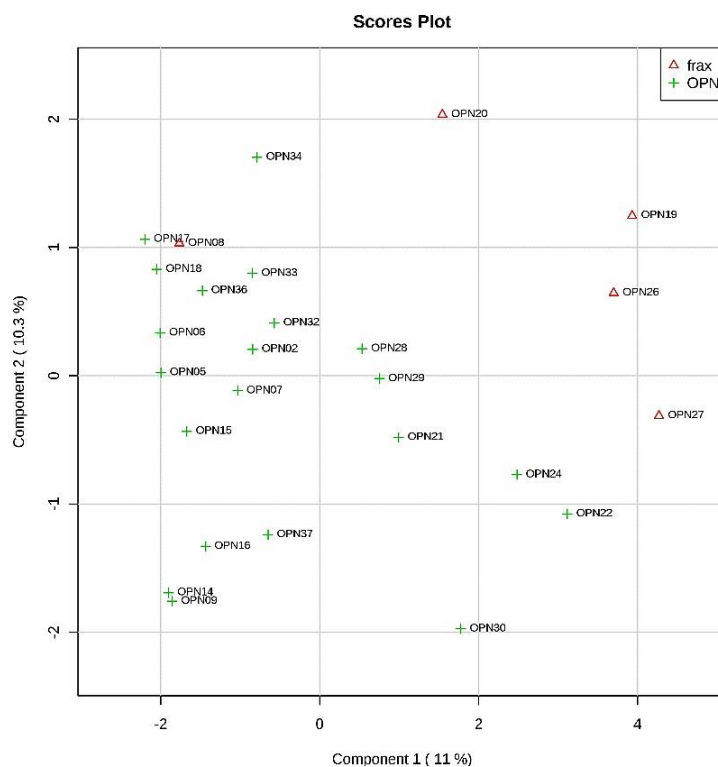
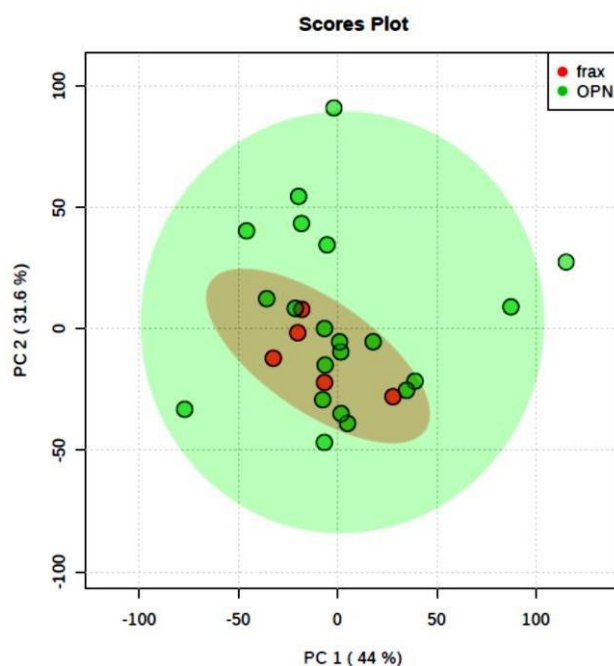


Figura 1: sPLS-DA com separação parcial dos grupos OPNFrax (red triangle) e OPN (green plus). Os pacientes do grupo OPNFrax são aqueles que possuem risco aumentado para fraturas osteoporóticas e/ou fraturas de quadril.

Ao se analisar os dados pela PCA (Figura 2), obteve-se uma melhor variância explicada já nas duas primeiras PCs (75,6%), chegando a 88% nas três primeiras PCs. No entanto o grau de separação espacial das amostras não foi satisfatório, ficando as amostras do grupo OPNFrax inseridas entre as amostras do grupo OPN, que não tem indicação de tratamento pelo cálculo do FRAX®.



*Figura 2: Gráfico “Scores Plot” dos grupos OPN (verde) e OPNFrax (vermelho) na PCA. A variância explicada (variance explained) é mostrada entre parêntese.*

## CONCLUSÕES

Esses achados ainda não permitem tirar conclusões precisas quanto ao modelo metabonômico de separação dos grupos OPN e OPNFrax, devido tanto ao baixo  $n$  (número de amostras), diferença de  $n$  entre os grupos e o baixo índice “variância explicada” obtida. No entanto, pode-se observar uma “tendência” de separação intragrupo (OPN vs OpnFrax) na osteopenia, entre aqueles indivíduos que tem FRAX com indicação de tratamento, daqueles que não tem essa indicação. Esses resultados abrem perspectivas para maiores estudos a respeito do Frax, da osteopenia e da contribuição que a metabonômica poderá dar ao diagnóstico dessa patologia.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, L. et al. Diagnosis of Urological Cancer by  $^1\text{H}$  NMR Based Metabonomics Urinalysis: A Pilot Study. *British Journal of Medicine and Medical Research*, v. 19, n. 3, p. 1–8, 10 jan. 2017.
- ENSRUD, K. E. A Comparison of Prediction Models for Fractures in Older Women: Is More Better? *Archives of Internal Medicine*, v. 169, n. 22, p. 2087, 14 dez. 2009.
- GODOY, M. M. G. et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics: Hepatitis C diagnosis using metabonomics. *Journal of Viral Hepatitis*, v. 17, n. 12, p. 854–858, dez. 2010.
- KANIS, J. A. et al. FRAX and its applications to clinical practice. *Bone*, v. 44, n. 5, p. 734–743, maio 2009.
- LESLIE, W. D.; MORIN, S.; LIX, L. M. A before-and-after study of fracture risk reporting and osteoporosis treatment initiation. *Annals of Internal Medicine*, v. 153, n. 9, p. 580–586, 2 nov. 2010.
- LINDON, J. C. et al. Metabonomics: Metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids. *Concepts in Magnetic Resonance*, v. 12, n. 5, p. 289–320, 2000.
- LINDON, J. C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J. K. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, v. 39, n. 1, p. 1–40, jul. 2001.
- LIU, X. et al. Brain metabonomics study of the antidepressant-like effect of Xiaoyaosan on the CUMS-depression rats by  $^1\text{H}$  NMR analysis. *Journal of Ethnopharmacology*, 29 jan. 2019.
- MA, Q. et al. Progress in Metabonomics of Type 2 Diabetes Mellitus. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 23, n. 7, 23 jul. 2018.
- MAGALHÃES JÚNIOR, H. M. Portaria no224. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Osteoporose. . 26 mar. 2014.

MARCHESI, J. R. et al. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *Journal of Proteome Research*, v. 6, n. 2, p. 546–551, fev. 2007.

PRAWIRADILAGA, R. S. et al. FRAX Calculated without BMD Resulting in a Higher Fracture Risk Than That Calculated with BMD in Women with Early Breast Cancer. *Journal of Osteoporosis*, v. 2018, p. 4636028, 2018.

SAMELSON, E. J. et al. Cortical and trabecular bone microarchitecture as an independent predictor of incident fracture risk in older women and men in the Bone Microarchitecture International Consortium (BoMIC): a prospective study. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, v. 7, n. 1, p. 34–43, jan. 2019.

WEBB, A. R. *Statistical pattern recognition*. 2nd ed ed. West Sussex, England; New Jersey: Wiley, 2002.

## 5 CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos, pode-se concluir que esse trabalho atingiu o seu objetivo de identificar potenciais biomarcadores e diferenciar, a partir de uma análise espectroscópica de soro, grupos de pacientes com osteoporose, osteopenia e pacientes saudáveis. Foi obtido o modelo metabonômico para a osteoporose com total separação entre saudáveis e doentes. E também uma separação entre os grupos osteoporose e osteopenia, o que reforça a capacidade da espectroscopia de RMN ser capaz de criar um perfil metabonômico com significância estatística ( $p > 0,05$ ) para doenças crônicas como a osteoporose. Além disso, foram identificadas as regiões discriminantes do espectro (regiões mais importantes para o modelo) e atribuídos a metabólitos endógenos presentes no soro e correlacionando-os com a osteoporose. O risco de fratura (FRAX®) para pacientes osteopênicos também foi avaliado, de forma preliminar, pela metabonômica. Abrindo portas para novos estudos na área.

Esses resultados nos trazem muitas perspectivas de contribuição para o diagnóstico da osteoporose e destacam o papel da metabonômica como uma ferramenta inovadora na pesquisa clínica, pois engloba uma série de conhecimentos a fim de chegar a resultados surpreendentes através de uma técnica não invasiva, rápida e de relevante aplicabilidade na área de saúde.

## REFERÊNCIAS

- AGHOLME, F.; ASPENBERG, P. Wnt signaling and orthopedics, an overview. **Acta Orthopaedica**, v. 82, n. 2, p. 125–130, abr. 2011.
- ASADA, N. et al. Matrix-embedded osteocytes regulate mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. **Cell Stem Cell**, v. 12, n. 6, p. 737–747, 6 jun. 2013.
- BARBOSA, A. D. **Polimorfismo do gene codificante do receptor da vitamina D (VDR): associação com a susceptibilidade à osteoporose pós-menopausa e gravidade da doença**. Dissertação (Mestrado)—Recife, Pernambuco: UFPE, 2013.
- BARROS, C. J. P. **Metabonômica Baseada em RMN como Ferramenta para Discriminação de Grãos de Soja Irrradiados & Diagnóstico de Hepatites e Fibrose Hepática**. TESE DOUTORADO—RECIFE - PE: UFPE, 2017.
- BECKONERT, O. et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. **Nature Protocols**, v. 2, n. 11, p. 2692–2703, nov. 2007.
- BERRUETA, L. A.; ALONSO-SALCES, R. M.; HÉBERGER, K. Supervised pattern recognition in food analysis. **Journal of Chromatography. A**, v. 1158, n. 1–2, p. 196–214, 27 jul. 2007.
- BIGUETTI, C. C. et al. Bioactive glass-ceramic bone repair associated or not with autogenous bone: a study of organic bone matrix organization in a rabbit critical-sized calvarial model. **Clinical Oral Investigations**, v. 23, n. 1, p. 413–421, jan. 2019.
- BRERETON, R. G. Chemometrics and Statistics: Multivariate Classification Techniques. In: **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering**. [s.l.] Elsevier, 2013.
- BSV, A. **Abordagem diagnóstica: calculadora**. Biblioteca Virtual em Saúde, Brasil: [s.n.]. Disponível em: <<http://aps.bvs.br/apps/calculadoras/?page=1>>.
- CHAN, E. C. Y. et al. Metabonomic profiling of bladder cancer. **Journal of Proteome Research**, v. 14, n. 2, p. 587–602, 6 fev. 2015.
- CHEN, S.-Y. et al. An NMR metabolomic study on the effect of alendronate in ovariectomized mice. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e106559, 2014.
- CRANNEY, A. et al. II. Meta-Analysis of Alendronate for the Treatment of Postmenopausal Women. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 4, p. 508–516, ago. 2002.
- CUMMINGS, S. R.; MELTON, L. J. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. **The Lancet**, v. 359, n. 9319, p. 1761–1767, maio 2002.

CURTIS, E. M. et al. Reprint of: The impact of fragility fracture and approaches to osteoporosis risk assessment worldwide. **International Journal of Orthopaedic and Trauma Nursing**, v. 26, p. 7–17, ago. 2017.

DA SILVA, R. A. et al. The role of triiodothyronine hormone and mechanically-stressed endothelial cell paracrine signalling synergism in gene reprogramming during hBMSC-stimulated osteogenic phenotype in vitro. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 478, p. 151–167, 15 dez. 2018.

DAIS, P.; HATZAKIS, E. Quality assessment and authentication of virgin olive oil by NMR spectroscopy: a critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 765, p. 1–27, 26 fev. 2013.

DANESHVAR, A. et al. Single seed Near Infrared Spectroscopy discriminates viable and non-viable seeds of *Juniperus polycarpus*. **Silva Fennica**, v. 49, n. 5, 2015.

DE LAET, C. et al. The impact of the use of multiple risk indicators for fracture on case-finding strategies: a mathematical approach. **Osteoporosis International**, v. 16, n. 3, p. 313–318, mar. 2005.

DEMPSTER, D. W. Osteoporosis and the burden of osteoporosis-related fractures. **The American Journal of Managed Care**, v. 17 Suppl 6, p. S164–169, maio 2011.

DIONÍSIO DA SILVA, R. **Aplicações Metabonômicas usando Ressonância Magnética Nuclear de 1H: Diagnóstico Não-Invasivo de Câncer de Próstata e Urológico & Classificação de Azeite de Oliva Extra Virgem de Produção Orgânica**. TESE DOUTORADO—Recife, Pernambuco: UFPE, 2017.

DIXON, S. J.; SIMS, S. M. P2 purinergic receptors on osteoblasts and osteoclasts: Potential targets for drug development. **Drug Development Research**, v. 49, n. 3, p. 187–200, mar. 2000.

DUARTE, I. F.; GIL, A. M. Metabolic signatures of cancer unveiled by NMR spectroscopy of human biofluids. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 62, p. 51–74, abr. 2012.

DUNN, W.; ELLIS, D. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285–294, abr. 2005.

DYSON, H. J.; PALMER, A. G. 1.9 Introduction to Solution State NMR Spectroscopy. In: **Comprehensive Biophysics**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 136–159.

EASTELL, R. (ED.). **Bone markers: biochemical and clinical perspectives**. London: Martin Dunitz, 2001.

FDA. **US Food and Drug Administration FDA/Center for Drug Evaluation and Research** Office of Communications. Division of Information Services, ,

2018. Disponível em:

<<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=077982>>. Acesso em: 1 fev. 2018

FINK, H. A. et al. Clinical utility of routine laboratory testing to identify possible secondary causes in older men with osteoporosis: the Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Study. **Osteoporosis International**, v. 27, n. 1, p. 331–338, jan. 2016.

FRAX®, TOOL. **World Health Organization Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases**. University of Sheffield, UK: [s.n.].

GALLAGHER, F. A. An introduction to functional and molecular imaging with MRI. **Clinical Radiology**, v. 65, n. 7, p. 557–566, jul. 2010.

GAUGRIS, S. et al. Vitamin D inadequacy among post-menopausal women: a systematic review. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 98, n. 9, p. 667–676, 1 set. 2005.

GODOY, M. M. G. et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics: Hepatitis C diagnosis using metabonomics. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 17, n. 12, p. 854–858, dez. 2010.

GOUVEIA, L. R. et al. Diagnosis of coinfection by schistosomiasis and viral hepatitis B or C using <sup>1</sup>H NMR-based metabonomics. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0182196, 1 ago. 2017.

HANAA, H. A.; AMAL, H. H. Potential Role of Arginine, Glutamine and Taurine in Ameliorating Osteoporotic Biomarkers in Ovariectomized Rats. **Report and Opinion**, v. 1, n. 6, 2009.

HANNON, R.; EASTELL, R. Preanalytical Variability of Biochemical Markers of Bone Turnover. **Osteoporosis International**, v. 11, n. 0, p. S30–S44, 1 dez. 2000.

HOLMES, E.; TSANG, T. M.; TABRIZI, S. J. The application of NMR-based metabonomics in neurological disorders. **NeuroRX**, v. 3, n. 3, p. 358–372, jul. 2006.

INADA, M.; MIYAURA, C. [Cytokines in bone diseases. Cytokine and postmenopausal osteoporosis]. **Clinical Calcium**, v. 20, n. 10, p. 1467–1472, out. 2010.

IOF. **Osteoporosis & Musculoskeletal Disorders**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.iofbonehealth.org/osteoporosis>>. Acesso em: 5 maio. 2018.

IOLASCON, G. The contribution of cortical and trabecular tissues to bone strength: insights from denosumab studies. **CLINICAL CASES IN MINERAL AND BONE METABOLISM**, 2013.

JAMAL, S. A. et al. Clinical utility of laboratory testing in women with osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 16, n. 5, p. 534–540, maio 2005.

JUCHEM, C.; ROTHMAN, D. L. Basis of Magnetic Resonance. In: **Magnetic Resonance Spectroscopy**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 3–14.

KANIS, J. A. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. **Lancet (London, England)**, v. 359, n. 9321, p. 1929–1936, 1 jun. 2002.

KANIS, J. A. et al. The diagnosis of osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 9, n. 8, p. 1137–1141, 3 dez. 2009.

KANIS, J. A. et al. Interpretation and use of FRAX in clinical practice. **Osteoporosis International**, v. 22, n. 9, p. 2395–2411, set. 2011.

KAPTOGE, S. et al. Whom to treat? The contribution of vertebral X-rays to risk-based algorithms for fracture prediction. Results from the European Prospective Osteoporosis Study. **Osteoporosis International**, v. 17, n. 9, p. 1369–1381, set. 2006.

KEUN, H. C. Metabonomic modeling of drug toxicity. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 109, n. 1–2, p. 92–106, jan. 2006.

KHAJURIA, D. K.; RAZDAN, R.; MAHAPATRA, D. R. Zoledronic acid in combination with alfacalcidol has additive effects on trabecular microarchitecture and mechanical properties in osteopenic ovariectomized rats. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 19, n. 4, p. 646–656, jul. 2014.

KHOSLA, S.; MELTON, L. J. Osteopenia. **New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 22, p. 2293–2300, 31 maio 2007.

LEAVELL, H. R.; CLARK, E. G. **Medicina Preventiva**. [s.l.] São Paulo: McGraw-Hill, 1976.

LEE, Y. J. et al. The association between oxidative stress and bone mineral density according to menopausal status of Korean women. **Obstetrics & Gynecology Science**, v. 58, n. 1, p. 46–52, jan. 2015.

LENCEL, P.; MAGNE, D. Inflammaging: the driving force in osteoporosis? **Medical Hypotheses**, v. 76, n. 3, p. 317–321, mar. 2011.

LEVITT, M. H. **Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance**. 2nd ed. Chichester, England; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2008.

LEWIECKI, E. M. New targets for intervention in the treatment of postmenopausal osteoporosis. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 7, n. 11, p. 631–638, 20 set. 2011a.

LEWIECKI, E. M. New targets for intervention in the treatment of postmenopausal osteoporosis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7, n. 11, p. 631–638, nov. 2011b.

LIN, Y.-C. et al. Peak spine and femoral neck bone mass in young women. **Bone**, v. 32, n. 5, p. 546–553, maio 2003.

- LIU, Y.-R. et al. <sup>1</sup>H NMR metabolic profiling analysis offers evaluation of Nilestriol treatment in ovariectomised rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 387, n. 1–2, p. 19–34, abr. 2014.
- LONG, W.-F. et al. [<sup>1</sup>H-NMR-based metabonomics analysis of plasma from osteoporotic rats induced by ovariectomy]. **Sichuan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal of Sichuan University. Medical Science Edition**, v. 40, n. 5, p. 843–847, set. 2009.
- LV, H. et al. Metabolomics and Its Application in the Development of Discovering Biomarkers for Osteoporosis Research. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, 2 dez. 2016.
- MA, B. et al. Metabolomic Profiles Delineate Signature Metabolic Shifts during Estrogen Deficiency-Induced Bone Loss in Rat by GC-TOF/MS. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e54965, 7 fev. 2013.
- MABILLEAU, G. et al. Increased osteoclastic activity in acute Charcot's osteoarthopathy: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. **Diabetologia**, v. 51, n. 6, p. 1035–1040, jun. 2008.
- MAJIMA, T. et al. Increased bone turnover in patients with hypercholesterolemia. **Endocrine Journal**, v. 55, n. 1, p. 143–151, mar. 2008.
- MANSON, J. E. et al. Menopausal hormone therapy and health outcomes during the intervention and extended poststopping phases of the Women's Health Initiative randomized trials. **JAMA**, v. 310, n. 13, p. 1353–1368, 2 out. 2013.
- MARITZ, F. J. et al. Effect of statins on bone mineral density and bone histomorphometry in rodents. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, n. 10, p. 1636–1641, out. 2001.
- MARQUES, E. A. et al. Association of bone turnover markers with volumetric bone loss, periosteal apposition, and fracture risk in older men and women: the AGES-Reykjavik longitudinal study. **Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA**, v. 27, n. 12, p. 3485–3494, dez. 2016.
- MATKOVIC, V. et al. Factors that influence peak bone mass formation: a study of calcium balance and the inheritance of bone mass in adolescent females. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 52, n. 5, p. 878–888, 1 nov. 1990.
- MATTOS, V. Osteoporose atinge 10 milhões de brasileiros, de acordo com a OMS. **domtotal.com**, 15 abr. 2017.
- MEBAREK, S. et al. Phospholipases of mineralization competent cells and matrix vesicles: roles in physiological and pathological mineralizations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 5036–5129, 1 mar. 2013.

MILLER, P. D. et al. Practical clinical application of biochemical markers of bone turnover: Consensus of an expert panel. **Journal of Clinical Densitometry: The Official Journal of the International Society for Clinical Densitometry**, v. 2, n. 3, p. 323–342, 1999a.

MILLER, P. D. et al. Bone Densitometry: The Best Way to Detect Osteoporosis and to Monitor Therapy. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 6, p. 1867–1871, jun. 1999b.

MORI, G. et al. The Interplay between the bone and the immune system. **Clinical & Developmental Immunology**, v. 2013, p. 720504, 2013.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Systems biology: Metabonomics. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1054–1056, 23 out. 2008.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems**, v. 29, n. 11, p. 1181–1189, nov. 1999.

NIH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL ON OSTEOPOROSIS PREVENTION, DIAGNOSIS, AND THERAPY. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. **JAMA**, v. 285, n. 6, p. 785–795, 14 fev. 2001.

OLIVEIRA DA SILVA, R. **A Espectroscopia de RMN como Ferramenta Elucidativa: Estruturas Moleculares, Mecanismos de Reação e Metabonômica**. TESE—RECIFE-PE: UFPE, 2010.

OMS. **Publicações da OMS**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.who.int/eportuguese/publications/pt/>>.

OROZCO, P. Atherogenic lipid profile and elevated lipoprotein (a) are associated with lower bone mineral density in early postmenopausal overweight women. **European Journal of Epidemiology**, v. 19, n. 12, p. 1105–1112, 2004.

PAGANI, F.; FRANCUCCI, C. M.; MORO, L. Markers of bone turnover: biochemical and clinical perspectives. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 28, n. 10 Suppl, p. 8–13, 2005.

PARHAMI, F.; GARFINKEL, A.; DEMER, L. L. Role of Lipids in Osteoporosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, n. 11, p. 2346–2348, 1 nov. 2000.

PASCO, J. A. et al. The population burden of fractures originates in women with osteopenia, not osteoporosis. **Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA**, v. 17, n. 9, p. 1404–1409, 2006.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. [s.l: s.n.].

PINTO, R. C.; TRYGG, J.; GOTTFRIES, J. Advantages of orthogonal inspection in chemometrics: Advantages of orthogonal inspection. **Journal of Chemometrics**, v. 26, n. 6, p. 231–235, jun. 2012.

POIANA, C. et al. New Clues that May Link Osteoporosis to the Circulating Lipid Profile. **Bone Research**, v. 1, n. 3, p. 260–266, set. 2013.

PRENTICE, R. L. Postmenopausal hormone therapy and the risks of coronary heart disease, breast cancer, and stroke. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 32, n. 6, p. 419–425, nov. 2014.

QIAO, Y. et al. Plasma metabonomics study of first-Episode schizophrenia treated with olanzapine in female patients. **Neuroscience Letters**, v. 617, p. 270–276, mar. 2016.

RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25103–25108, 13 ago. 2010.

ROSS, P. D.; KNOWLTON, W. Rapid bone loss is associated with increased levels of biochemical markers. **Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 2, p. 297–302, fev. 1998.

SAGE, A. P. et al. Hyperlipidemia induces resistance to PTH bone anabolism in mice via oxidized lipids. **Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 6, p. 1197–1206, jun. 2011.

SARAIVA, G. L.; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores Bioquímicos da Remodelação Óssea na Prática Clínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 72–78, fev. 2002.

SCHMIDT, T. et al. A retrospective analysis of bone mineral status in patients requiring spinal surgery. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 19, n. 1, p. 53, 13 2018.

SEEMAN, E. Bone quality: the material and structural basis of bone strength. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 26, n. 1, p. 1–8, 2008.

SEIBEL, M. J. Biochemical Markers of Bone Turnover Part I: Biochemistry and Variability. **Biochemical Markers of Bone Turnover Part I: Biochemistry and Variability**, v. 26, n. 4, p. 97–122, 2005.

SIASOS, G. et al. Inflammatory markers in hyperlipidemia: from experimental models to clinical practice. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 37, p. 4132–4146, dez. 2011.

SIDDIQUI, N. A.; OWEN, J. M. Clinical advances in bone regeneration. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, n. 3, p. 192–200, maio 2013.

SILVA, R. D. DA. **Aplicações metabonômicas usando ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$ : diagnóstico não-invasivo de câncer de próstata e urológico & classificação de oliva extra virgem de produção orgânica.** Doutorado—Recife, Brasil: UFPE, 2017.

SKOOG, D. A. **Fundamentals of analytical chemistry.** 9th Ed ed. Belmont, CA: Cengage - Brooks/Cole, 2012.

STEVENSON, J. C.; PANAY, N.; PEXMAN-FIETH, C. Oral estradiol and dydrogesterone combination therapy in postmenopausal women: Review of efficacy and safety. **Maturitas**, v. 76, n. 1, p. 10–21, set. 2013.

STOLNICKI, B.; OLIVEIRA, L. G. For the first fracture to be the last. **Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)**, v. 51, n. 2, p. 121–126, mar. 2016.

SZULC, P. Vertebral Fracture: Diagnostic Difficulties of a Major Medical Problem: VERTEBRAL FRACTURE: DIAGNOSTIC DIFFICULTIES OF A MAJOR MEDICAL PROBLEM. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 33, n. 4, p. 553–559, abr. 2018.

TANKÓ, L. B. et al. Does serum cholesterol contribute to vertebral bone loss in postmenopausal women? **Bone**, v. 32, n. 1, p. 8–14, jan. 2003.

TARAKIDA, A. et al. Hypercholesterolemia accelerates bone loss in postmenopausal women. **Climacteric: The Journal of the International Menopause Society**, v. 14, n. 1, p. 105–111, fev. 2011.

TELLA, S. H.; GALLAGHER, J. C. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 142, p. 155–170, jul. 2014a.

TELLA, S. H.; GALLAGHER, J. C. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 142, p. 155–170, jul. 2014b.

TORTORA, G. J.; DERRICKSON, B. **Corpo Humano - 10ed: Fundamentos de Anatomia e Fisiologia.** 10ª Ed. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2016, 2016. v. capítulo 6

VARGA, F. et al. Triiodothyronine, a regulator of osteoblastic differentiation: depression of histone H4, attenuation of c-fos/c-jun, and induction of osteocalcin expression. **Calcified Tissue International**, v. 61, n. 5, p. 404–411, nov. 1997.

VASIKARAN, S. et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. **Osteoporosis International**, v. 22, n. 2, p. 391–420, fev. 2011.

VASIKARAN, S. D. et al. Harmonised Australian Reference Intervals for Serum PINP and CTX in Adults. **The Clinical Biochemist. Reviews**, v. 35, n. 4, p. 237–242, nov. 2014.

VILACA, T.; GOSSIEL, F.; EASTELL, R. Bone Turnover Markers: Use in Fracture Prediction. **Journal of Clinical Densitometry**, v. 20, n. 3, p. 346–352, jul. 2017.

WANG, Y. et al. Association between Serum Cholesterol Level and Osteoporotic Fractures. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 30, 2018.

WANNMACHER, L. Manejo racional da osteoporose: onde está o real benefício? In: **Terapia de reposição hormonal na menopausa: Evidências atuais**. Brasília: [s.n.]. v. 1.

WATTS, N. B. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 8 Pt 2, p. 1359–1368, ago. 1999.

WEBB, A. R. **Statistical pattern recognition**. 2nd ed ed. West Sussex, England; New Jersey: Wiley, 2002.

WESTERHUIS, J. A. et al. Assessment of PLSDA cross validation. **Metabolomics**, v. 4, n. 1, p. 81–89, mar. 2008.

WHO. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. **Report of a WHO Study Group.**, 1994.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 58, n. 2, p. 109–130, out. 2001.

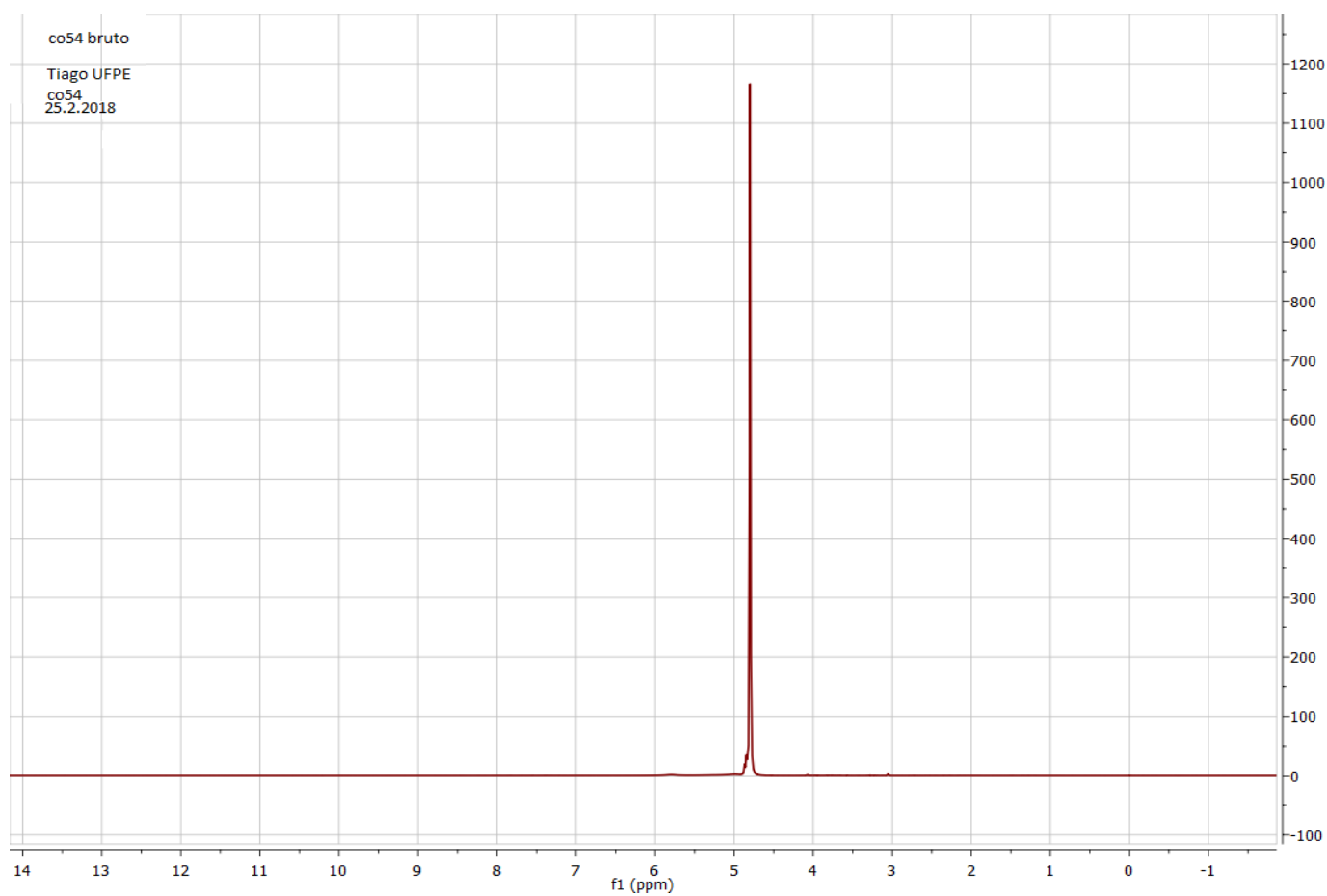
WU, C.-H. et al. Consensus of official position of IOF/ISCD FRAX initiatives in Asia-Pacific region. **Journal of Clinical Densitometry: The Official Journal of the International Society for Clinical Densitometry**, v. 17, n. 1, p. 150–155, mar. 2014.

XIONG, J.; O'BRIEN, C. A. Osteocyte RANKL: New insights into the control of bone remodeling. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 3, p. 499–505, mar. 2012.

XUE, L. et al. A <sup>1</sup>HNMR-Based Metabonomics Study of Postmenopausal Osteoporosis and Intervention Effects of Er-Xian Decoction in Ovariectomized Rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 12, p. 7635–7651, 8 nov. 2011.

YOU, L. et al. High cholesterol diet increases osteoporosis risk via inhibiting bone formation in rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 32, n. 12, p. 1498–1504, dez. 2011.

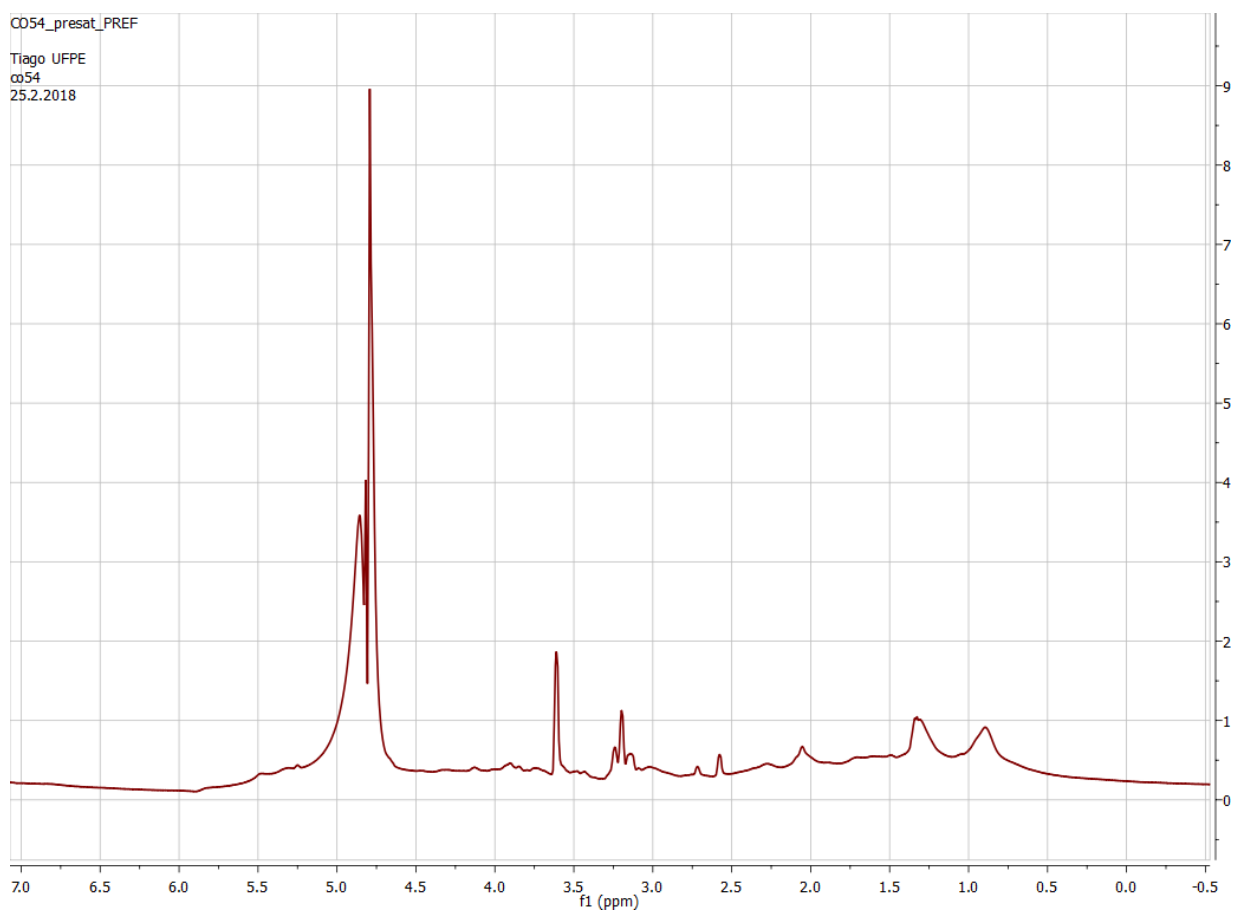
ZHANG, X.; LIU, M.; MAO, X. Solvent Suppression Methods in NMR Spectroscopy ☆. In: **Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 128–136.

**APÊNDICE I – ESPECTRO RMN DE SORO, NÃO PROCESSADO.**

Espectro RMN “Bruto”, antes de realizar técnica de pressaturação do sinal da água. (PRESAT)

Verifica-se apenas um sinal forte, referente ao sinal da água que acaba por minimizar os demais sinais.

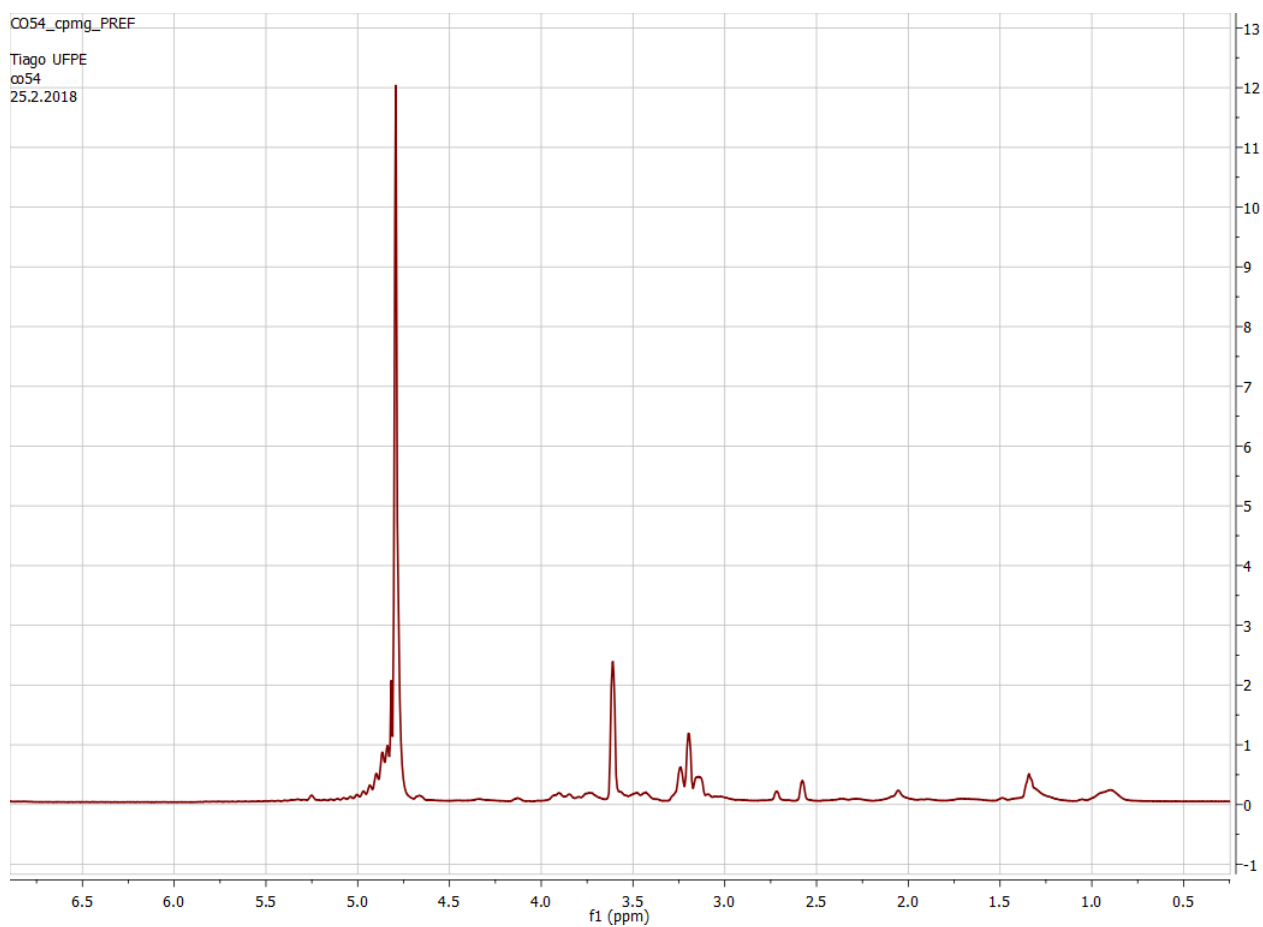
## APÊNDICE II – ESPECTRO DE RMN APÓS PRESAT



Verifica-se a diminuição acentuada do sinal da água e o surgimento dos sinais que antes estavam diminuídos pela elevada proporção do sinal da água.

Presença de sinais arredondados, sobretudo pela presença de macromoléculas como gorduras presentes nos soro

### APÊNDICE III – ESPECTRO DE RMN ${}^1\text{H}$ APÓS TÉCNICA DE CPMG



Espectro de RMN- ${}^1\text{H}$  tratado com Filtro T2, capaz de apresentar com mais clareza os sinais obtidos em soro.

## APÊNDICE IV – PROTOCOLO DO USO DO ESPECTRÔMETRO VARIAN® DE 400MHZ

### Análise de RMN $^1\text{H}$ de amostras de soro

#### Preparação da amostra de soro

Em um tubo de RMN, adicionar:

- Com pipetador automático, 400 $\mu\text{L}$  da amostra de soro, e descartar a ponta da pipeta;
- 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ .

#### Operação do RMN

- Mudar o job:

jexpn° (n° do job desejado)

enter

- Configurar para o núcleo a ser analisado:

Aba Start

Preencher:

a) SampleInfo:

i) Samplename: iniciais\_data\_S (identificação da amostra)

b) Solvente :  $\text{D}_2\text{O}$

c) Comments : Iniciais, código da amostra, data (identificação da amostra)

#### Próton

- Sintonizar para o núcleo a ser analisado:

~~Aba~~ Tools: barra de ferramentas

a) ProbeTuning Manualmente

b) Start ProbeTuning

c) Auto scale (ajustar até que a linha fique no ponto mínimo da curva)

d) Stop ProbeTuning

e) Quit

- Fazer o Lock:

Auto Lock

Find z0 no 400

a) Lock (o valor indicado é entre 30 e 40)

b) Aumentar o gain e, se necessário, o power.

- Fazer o shimming:

GradientShim (erro  $\leq 1$ ).

*Colocar a amostra p/ girar 20 Hz*

- Fazer aquisição do espectro:

Adquirir uma vez para selecionar o sinal da água:

Acquire

a) ~~Number of~~ scans : 1

b) Go *me 400* → Acquire

Marco o sinal da água (clique com o botão esquerdo).  $\delta$ , aproximadamente, 4,81 ppm.

- Para saturar a frequência da água:

*1.31* → Aba HPresat

a) Nearestline

b) Select

c) ~~Number of~~ scans : 64

d) Presaturation delay: 2

Pode-se verificar o tempo de análise:

Show time (4 minutos e 6 segundos). *5' 2"*

e) Go

- Quando acabar:

**lb=0.3 enter**

**wftenter**

Ajustar fase:

**aphenter**

- Para referenciar com sinal conhecido:

Clica no sinal da esquerda do duplete em, aproximadamente, 1.33.

nlr(1.342p)enter

- Salvar:

a) File: *barra de ferro monton*

b) Save as

c) Pasta GMEQ

d) File name: INICIAIS\_data\_PRESAT\_S

e) Save

- Para eliminar os sinais da gordura:

a) Liquids

i) STD 1D: T2-Measure

(Filtro de T2 grupo GMEQ)

Acquire *W T2-Measure*

*Relaxation delay*

a) Relaxingdelay : 2 *3 pl numer*

b) Scans: *2 pl sou* *d1=3*

(i) Requested : 128;

(ii) Blocksize: 16;

**bigtau = 0.07 enter**

**tau = 0.0004 enter;**

**dpsenter**

Pode-se verificar o tempo de análise:

**Show time** (8 minutos e 13 segundos). *9' 53"*

c) Go *12' 0"*

- Quando acabar:
 

**lb=0.3 enter**

**wftenter**

Ajustar fase:

**aphenter**
- Para referenciar com sinal conhecido:
 

Clica no sinal da esquerda do duplete em, aproximadamente, 1.33.

**nrl(1.342p) enter**
- Salvar:
 

a) ~~File~~ File: *Barra de ferramentas*

b) Save as

c) Pasta GMEQ

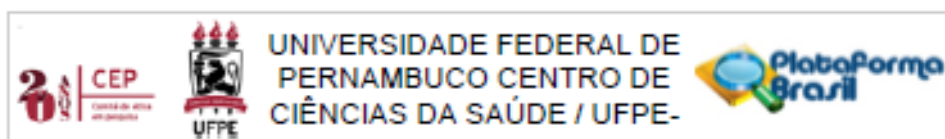
d) File name: INICIAIS\_data\_CPMG\_S

e) **Save**

**Descarte da amostra:**

- Devolver a amostra para o eppendorf;
- Colocar junto as demais para serem devolvidas ao HC.

## ANEXO A – APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA



### COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO METABONÔMICO DE PACIENTES PORTADORES DE  
 Pesquisador: Tiago de Arruda Pontes  
 Versão: 2  
 CAAE: 39852314.8.0000.5208  
 Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

#### DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 115163/2014  
 Patrocinador Principal: MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO  
 Financiamento Próprio

Informamos que o projeto ESTUDO METABONÔMICO DE PACIENTES PORTADORES DE OSTEOPOROSE que tem como pesquisador responsável Tiago de Arruda Pontes, foi recebido para análise ética no CEP Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências da Saúde / UFPE-CCS em 12/12/2014 às 11:21.

Endereço: Av. de Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)2125-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

Comitê de Ética  
em Pesquisa  
Envolvendo  
Serres Humanos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ESTUDO METABONÔMICO DE PACIENTES PORTADORES DE OSTEOPOROSE

**Pesquisador:** Tiago de Amada Pontes

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

**Versão:** 2

**CAAE:** 39852314.8.0000.5208

**Instituição Proponente:** CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO  
Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.114.754

**Data da Relatoria:** 27/07/2015

#### Apresentação do Projeto:

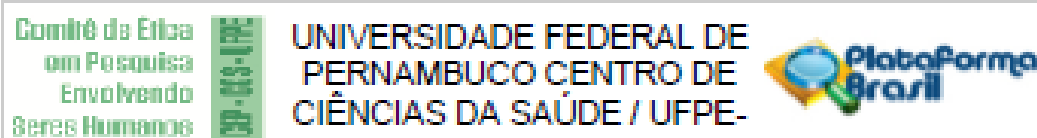
Trata-se de um projeto que tem a finalidade de ser a Tese de Doutorado de Tiago de Amada Pontes, pertencente ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde LIKA/UFPE, que tem como orientador o Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo-Junior e co-orientador o Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva. Este projeto procurará contribuir no estudo dos metabólitos presentes em pacientes com osteoporose, visando correlacionar a metabonômica com os biomarcadores ósseos, de forma a auxiliar no diagnóstico desta doença.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Geral:** Construir modelo metabonômico visando identificar potenciais biomarcadores presentes nos biofluidos (sangue e urina) que tenham valor preditivo para o diagnóstico de osteoporose em indivíduos adultos, correlacionando os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de H-1 obtido com o perfil proteico e análise da expressão dos genes para os biomarcadores estudados. E utilizar este modelo para

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600  
UF: PE Município: RECIFE  
Telefone: (81)2126-6588

E-mail: cspccc@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.114.754

acompanhar a evolução do tratamento dos pacientes diagnosticados com osteoporose.

#### Objetivos Específicos:

- 1- Desenvolver modelos metabonômicos que apresentem correlação com a medida de densidade mineral óssea de pessoas com e sem osteoporose diagnosticada.
- 2- Identificar quais regiões do espectro de RMN são discriminatórias e atribuí-las a metabólitos que seriam potenciais biomarcadores para diferenciar pacientes acometidos pela osteoporose dos saudáveis.
- 3- Utilizar o modelo metabonômico construído para acompanhar a evolução do tratamento clínico da osteoporose;
- 4- Proceder a uma análise bioquímica através do perfil protéico e análise da expressão dos genes para as calpoptectinas (proteínas S100A8 e S100A9), marcadores bioquímicos de formação óssea (PICP e PINP) e Marcadores ósseos de reabsorção (NTX-I e CTX-I) em pacientes com osteoporose;
- 4- Obter dados epidemiológicos comparativos como faixa etária, fumo e outras doenças correlatas, relacionando com as análises bioquímica, metabolômica e molecular.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios estão detalhados no projeto e no TCLE, encontrando-se adequados para a sua proposta.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Para a realização do projeto serão selecionados 200 pessoas, sendo 150 mulheres portadoras de osteoporose e 50 pessoas sem osteoporose oriundas da Unidade de Saúde PS Vila Rica, Cabo de Santo Agostinho – PE, que concordarem em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Estas voluntárias serão agrupadas em três grupo que serão classificados como: Grupo A: Indivíduos com Osteoporose primária pós-menopáusia, ainda não submetida a qualquer tratamento no momento da coleta das amostras; Grupo B: Indivíduos com Osteoporose primária pós-menopáusia em tratamento farmacológico padrão a menos de um ano; Grupo C: Indivíduos com Osteoporose primária pós-menopáusia em tratamento farmacológico padrão a mais de um ano; o Controle: Para efeitos comparativos também serão selecionados indivíduos saudáveis do ponto de vista clínico para formarem o padrão de controle do estudo. Para o estudo metabonômico será obtido uma amostra de soro e urina de cada paciente, que será encaminhada para o Laboratório da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE (DQF) e imediatamente submetidas à análise espectroscópica por ressonância magnética nuclear de

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)2126-8888 E-mail: cepcos@ufpe.br

Comitê de Ética  
em Pesquisa  
Envolvendo  
Serres Humanos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 1.114.754

prótons (RMN <sup>1</sup>H). A extração de DNA serão obtidas através da punção venosa a vácuo, em tubos contendo EDTA, serão submetidas a extração de DNA utilizando-se o protocolo descrito no Blood GenomicPrep DNA Isolation kit. Para o estudo molecular serão analisados a expressão dos genes para as calpoptectinas (proteínas S100A8 e S100A9), marcadores bioquímicos de formação óssea (PICP e PINP) e marcadores ósseos de reabsorção (NTX-I e CTX-I). Nestes serão realizados o PCR em tempo real. Depois os dados obtidos serão avaliados estatisticamente.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador responsável, obedecendo a resolução nº 466/12 anexou:

- 1- Carta de anuência da Unidade PS Vila Roca, no Cabo de Santo Agostinho-PE;
- 2- Carta de anuência do Setor de patologia do LIKA;
- 3- Carta de Anuência da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental, autorizando o uso dos espectrômetros de ressonância magnética nuclear;
- 4- Folha de rosto, devidamente preenchida e assinada;
- 5- Autorização e Termo de confidencialidade dos dados coletados;
- 6- Os currículos dos pesquisadores envolvidos no projeto;
- 7- O TCLE para maiores de 18 anos, em linguagem clara para os participantes da pesquisa;
- 8- O cronograma encontra-se compatível com sua proposta.
- 9- No orçamento, os kits de análises moleculares e de extração de DNA serão disponibilizados pelo laboratório de Patologia do LIKA/UFPE e financiados pelo CNPq (Universal 14/2013 - 478571/2013-5).

#### Recomendações:

sem recomendações.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O pesquisador responsável atendeu as pendências solicitadas, estando o projeto adequado aos padrões éticos exigido pela Resolução Nº466/12, e poderá ser executado.

#### Situação do Parecer:

Aprovado

#### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)2126-8868

E-mail: ceps@ufpe.br

**Comitê de Ética  
em Pesquisa  
Envolvendo  
Serres Humanos**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CENTRO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-**



Continuação do Parecer: 1.114.754

**Considerações Finais a critério do CEP:**

As exigências foram atendidas e o protocolo está **APROVADO**, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a **APROVAÇÃO DEFINITIVA** do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (Item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (Item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

RECIFE, 19 de Junho de 2015

Assinado por:

**Gisele Cristina Sena da Silva Pinho**  
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-500

UF: PE Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

## ANEXO B – AUTORIZAÇÃO DE USO DOS DADOS



### UNIDADE PS VILA ROCA

Rua Escritor Israel Felipe, 31, Vila Roca, cabo de Santo Agostinho – PE  
CNS:20427

### AUTORIZAÇÃO DE USO DE DADOS

Declaramos para os devidos fins, que cederemos ao pesquisador **Tiago de Arruda Pontes**, o acesso aos dados de prontuário e de base de dados de pesquisa para serem utilizados na pesquisa **"ESTUDO METABONÔMICO DE PACIENTES PORTADORES DE OSTEORROPOSE"**, que está sob a orientação do Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior, professor do programa de pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde (LIKA/UFPE) e o Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva, professor do departamento de química fundamental (DQF/UFPE).

Esta autorização está condicionada ao cumprimento do pesquisador aos requisitos da Resolução 466/12 e sua complementares, comprometendo-se o mesmo a utilizar os dados pessoais dos sujeitos da pesquisa, exclusivamente para os fins científicos, mantendo o sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo as pessoas e/ou das comunidades.

Recife, 17 de novembro de 2014.

*R. Almeida*

Rosimeri Almeida  
Coordenadora da unidade  
Matrícula nº: 40080

*Rosimeri Almeida*  
Coord. Psq. da UPR

**ANEXO C – CARTA ANUÊNCIA PARA USO DO ESPECTRÔMETRO**

Av. Jornalista Aníbal Fernandes, s/n Cidade Universitária, Recife-PE  
CEP 50740-540 Fone (81) 2126.8440 Fax: (81) 2126.8442  
www.dqf.ufpe.br

**CARTA DE ANUÊNCIA**

Declaro para os devidos fins e a quem possa interessar que a Central Analítica do Departamento de Química Fundamental dispõe de dois espectrômetros de ressonância magnética nuclear, os quais serão utilizados na execução do projeto de pesquisa intitulado "ESTUDO METABONÔMICO DE PACIENTES PORTADORES DE OSTEOPOROSE", Sob supervisão do professor Ricardo Oliveira da Silva, que orientará o aluno Tiago de Arruda Pontes, CPF 067.437.294-85, (Doutorado – PPG Biologia Aplicada à Saúde LIKA/UFPE) no desenvolvimento do projeto supracitado.

Recife, 27 de Novembro de 2014.

Prof. Paulo Henrique Menezes  
Chefe de departamento de Química Fundamental - UFPE



**ANEXO D - CARTA ANUÊNCIA LIKA**

Universidade Federal de Pernambuco  
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

**CARTA DE ANUÊNCIA**

Declaramos para os devidos fins, que concordamos em apoiar o Projeto **“ESTUDO METABONÔMICO DE PACIENTES PORTADORES DE OSTEOPOROSE”** do Doutorando **TIAGO DE ARRUDA PONTES**, matriculado na Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde LIKA/UFPE. O referido projeto será orientado pelo Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior, facultando-lhe o uso das instalações e do Setor de Patologia deste referido Laboratório de Pesquisas da Universidade Federal de Pernambuco.

Recife, 27 de novembro de 2014

  
Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho  
Diretor do LIKA

Prof. José Luiz de Lima Filho  
Diretor  
LIKA / UFPE  
SIAPE-1133637



## ANEXO E – CARTA ANUÊNCIA PS VILA ROCA



### UNIDADE PS VILA ROCA

Rua Escritor Israel Felipe, 31, Vila Roca, cabo de Santo Agostinho –PE  
CNS:20427

### CARTA DE ANUÊNCIA

Declaramos para os devidos fins, que aceitaremos os pesquisadores Tiago de Arruda Pontes (Doutorando em Biologia Aplicada À Saúde – LIKA/UFPE), a desenvolver o seu projeto de pesquisa “ESTUDO METABONÔMICO DE PACIENTES PORTADORES DE OSTEORROPOSE”, que está sob a orientação do Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior (coordenador da pesquisa) cujo objetivo é criar um modelo metabonômico, capaz de identificar metabólitos presentes nos biofluidos que tenham valor preditivo para o diagnóstico de osteoporose.

A aceitação está condicionada ao cumprimento dos pesquisadores aos requisitos da Resolução 466/12 e suas complementares, comprometendo-se a utilizar os dados e materiais coletados, exclusivamente para os fins da pesquisa.

Recife, 17 de novembro de 2014.

Rosimeri Almeida  
Coord. Roca - Med. Nefro

*R. Almeida*

Rosimeri Almeida  
Coordenadora da unidade  
Matricula n°: 40080

**ANEXO F – CARTA RESPOSTA ACEITE ARTIGO.**

PONE-D-18-34693R2

Osteopenia-Osteoporosis Discrimination in Postmenopausal Women by  
<sup>1</sup>H NMR-based Metabonomics

Dear Dr. Pontes:

I am pleased to inform you that your manuscript has been deemed suitable for publication in PLOS ONE. Congratulations! Your manuscript is now with our production department.

If your institution or institutions have a press office, please notify them about your upcoming paper at this point, to enable them to help maximize its impact. If they will be preparing press materials for this manuscript, please inform our press team within the next 48 hours. Your manuscript will remain under strict press embargo until 2 pm Eastern Time on the date of publication. For more information please contact [onepress@plos.org](mailto:onepress@plos.org).

For any other questions or concerns, please email [plosone@plos.org](mailto:plosone@plos.org).

Thank you for submitting your work to PLOS ONE.

With kind regards,

PLOS ONE Editorial Office Staff  
on behalf of

Dr. Daniel Monleon  
Academic Editor  
PLOS ONE