UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da arquitetura óssea, da adiposidade da medula
óssea e dos lipídeos intramusculares no diabetes melito
tipo 2

Iana Mizumukai de Araújo

Ribeirão Preto
2019

IANA MIZUMUKAI DE ARAÚJO

Avaliação da arquitetura óssea, da adiposidade da medula óssea e dos
lipídeos intramusculares no diabetes melito tipo 2

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de Doutor
em Ciências

Área de concentração: Clínica Médica

Orientador: Prof. Dr. Francisco José
Albuquerque de Paula

Versão corrigida. A versão original
encontra-se disponível tanto na Biblioteca
da Unidade que aloja o Programa, quanto
na Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD).

Ribeirão Preto

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

de Araújo, Iana Mizumukai

Avaliação da arquitetura óssea, da adiposidade da medula óssea e dos lipídeos intramusculares no diabetes melito tipo 2, 2019.

115 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Médica
Orientador: de Paula, Francisco José Albuquerque.

1. Diabetes melito tipo 2. 2. Densitometria óssea. 3. Ressonância magnética. 4. Lipídeos intramusculares. 5. Adiposidade da medula óssea.

DE ARAÚJO, I. M. **Avaliação da arquitetura óssea, da adiposidade da medula óssea e dos lipídeos intramusculares no diabetes melito tipo 2.** 2019. 115f. Tese – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Aprovado em: _____ de _____ de 2019

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Agradecimentos

Agradeço a CAPES e a Fundação de Amparo a Pesquisa FAPESP (processo número: 2016/18574-1) pelo apoio financeiro.

Agradeço ao professor Francisco José Albuquerque de Paula pelos ensinamentos e seu apoio durante este percurso.

Agradeço ao professor Carlos Ernesto Garrido Salmon, peça fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à professora Rosa Maria R. Pereira e Valéria Caparbo pelo suporte e disponibilidade.

Agradeço à Marta Tocico Nakao Inouye Maibashi, muito obrigada por estar sempre disponível a ajudar. Sem seu apoio este trabalho não aconteceria. Agradeço também à Maria Yoshiko Matuyama e a Priscila Dias Pereira. Obrigada pelo carinho, amizade e paciência de vocês três.

Agradeço também todos os técnicos da Endocrinologia pelo suporte e amizade: Maria Fernanda Toste Brondi, José Roberto Silva, Wendy Turatti, Gabrielly Sarria e Renata Pugliese. Agradeço a Aline Turatti pelo apoio e amizade.

Agradeço os meus colegas de trabalho pelos dias de convivência e troca de conhecimento: Maria Augusta Alencar, Sérgio Luchini, Raissa Vieira, Beatriz Coimbra, Mariana Mascarenhas e em especial agradeço a Luciana Parreiras e Silva, que ao longo dos anos se tornou uma grande amiga.

Agradeço as técnicas da densitometria óssea, Rita, Karina e Rosário, pelo apoio e cuidado com os voluntários. Agradeço também todos os técnicos da ressonância magnética, em especial ao Rodrigo Pessini.

Agradeço imensamente meus pais, Vágner e Tomoco, pelo apoio, incentivo e carinho. Vocês são a base da minha formação e da minha vida.

Agradeço aos meus irmãos, Lara e Yuri, pois vocês enchem a minha vida de alegria. Isso me dá forças para continuar.

Agradeço ao Carlo Rondinoni, por toda ajuda, incentivo e companheirismo.

Agradeço imensamente a colaboração de todos os voluntários que se disponibilizaram para a realização desse projeto.

Resumo

DE ARAÚJO, I.M. **Avaliação da arquitetura óssea, da adiposidade da medula óssea e dos lipídeos intramusculares no diabetes melito tipo 2.** 2019. 115p. Tese Doutorado em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão.

O diabetes melito tipo 2 (DM2) é uma doença com alta prevalência e suas consequências vão além das doenças cardiovasculares. A fragilidade óssea foi recentemente incorporada à lista de suas complicações. Paradoxalmente, a massa óssea do DM2 é normal ou elevada quando comparada à da população normoglicêmica. Assim, torna-se necessário explorar outras ferramentas capazes de inferir parâmetros de qualidade óssea bem como de outros mecanismos que levam a fragilidade óssea no DM2. O objetivo do trabalho é caracterizar o fenótipo ósseo trabecular em pacientes com DM2 e avaliar a influência do tecido adiposo da medula óssea, do acúmulo de gordura muscular e da resistência à insulina sobre o tecido ósseo. Foram realizados exames de espectroscopia por ressonância magnética de coluna lombar, espectroscopia do músculo sóleo e imagem 3D por ressonância magnética na região proximal da tíbia para avaliação de osso trabecular. Exames de densitometria óssea foram realizados para quantificar a massa óssea e também a composição corporal dos indivíduos estudados. O escore trabecular ósseo (TBS) foi analisado na coluna lombar. Foram realizados exames bioquímicos para identificar alterações em potenciais moduladores da remodelação óssea originados em tecidos mesenquimais não mineralizados. Foram avaliados 3 grupos: controle, obeso e diabético tipo 2. Os resultados mostram que os indivíduos diabéticos não possuem prejuízo de quantidade de massa óssea, nem alterações na qualidade do trabeculado ósseo da tíbia proximal. Não foi observada alteração no tecido adiposo da medula óssea e não houve relação deste sítio de armazenamento de gordura com a massa óssea. Os resultados mostraram que a massa gorda e os lipídeos intramusculares tiveram relação negativa com o TBS e a massa magra mostrou relação positiva com a densidade mineral óssea. Possivelmente, este é o primeiro estudo na literatura em que se avaliou a estrutura óssea no diabetes melito tipo 2 por meio de ressonância magnética. Os dados reafirmam não haver alterações quantitativas ósseas nesta condição, indicando que a fragilidade óssea observada em estudos populacionais no DM2 se deve provavelmente a comprometimento da qualidade óssea. Este trabalho reforça que a resistência à insulina não tem efeito negativo sobre a massa óssea. O telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo 1 (CTX), a osteocalcina e a adiponectina parecem ter importante papel na determinação dos parâmetros do trabeculado ósseo.

Palavras-chave: diabetes melito tipo 2, densitometria óssea, ressonância magnética, lipídeos intramusculares, adiposidade da medula óssea.

Abstract

DE ARAÚJO, I.M. **Evaluation of bone architecture, bone marrow adipose tissue and intramuscular lipids in type 2 diabetes mellitus.** 2019. 114 p. Tese Doutorado em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão.

Type 2 diabetes is a high prevalence disease and its complications go beyond the cardiovascular diseases. Bone fragility was recently added to the list of the type 2 diabetes complications. Paradoxically, in type 2 diabetes, the bone mass is normal or elevated in comparison to the normoglycemic subjects. Thus, it is necessary to explore other tools to improve the bone evaluation in type 2 diabetes. The aim of this study was to characterize the trabecular bone phenotype in patients with type 2 diabetes and to evaluate the influence of bone marrow adipose tissue, accumulation of muscle fat and insulin resistance in bone mass. Lumbar spine and proximal tibia magnetic resonance spectroscopy was used to quantify bone marrow adipose tissue, 3D imaging by Magnetic Resonance of proximal tibia was used to quantify the trabeculae. Bone densitometry was performed to quantify the bone mineral density and also the body composition. Trabecular bone score (TBS) was measure in lumbar spine. Biochemical tests were carried out to evaluate the potential modulators of bone metabolism. Three groups were evaluated: control, obese and type 2 diabetic. The results show that diabetic individuals have no bone mass impairment and no alterations in the proximal tibia trabeculae. No alteration was observed in the the bone marrow adipose tissue of and there was no relationship of this site of fat storage with the mass. The results showed that fat mass and intramuscular lipids had a negative correlation with TBS, and lean mass showed a positive correlation with bone mineral density. As well as we know, this is the first study in the literature in which the bone structure in type 2 diabetes mellitus was evaluated by magnetic resonance imaging. These data reaffirm that there are no quantitative structural changes in bone in this condition, indicating that the bone fragility observed in DM2 populational studies is probably due to impairment in bone quality. CTX, osteocalcin and adiponectin seems to have an important role in determining in the trabeculae.

Key-words: type 2 diabetes, magnetic resonance, intramuscular lipids, bone marrow adipose tissue

Lista de Figuras

- Figura 1- Espectro obtido através de exame de ressonância magnética de hidrogênio, com processamento pelo software LCModel. As áreas sob a curva evidenciam quantidades de água e gordura na vértebra. A imagem no alto à esquerda mostra o voxel no centro do corpo 38
- Figura 2 - Espectro da medula óssea da tíbia obtido através de exame de ressonância magnética de hidrogênio, com processamento pelo software LCModel. As áreas sob a curva evidenciam quantidades de água (4,7ppm) e gordura (1,3; 2,0 e 5,3 ppm)..... 39
- Figura 3 - Espectro por ressonância magnética da panturrilha esquerda de um voluntário do sexo masculino do grupo controle. As áreas sob as curvas evidenciam as quantidades de lipídeos intramiócitos (IMCL) e extramiócitos (EMCL)..... 40
- Figura 4 - Espectro por ressonância magnética da panturrilha esquerda de um voluntário do sexo feminino do grupo DMT2. As áreas sob as curvas evidenciam as quantidades de lipídeos intramiócitos (IMCL) e extramiócitos (EMCL). 40
- Figura 5 - Correspondências entre aspectos da imagem do trabeculado ósseo e a distribuição dos valores de brilho na imagem. a. Comparação entre imagens do trabeculado ósseo de um indivíduo saudável (à esquerda) e um indivíduo com osteoporose (à direita). As regiões marcadas tiveram seus valores de brilho selecionados para elaboração do histograma. b. Histograma da escala de cinza. Em preto o histograma do indivíduo controle e em vermelho o histograma do indivíduo com osteoporose. A linha azul representa o valor médio de brilho na região do osso cortical. 42
- Figura 6 - A: Imagem obtida por ressonância magnética de trabeculado ósseo. Neste local é selecionado o volume de interesse. B. Imagem binarizada. C: reconstrução do volume selecionado. 43
- Figura 7 - Densidade mineral óssea (DMO) da coluna lombar (DMO L1-L4) do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2). 49
- Figura 8 – Densidade mineral óssea (DMO) do colo do fêmur do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2)..... 50
- Figura 9 – Densidade mineral óssea (DMO) do fêmur total do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2)..... 51
- Figura 10 – Densidade mineral óssea (DMO) de 1/3 do rádio do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2)..... 52
- Figura 11 – Escore trabecular ósseo (TBS) do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2)..... 53

Figura 12 – Adiposidade da medula óssea (TAMO) da tíbia proximal saturada do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2).	54
Figura 13 – Razão entre os lipídeos intra e extramioelulares do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2).	55
Figura 14 – Conectividade do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2).	56
Figura 15 – Densidade de conectividade (conn.D) do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2).	57
Figura 16 – Volume ósseo dividido por volume total (BV/TV) do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2).	58
Figura 17 – Espessura trabecular (Tb.Th) do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2).	59
Figura 18 – Espaçamento entre as trabéculas (Tb.Sp) do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2).	60
Figura 19 – Gráfico de dispersão entre a espessura média das trabéculas (Tb.Th) e o índice de massa magra.	62
Figura 20 – Gráfico de dispersão entre a densidade mineral óssea da coluna lombar (DMO L1-L4) e o escore trabecular ósseo da coluna lombar (TBS L1-L4).	64
Figura 21 – Gráfico de dispersão entre a espessura média das trabéculas (Tb.Th) e a razão entre os lipídeos intra e extramioelulares (IMCL/EMCL).	67
Figura 22 – A. Gráfico de dispersão entre densidade mineral óssea de coluna lombar (DMO L1-L4) e CTX. B. Gráfico de dispersão entre densidade mineral óssea de colo do fêmur (DMO CF) e CTX. C. Gráfico de dispersão entre densidade mineral óssea do fêmur total (DMO CT) e CTX.	69
Figura 23 – A. Gráfico de dispersão entre densidade mineral óssea de coluna lombar (DMO L1-L4) e adiponectina. B. Gráfico de dispersão entre densidade mineral óssea de colo do fêmur (DMO CF) e adiponectina. C. Gráfico de dispersão entre densidade mineral óssea do fêmur total (DMO CT) e adiponectina.	70
Figura 24 – Gráfico de dispersão entre A. conectividade e CTX. B. volume ósseo dividido por volume total (BV/TV) e CTX. C. separação entre as trabéculas (Tb.Sp) e CTX.	72

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Caracterização dos grupos.....	45
Tabela 2 - Distribuição do sexo entre os grupos	45
Tabela 3 - Descrição e comparação dos resultados dos exames bioquímicos nos grupos avaliados	46
Tabela 4 - Resultados de densitometria óssea	48
Tabela 5 - Resultados da espectroscopia na vértebra lombar (L3) e tíbia esquerda e espectroscopia do músculo sóleo.....	54
Tabela 6 - Resultados da sequência FLASH da ressonância magnética	56
Tabela 7 – Correlação dos parâmetros de composição corporal e da hemoglobina glicada com a densidade mineral óssea dos sítios avaliados	61
Tabela 8 – Correlação entre porcentagem de gordura corporal e índice de massa magra com parâmetros do trabeculado ósseo	62
Tabela 9 – Correlação entre a densidade mineral óssea e os parâmetros do trabeculado ósseo	63
Tabela 10 - Correlação entre a densidade mineral óssea da coluna lombar e do fêmur total e o TBS	64
Tabela 11 – Correlação entre TBS e BV/TV, lipídeos intramusculares, hemoglobina glicada, triglicerídeos séricos e HOMA-IR	65
Tabela 12 – Correlação entre DMO dos sítios avaliados com HOMA-IR, insulina sérica e lipídeos intramusculares	66
Tabela 13 – Correlação entre os parâmetros do trabeculado ósseo e o HOMA-IR.....	66
Tabela 14 – Correlação entre o tecido adiposo da medula óssea com a idade e o TBS .	67
Tabela 15 – Correlação entre a densidade mineral óssea dos sítios avaliados com osteocalcina, CTX e adiponectina	68
Tabela 16 – Correlação entre os parâmetros do trabeculado ósseo com o CTX	71
Tabela 17 – Correlação entre a razão de lipídeos intra com extramio celular com a adiponectina, osteocalcina e CTX	71

Lista de Abreviaturas e Siglas

1/3 do rádio	1/3 distal do antebraço
AGEs	produtos de glicação avançada
AMOINSATL3	Adiposidade da medula óssea da vértebra L3 insaturada
AMOINSATtib	Adiposidade da medula óssea insaturada da tíbia
AMOSATL3	Adiposidade da medula óssea da vértebra L3 saturada
AMOSATtib	Adiposidade da medula óssea saturada da tíbia
AMOT L3	Adiposidade da medula óssea da vértebra L3 total
AMOTtib	Adiposidade da medula óssea da tíbia total
ANOVA	Análises de variância simples
BV	Volume ósseo
C	Grupo Controle
CF	Colo do fêmur
Conn.D	Densidade de conectividade
CTX	Telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo 1
DM2	Diabetes melito tipo 2
DMO	Densidade mineral óssea
DXA	Densitometria óssea
EMCL	Lipídeos extramioelulares
FT	Fêmur total
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	HDL Lipoproteína de alta densidade
HOMA-IR	Índice de resistência insulínica
IMCL	Lipídeos intramioelulares
Kg	Quilogramas
L	Litros
L1-L4	Coluna lombar
L3	Terceira vértebra da coluna lombar
L3	Vértebra lombar número 3
LDL	Lipoproteína de baixa densidade

LIH	Lipídeos intrahepáticos
m	Metros
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetros
O	Grupo obeso
ppm	Partes por milhão
PTH	Paratormônio
RM	Ressonância magnética
SAF	método de mensuração de AGE por autofluorescência de pele
TAMO	Tecido adiposo da medula óssea
Tb.Sp	Espaçamento entre as trabéculas
Tb.Th	Espessura da trabécula
TBS	Escore trabecular ósseo
TGO	Transaminase glutâmica oxalacética
TGP	Transaminase glutâmica pirúvica
TR	Tempo de repetição
TV	Volume total
VAT	Tecido adiposo visceral

Sumário

Introdução	14
Avaliação óssea	15
Mecanismos da doença óssea no diabetes melito tipo 2.....	18
Tecido adiposo da medula óssea e massa óssea	20
Tecido muscular e tecido ósseo	25
Justificativa	30
Objetivo geral	31
Objetivos específicos.....	32
Casuística e métodos	33
Seleção dos voluntários	33
Critérios de inclusão e exclusão	33
Exames.....	35
Bioquímicos.....	35
Densitometria óssea.....	35
Ressonância magnética.....	36
Coluna lombar	36
Espectroscopia da tíbia esquerda.....	38
Panturrilha esquerda – gordura do músculo sóleo.....	39
Micro-ressonância do trabeculado ósseo	41
Aquisição da imagem	41
Protocolo de processamento no 3D Slicer	41
Análises das imagens.....	42
Análise estatística	43
Resultados.....	45
Discussão	73
Conclusão	90
Referências	91
Anexos	103
Apêndices	113

Introdução

A síndrome metabólica é um transtorno complexo que tem como características a obesidade central, hipertensão arterial, graus variáveis de intolerância à glicose e dislipidemia. Essas características culminam em aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, câncer e diabetes melito tipo 2 (DM2). A maior parte das pessoas com síndrome metabólica é obesa e apresenta principalmente acúmulo de gordura visceral (Danforth, 2000; Semple, 2016). Embora a obesidade reflita a grande capacidade do adipócito em armazenar gordura, esta capacidade não é ilimitada. Uma vez ultrapassado o limite de estoque, ocorre redistribuição de lipídios para outros sítios (Tsatsoulis *et al.*, 2013). Em consequência, observa-se deposição ectópica de gordura em outros sítios como o fígado e músculos. O aumento de gordura nestes locais produz lipotoxicidade e inflamação, levando a alterações funcionais e estruturais e culminando em doenças como DM2 e esteatoepatite (Samuel *et al.*, 2010).

O diabetes melito é uma doença metabólica heterogênea que exhibe alterações do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas como também ocorrem alterações nos tecidos envolvidos, o muscular, o adiposo e o hepático. No DM2 ocorre uma combinação de resistência à insulina e prejuízo de secreção hormonal, gerando diversas alterações metabólicas, das quais a hiperglicemia é a sua marca principal. Mais importante, o ambiente metabólico e hormonal presentes no DM2 criam condições para o surgimento de alterações micro e macrovasculares que são cruciais para o surgimento das temidas complicações crônicas associadas a esta doença metabólica. O DM2 é uma das doenças mais prevalentes no mundo e suas complicações geram aumento de morbidade e mortalidade, tendo grande impacto em saúde pública. A neuropatia, retinopatia e nefropatia são consequências bem

conhecidas do DM2. Recentemente, a fragilidade óssea foi incorporada a esta gama de complicações ligadas ao DM2.

Avaliação óssea

Até recentemente, o DM2 era considerado uma condição não associada à fragilidade óssea; ao contrário prevalecia a impressão de ser protetor quanto a fraturas. Esta imagem equivocada se devia, em grande parte, à constatação que no DM2 a densidade mineral óssea é em geral igual ou maior que a de indivíduos não diabéticos. Posteriormente, estudos prospectivos mostraram claramente que apesar de não trazer prejuízo específico para massa óssea, o DM2 se associa ao maior risco de fratura (Schwartz *et al.*, 2001; Vestergaard *et al.*, 2005). O estudo Rotterdam avaliou a massa óssea de 792 pessoas divididas em grupo controle e grupo com DM2. Os resultados foram claros em relação à maior massa óssea do grupo DM2 comparada com a do grupo controle. Porém, estes mesmos indivíduos foram seguidos por 6,8 anos e verificou-se que o grupo com DM2, independentemente do sexo, teve maior frequência de fraturas do que o grupo controle. (De Liefde *et al.*, 2005). Em concordância, Janghorbani *et al.* (2007) mostraram que indivíduos com DM2 têm de duas a três vezes mais chances de fraturar o quadril (Janghorbani *et al.*, 2007). Assim, pode-se concluir que o exame de densitometria sozinho não é capaz de identificar o risco de fraturas em no DM2. Este tema tem despertado intenso interesse nos últimos anos, diversos grupos têm se dedicado ao estudo dos mecanismos envolvidos, na avaliação diagnóstica bem como na forma mais apropriada de sua abordagem terapêutica que ocorre na fragilidade óssea associada ao DM2. Apesar dos avanços obtidos, o maior risco de fratura permanece como um verdadeiro desafio, persistindo diversas e importantes questões ainda por ser respondidas.

Os avanços dos exames de imagem permitiram o estudo da microarquitetura óssea *in vivo*, de forma não invasiva. A tomografia computadorizada de alta resolução e a ressonância magnética são ferramentas capazes de detalhar quantitativamente parâmetros da cortical e do trabeculado ósseo. Stein *et al.* (2010) avaliaram 169 mulheres, sendo 68 com história de fratura por fragilidade óssea na pós-menopausa (Stein *et al.*, 2010). Os valores de densidade mineral óssea dos sítios avaliados (coluna lombar, fêmur total, colo do fêmur, 1/3 do rádio) eram semelhantes, exceto no rádio ultradistal onde o grupo de mulheres com fratura tiveram medidas menores do que o grupo sem fraturas. Porém, o exame de HR-pQCT mostrou que há deterioração da microarquitetura óssea nas mulheres com fratura (Stein *et al.*, 2010) Furst *et al.* (2016) também avaliaram indivíduos diabéticos e compararam seus resultados com um grupo de indivíduos saudáveis (Furst *et al.*, 2016). Os resultados obtidos por HRpQCT revelaram que a fração de volume ósseo trabecular e a resistência óssea estimada foram maiores no rádio, mas não na tíbia de indivíduos com DM2, enquanto a espessura trabecular foi maior nos dois locais em pacientes com DM2. Os resultados da microidentação confirmaram que a resistência do tecido ósseo está comprometida em diabéticos tipo 2. Já Patsch *et al.* (2013) avaliaram a cortical de quatro grupos de mulheres: controles, mulheres com fraturas, indivíduos com DM2 e com DM2 e fraturas (Patsch, Burghardt, *et al.*, 2013). Os autores observaram que indivíduos com diabetes tipo 2 com fratura por fragilidade apresentaram porosidade cortical maior do que diabéticos sem fraturas. Porém, estes autores não encontraram associação entre a porosidade cortical e fraturas em mulheres não diabéticas. Justesen *et al.* (2001) não encontraram diferença entre os grupos quando se avaliou parâmetros do osso trabecular (Justesen *et al.*, 2001). Desta maneira, conclui-se que os dados sobre os parâmetros da microarquitetura óssea em indivíduos diabéticos ainda são controversos e desta forma, torna-se necessário mais estudos para elucidar estes parâmetros tão importantes relacionados a qualidade óssea nestes indivíduos.

Majumdar *et al.* estudaram a viabilidade de se mensurar o trabeculado ósseo por ressonância magnética (Majumdar e Genant, 1997) (Majumdar *et al.*, 1997). Assim, tornou-se possível avaliar a microestrutura óssea de forma não invasiva e livre de radiação ionizante. Krug *et al.* (2008) compararam as imagens obtidas por ressonância magnética de 3T e 7T com HR-pQCT (Krug *et al.*, 2008). Segundo seus dados, é possível mensurar os parâmetros do trabeculado ósseo por ressonância magnética e esta técnica é comparável ao HR-pQCT. Ainda não existem dados na literatura sobre a avaliação da microarquitetura óssea por ressonância magnética em indivíduos diabéticos. A vantagem do exame de ressonância magnética é que em uma única máquina, pode-se avaliar tanto a microestrutura óssea, como outros parâmetros relacionados com a qualidade óssea, como a TAMO.

A busca de alternativas para o aprimoramento da avaliação do risco de fratura levou ao desenvolvimento do score trabecular ósseo (TBS). O TBS é uma ferramenta acoplada ao aparelho de densitometria óssea destinada a avaliação indireta da microarquitetura trabecular derivada de imagens de densitometria óssea da coluna lombar. Ele fornece informações sobre a qualidade do osso com base nas variações do nível de cinza dos pixels na imagem. O TBS reflete características ósseas, como o número de trabéculas, a separação entre trabéculas e a densidade de conectividade (Hans, Goertzen, *et al.*, 2011). Dhaliwal *et al.* (2014) avaliaram a qualidade óssea por TBS. Seus dados salientaram que o TBS está diminuído em indivíduos diabéticos e o TBS, entre os indivíduos diabéticos, foi maior naqueles indivíduos com melhor controle glicêmico (Dhaliwal *et al.*, 2014). O reconhecimento que o TBS é capaz de capturar dados de comprometimento ósseo no DM2 veio recentemente quando um grupo de especialistas sugeriu que a incorporação do TBS ao algoritmo de análise de probabilidade de fratura, o FRAX, refina a análise de risco de fraturas no DM2 (Hans *et al.*, 2017).

O DM2 é uma doença multifatorial, capaz de gerar diversas alterações patológicas no organismo. Elucidar os parâmetros relacionados com a fragilidade óssea nesta condição é de

extrema importância para prever o risco de fraturas, a fim de atenuar as graves consequências geradas pelas fraturas.

Mecanismos da doença óssea no diabetes melito tipo 2

Vários mecanismos podem contribuir para o aumento do risco de fraturas em indivíduos com DM2, incluindo maior risco de queda, déficits na microarquitetura óssea e diminuição da qualidade óssea. O risco de quedas está relacionado com episódios de hipoglicemia, bem como com a diminuição do equilíbrio devido a neuropatia diabética e comprometimento da função muscular. Em estudo recente, Napoli *et al.* avaliaram especificamente estes aspectos e observaram que o maior risco de fraturas permanece mesmo após ajuste pelo risco de quedas. Estes dados indicam que para além do risco de queda existe o comprometimento da qualidade óssea que levam a suscetibilidade à fratura no DM2 (Napoli *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, vários estudos têm se dedicado à investigação das disfunções que podem estar relacionadas com a diminuição da qualidade óssea. Uma marca da doença óssea no DM2 é a diminuição da formação óssea, traduzida bioquimicamente por redução de osteocalcina sérica. A osteocalcina vem sendo largamente estudada, pois ela é nitidamente um dos elementos chave da relação entre o metabolismo energético e ósseo. A osteocalcina é secretada pelos osteoblastos e existe na circulação em duas formas, a osteocalcina carboxilada e a descarboxilada. A osteocalcina é considerada um marcador bioquímico de remodelação óssea e está envolvida em vários processos fisiológicos, como a manutenção da mineralização óssea normal e desaceleração da mineralização da cartilagem de crescimento. Porém, sua função no organismo é mais abrangente indo muito além da ação local no tecido ósseo. O meio ácido necessário para que ocorra o processo de reabsorção óssea leva a descarboxilação

de osteocalcina. Diversas evidências indicam que em sua forma descarboxilada, ela participa na regulação do metabolismo de glicose, favorecendo a proliferação de células beta, regulando a secreção de insulina e também a sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos (Confavreux *et al.*, 2009; De Paula *et al.*, 2010; Ducy, 2011). Lee *et al.* mostraram que o silenciamento do gene da osteocalcina em camundongos leva a aumento da adiposidade, redução da sensibilidade à insulina periférica e diminuição da tolerância à glicose. Além disso, os animais apresentaram redução do gasto energético, contribuindo para o aumento da adiposidade (Lee *et al.*, 2007).

Em trabalho recente não só foi constatado o prejuízo de produção de osteocalcina como também se verificou que os níveis séricos de osteocalcina se associam negativamente com a massa óssea. Estes dados sugerem que a baixa atividade de remodelação óssea é um fator determinante de manutenção da massa óssea no DM2 (De Araujo *et al.*, 2017). Estes dados se repetem na literatura. Liang *et al.* mostraram indivíduos diabéticos têm osteocalcina reduzida quando comparados com grupo controle e também os níveis séricos de osteocalcina se associaram negativamente com níveis séricos de glicose, insulina e HOMA-IR (Liang *et al.*, 2016).

Outro fator largamente estudado é a geração de produtos de glicação avançada (AGEs) no diabetes. O acúmulo de AGEs no osso, possivelmente, diminui a elasticidade óssea por modificação estrutural do colágeno, alterando as propriedades biomecânicas ósseas (Saito e Marumo, 2015). Os métodos para a quantificação dos AGEs baseiam-se em fluorescência, sendo, portanto, necessária uma amostra do osso. Estudos *in vitro* indicam que os AGEs diminuem atividade de osteoblastos, pois prejudicam a sua adesão à matriz de colágeno (McCarthy *et al.*, 2004), podendo inibir a proliferação e diferenciação de osteoblastos (Kume *et al.*, 2005). Outros estudos também *in vitro* demonstraram que os AGEs podem afetar o comportamento dos osteoclastos. Porém, estes dados ainda são inconsistentes. Karim *et al.*

(2012) encontraram grandes quantidades de AGEs em regiões ósseas com microdanos (Karim e Vashishth, 2012). Furst *et al.* (2010) avaliaram os níveis de AGE pelo método de autofluorescência de pele (Collaborators *et al.*) e encontraram maiores níveis de AGE em indivíduos com DM2. Os níveis de AGEs mensurados por SAF tiveram uma correlação inversa com o P1NP, marcador de remodelação óssea. Também foi descrita uma correlação inversa entre a resistência óssea medida por microidentação e o acúmulo de AGEs. Essa última correlação foi específica do grupo diabético. Os autores concluem que estes dados podem ajudar a definir um mecanismo bioquímico que poderia explicar o aumento independente da DMO na fragilidade óssea observada em pacientes com DM2 (Furst *et al.*, 2016). O acúmulo de AGEs parece estar associado ao aumento do conteúdo de microdanos, mas ainda são necessárias mais estudos para elucidar a relevância deste acúmulo de microdanos para a fragilidade esquelética.

O tecido adiposo da medula óssea (TAMO) é outro parâmetro que vem ganhando destaque em pesquisa de mecanismos de surgimento de fragilidade óssea. A ressonância magnética é o melhor método não invasivo para a mensuração do TAMO. Nos últimos anos, vários trabalhos vêm explorando o papel do TAMO não só em indivíduos com diabetes melito tipo 2, como também em outras doenças como anorexia nervosa, obesidade, diabetes melito tipo 1, doença de Cushing, síndrome do intestino curto e doença inflamatória intestinal, além de indivíduos normais. Muitos trabalhos ressaltam que o TAMO tem correlação negativa com a massa óssea em diversas doenças.

Tecido adiposo da medula óssea e massa óssea

Com o aprimoramento das técnicas de imagem, tornou-se possível acessar de modo não invasivo o tecido adiposo da medula óssea. A ressonância magnética permite acessar o

TAMO principalmente por meio da técnica de espectroscopia. O tecido adiposo da medula óssea era reconhecido meramente como um tecido de preenchimento, substituindo o tecido hematopoiético ao longo do envelhecimento. Mas isto mudou, o papel que o TAMO exerce sobre o tecido ósseo passou a ser largamente explorado nos últimos anos e representa hoje uma importante linha de investigação sobre a etiopatogenia da osteoporose. Existe uma quantidade expressiva de tecido adiposo da medula óssea no organismo. Ele constitui cerca de 10% do total de tecido adiposo de um indivíduo saudável.

Em algumas situações, pode ocorrer acúmulo de adiposidade da medula óssea, e ela pode ter relação negativa com a massa óssea, isto ocorre, por exemplo, na anorexia nervosa e na osteoporose em idosos (Rosen e Bouxsein, 2006; Patsch *et al.*, Li *et al.* 2013; Bredella, Fazeli *et al.* 2014, de Paula 2018). Entretanto, este tema ainda é pouco explorado e é possível que a adiposidade da medula óssea, assim como outros subtipos de tecido adiposo, possa ter influência positiva ou negativa a depender das circunstâncias.

O tecido adiposo da medula óssea desenvolve-se após o nascimento e seu estoque aumenta durante o processo de envelhecimento (Fazeli *et al.*, 2012). É possível que na infância, o tecido adiposo da medula óssea tenha importante papel de prover energia para a modelação óssea (Kawai e Rosen, 2010). Por volta da terceira década de vida, a adiposidade da medula óssea ocupa de 50 a 70% do total do volume da medula óssea (Hindorf *et al.*, 2010). Já na oitava e nona décadas de vida, em torno de 90% da medula óssea é constituída por gordura (Hardouin *et al.*, 2014). Como parte do processo de envelhecimento é possível que a relação entre formação óssea e adipogênese seja modificada, passando a última a ter a influência negativa sobre a primeira. A relação entre o tecido adiposo da medula e a massa óssea é complexa e possivelmente depende da condição do indivíduo e da quantidade de lipídeo estocado (Reid, 2010; Campos *et al.*, 2012). Em diversas condições associadas à osteoporose como a senilidade, anorexia nervosa, uso crônico de glicocorticóides, menopausa e

imobilidade, o aumento da adiposidade da medula óssea esta associada a fragilidade óssea (Rosen e Bouxsein, 2006; Bredella *et al.*, 2015). Pierre Menieur (1971) foi o primeiro pesquisador a descrever a relação entre a adiposidade da medula óssea com idade e osso trabecular (Meunier *et al.*, 1971).

O avanço obtido no conhecimento o papel do TAMO sobre o desenvolvimento e a manutenção da massa óssea ainda é parcial e multifacetado. Osteoblastos e adipócitos se originam de uma mesma célula tronco mesenquimal. Assim, o aumento da diferenciação no sentido de uma célula pode ocorrer em detrimento da outra. Durante o processo de envelhecimento pode ocorrer aumento da expressão de PPAR γ nas células tronco mesenquimais da medula óssea, favorecendo a adipogênese. Este fato está de acordo com Kugel *et al.* (2001), que mostraram que a adiposidade da medula óssea aumenta com a idade em ambos os sexos. (Kugel *et al.*, 2001). Manolagas *et al.* propõem que a osteoblastogênese é afetada de forma negativa pelo aumento da adiposidade de medula, pois este processo está relacionado com o aumento do estresse oxidativo (Manolagas e Almeida, 2007). Além disso, a secreção de citocinas inflamatórias pelo tecido adiposo pode promover o recrutamento de osteoclastos, podendo levar a perda de massa óssea (Jilka *et al.*, 2007). Desta maneira, surgiram indícios que a adipogênese da medula óssea pode influenciar a microarquitetura óssea e consequentemente a resistência óssea (Nuttall e Gimble, 2000). Assim, surgiu o interesse de se estudar o papel da adiposidade da medula óssea sobre a massa óssea em diversas condições, e entre elas o diabetes melito tipo 2.

Apesar de representar um sítio de depósito de gordura, o TAMO possui características diferentes do tecido adiposo branco e do tecido adiposo marrom. O tecido adiposo branco armazena o excesso de energia, o qual, quando necessário, serve de fonte para a geração de ácidos graxos e glicerol. O tecido adiposo marrom expressa proteínas termogênicas, a proteína desacopladora 1, permitindo a dissipação de energia através da produção de calor. Já

o tecido adiposo da medula óssea não se correlaciona com peso ou índice de massa corporal (Justesen *et al.*, 2001), nem expressa grandes quantidades de proteínas termogênicas. Histologicamente, o tecido adiposo da medula óssea contém um grande vacúolo de triglicerídeos formado por ácidos graxos que podem ser saturados, mono ou poli-insaturados (Griffith *et al.*, 2009). Assim, o TAMO é por muitos autores considerado como um subtipo de tecido adiposo, intermediário entre o branco e o marrom, pois apresenta características distintas deles. Devido a sua localização, o tecido adiposo da medula óssea encontra-se em posição privilegiada para interagir com as células que compõem o rico microambiente ósseo, em particular as de linhagens osteoblásticas e osteoclásticas.

Existem 2 subtipos conhecidos de tecido adiposo da medula óssea, o regulado e o constitutivo. O TAMO regulado é encontrado nas regiões mais proximais, como a tíbia proximal, fêmur e coluna lombar. Ele pode se adaptar em resposta a um estímulo fisiológico, como por exemplo, se expandir em situações de restrição calórica. Já o TAMO constitutivo se encontra nas porções distais dos ossos longos, como na tíbia distal e vértebras sacrais, sendo caracterizado como um grupo denso de células de gordura similares ao tecido adiposo branco (Scheller *et al.*, 2015). Os dois tipos de TAMO são distintos tanto anatomicamente quando em suas respostas aos estímulos. O TAMO constitutivo aparece logo no período pós-natal, não se altera frente a estímulos e nem frente a mudanças patofisiológicas, como anorexia, por exemplo. O TAMO regulado se desenvolve após o constitutivo, fica localizado entre as células hematopoiéticas e sofre alterações mediante estímulos e condições, como idade, peso, temperatura e fatores endócrinos (Scheller *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018; Scheller *et al.*, 2019). Scheller *et al.* (2019) mostraram recentemente que o tecido adiposo da medula óssea constitutivo é mais resistente a estímulos lipolíticos (Scheller *et al.*, 2019).

Muitos trabalhos mostraram relação inversa entre quantidade de TAMO e massa óssea, bem como relação positiva entre tecido adiposo da medula óssea e idade. Trabalho recente

avaliou homens e mulheres saudáveis e não obesos. Mesmo nesta população, encontrou-se correlação negativa entre massa óssea e TAMO e o contrário, positiva entre idade e TAMO (Maciel *et al.*, 2017).

Estudos com pacientes com anorexia nervosa tiveram atenção devido a alguns resultados paradoxais em relação ao acúmulo de gordura corporal. A anorexia nervosa é uma condição psiquiátrica onde o indivíduo se auto-impõe o jejum prolongado, provocando marcante perda de peso, bem como alterações hormonais e metabólicas. O fato curioso nesta doença ocorre devido ao contraste entre os nichos de deposição de gordura. Enquanto há diminuição do tecido adiposo branco, ocorre o aumento de TAMO e ele se correlaciona negativamente com a massa óssea (Bredella *et al.*, 2009). Ou seja, a expansão do tecido adiposo da medula óssea é adaptativamente diferente a mudanças nutricionais em relação a outros subtipos de tecido adiposo (Fazeli *et al.*, 2012). Parreiras-e-Silva explorou outra doença também relacionada à intensa perda de peso, a Síndrome do Intestino Curto. Após a cirurgia de ressecção do intestino, o estado disabsortivo faz com que os indivíduos percam peso mesmo com tratamento nutricional. Nesta condição, a adiposidade da medula óssea não se altera, mas observa-se relação positiva deste parâmetro com a massa óssea, ao contrário com o que ocorre na anorexia nervosa. Assim, surge a hipótese de que o acesso a calorias que ocorre na síndrome do intestino curto pode modular o a adipogênese da medula óssea.

Estudos da adiposidade da medula óssea em diabetes melito tipo 2, situação nutricionalmente contrária às anteriores, ainda são controversos. Patsch *et al.* (2013) mostraram que indivíduos diabéticos com fraturas possuem adiposidade da medula óssea mais elevada quando comparados com um grupo controle (Patsch, Li, *et al.*, 2013). Em contrapartida, trabalho recente avaliou 78 indivíduos divididos em grupos controle, obeso e diabético. A adiposidade da medula óssea foi similar entre os grupos e houve uma tendência de associação negativa entre massa óssea da coluna lombar e a adiposidade da medula óssea

(De Araujo *et al.*, 2017). Estes dados controversos estimulam mais estudos da relação da adiposidade da medula óssea e a massa óssea em indivíduos diabéticos.

É possível mensurar não só a quantidade de tecido adiposo da medula óssea, como também a sua composição lipídica. Maciel (2017) *et al.* mostraram que mulheres e homens com massas ósseas semelhantes, as mulheres apresentam maiores quantidades de lipídeos insaturados na medula óssea que homens (Maciel *et al.*, 2017). Patsch *et al.* mostraram que indivíduos diabéticos com fratura possuem quantidades menores de lipídeos insaturados e maiores de lipídeos saturados na medula óssea (Patsch *et al.*, 2013). O mesmo ocorre em indivíduos com osteoporose (Yeung *et al.*, 2005). Estes dados sugerem que os lipídeos saturados podem estar relacionados com a fragilidade óssea, enquanto os insaturados parecem estar associados a maior resistência óssea.

O tecido adiposo da medula óssea também funciona como órgão secretor. Cawthorn *et al.* (2014) estudaram mulheres com anorexia nervosa. Nesta condição, há o aumento da adiposidade da medula óssea (Cawthorn *et al.*, 2014). Atrelado a isto, os autores verificaram que ocorre o aumento da secreção de adiponectina, umas das moléculas responsáveis pela regulação do metabolismo energético. Esta molécula é responsável pelo aumento da sensibilidade a insulina e também na regulação de sua secreção.

Desta maneira, o tecido adiposo da medula óssea não só pode ter papel local, na modulação do microambiente ósseo, como também pode ter efeito na modulação metabólica sistêmica. Este tecido parece se comportar diferentemente nas diversas condições do organismo. Dados mais claros sobre o comportamento do TAMO poderiam ajudar os critérios diagnósticos ou prognósticos.

Tecido muscular e tecido ósseo

O tecido muscular esquelético tem influência positiva sobre a formação óssea e existem dados que sugerem que a hipertrofia muscular reduz risco de fraturas (Kaji 2013). Em grande parte, este efeito se deve a ação mecânica de contração muscular. Além disso, o tecido muscular também tem função endócrina, participando não só da modulação do metabolismo energético, mas também do ósseo. Miocinas como a miostatina e a irisina são moléculas que provavelmente estão envolvidas nestes processos. O aumento da miostatina suprime o aumento da massa muscular e pode promover o acúmulo de gordura corporal (Hamrick *et al.*, 2002). Brandt *et al.* mostraram que a miostatina circulante está aumentada em indivíduos diabéticos e que a miostatina também se correlacionou positivamente com o HOMA-IR (Brandt *et al.*, 2012). A irisina sérica aumenta principalmente após o exercício físico. Porém, ela também pode ser secretada pelo tecido adiposo. Em ratos com dieta que induz à obesidade, foi encontrado um aumento de secreção de irisina pelo tecido adiposo branco. Este pode ser um mecanismo adaptativo para a prevenção das morbidades consequentes da obesidade. Adicionalmente, estudos experimentais mostram que animais tratados com irisina recombinante apresentam melhora em parâmetros ósseos, como aumento da cortical óssea, geometria e resistência óssea (Colaïanni e Grano, 2015).

A hipertrofia muscular pode ter efeito benéfico para o organismo, assim como a perda de massa muscular e sua disfunção podem ter efeitos deletérios. A sarcopenia, caracterizada por perda de massa e diminuição da força muscular, ocorre principalmente no envelhecimento, mas pode também ocorrer em diversas situações. Ela é multifatorial, mas ocorre principalmente devido a má nutrição, sedentarismo e envelhecimento. O diabetes e a perda de massa muscular possuem algumas origens em comum, como o sedentarismo e a diminuição de hormônios anabólicos, como o IGF1, testosterona e grelina (Landi *et al.*, 2013). Também contribui para a disfunção muscular a diminuição do fluxo sanguíneo para as células musculares devido a falhas na microcirculação dos diabéticos. Park *et al.* (2006)

mostraram que idosos com diabetes melito tipo 2 tiveram um declínio 30% maior de força muscular nas pernas em comparação com indivíduos saudáveis pareados por idade, podendo o acúmulo de gordura muscular contribuir para a perda de força muscular. O acúmulo ectópico de gordura no músculo descrito por Tsatoulis em 2013 pode gerar doenças crônicas como dislipidemia, hipertensão e resistência à insulina (Tsatsoulis et al 2013). A resistência à insulina muscular é um evento chave e pode ser detectado muito tempo antes do diagnóstico do DM2 (DeFronzo, 2009). A resistência à insulina está relacionada a danos no tecido muscular. A hiperglicemia leva a aumento da concentração de ácidos graxos circulantes e também de citocinas inflamatórias. Existem hipóteses de que a inflamação muscular pode levar a proteólise com degradação de microfilamentos, que ocorre devido a ativação da caspase 3 (Lee *et al.*, 2004). A capacidade oxidativa mitocondrial do músculo é frequentemente prejudicada, causando uma redução na atividade de oxidação de gordura. Como consequência, esta disfunção mitocondrial muscular leva ao acúmulo de lipídeos intramiocelulares (DeFronzo, 2009). Desta maneira, existe relação do acúmulo de lipídeos intramusculares no metabolismo energético, gerando resistência à insulina. Mas ainda não há dados na literatura que elucidem a relação do acúmulo de lipídeos intramusculares e o tecido ósseo.

Os aspectos descritos acima indicam que o tecido ósseo pode sofrer influência do DM2. Por outro lado, resultados de trabalhos com modelos experimentais têm indicado que o tecido ósseo pode influenciar a sensibilidade insulínica. Fulzelle *et al.* (2010) estudaram camundongos com deleção do receptor da insulina em osteoblastos e mostraram que esses animais têm menor sensibilidade à insulina e tolerância à glicose, além de apresentarem menor concentração de osteocalcina sérica quando comparados com animais controles (Fulzele *et al.*, 2010). A administração de osteocalcina nestes animais levou a aumento da sensibilidade à insulina. Estes animais sem receptor de insulina em osteoblastos apresentavam

osteopenia (Ferron *et al.*, 2010). Outro trabalho com modelo experimental levanta a hipótese de que o tecido ósseo também pode regular a ingestão alimentar. Animais receberam um implante com 15% de seu peso e isso fez com que estes animais perdessem aproximadamente 80% do peso desta carga, através da redução da ingestão alimentar. A hipótese deste trabalho é que elevações no peso corporal são sentidos pelos osteócitos como um aumento tensão e, em resposta, um fator anorexígeno desconhecido é secretado (Jansson *et al.*, 2018).

Trabalhos em humanos mostram que indivíduos com resistência à insulina possuem massa óssea preservada. Este resultado ocorre nitidamente quando indivíduos com DM2 são submetidos à densitometria óssea (Patsch, Li, *et al.*, 2013; De Araujo *et al.*, 2017). O último estudo avaliou 78 indivíduos separados em diabético tipo 2, obesos e controles quanto a quantidade de TAMO e sua relação com a resistência à insulina. Os resultados mostraram que os indivíduos diabéticos não tinham comprometimento da quantidade de massa óssea. A resistência à insulina, nitidamente relacionada com doenças cardiovasculares, esteatose hepáticas e desenvolvimento do DM2, não foi relacionada com a adiposidade da medula óssea neste trabalho (De Araujo *et al.*, 2017). De Paula *et al.* avaliaram 31 mulheres não diabéticas e também verificaram que não há relação da resistência à insulina e a adiposidade da medula óssea (De Paula *et al.*, 2015). Estes trabalhos avaliaram o fígado e o tecido adiposo visceral, que com o acúmulo de lipídeos, se tornam responsáveis pelo desenvolvimento da resistência à insulina. Ainda não existem dados na literatura sobre o acúmulo de lipídeos no músculo e sua relação com o tecido adiposo da medula óssea.

Quanto a relação da resistência à insulina e o tecido ósseo, trabalho com indivíduos portadores de síndrome de Berardinelli, doença onde ocorre resistência à insulina grave devido a lipodistrofia severa, mostrou que estes indivíduos possuem massa óssea preservada ou alta e a massa óssea se correlacionou positivamente com o HOMA-IR (Lima *et al.*, 2018). Este trabalho confirma que a resistência à insulina não é causa de diminuição de massa óssea.

Em conjunto, os dados mencionados acima indicam que o metabolismo energético e ósseo estão interligados por uma rede complexa de fatores endócrinos e parácrinos que possivelmente exercem papel de regulação mútua entre os tecidos mesenquimais. Portanto, existe atualmente grande interesse em se elucidar o papel que a redistribuição de gordura e de citocinas do tecido adiposo e muscular exercem sobre as alterações ósseas e na adiposidade da medula óssea no diabetes melito tipo 2.

Justificativa

A identificação precoce dos fatores de risco de fraturas é fundamental para prevenção de fratura em pacientes de risco (Abrahamsen, Rejnmark *et al.* 2006). No DM2 esta tarefa tem sido dificultada devido à peculiaridade do diabetes tipo 2 de não prejudicar a massa óssea. Desta forma, existe grande interesse em se caracterizar adequadamente a microarquitetura óssea no DM2 e detectar os parâmetros qualitativos ósseos que afetam negativamente a resistência óssea nesta doença. A relação os tecidos mesenquimais não mineralizados com o osso tem sido pouco investigado no DM2, sendo esta uma área de alta relevância devido a plasticidade funcional dos tecidos muscular e adiposo inclusive como moduladores de outros sistemas.

Objetivo geral

Caracterizar o fenótipo ósseo trabecular em pacientes com DM2 e avaliar a influência do tecido adiposo da medula óssea, do acúmulo de gordura muscular e da resistência à insulina sobre o tecido ósseo.

Objetivos específicos

- Avaliar a massa óssea e a composição corporal por absorciometria de raio-x de dupla energia (DXA) em coluna lombar, colo do fêmur, antebraço, fêmur total e corpo total;
- Avaliar quantitativamente a microarquitetura trabecular da tíbia proximal por ressonância magnética no DM2;
- Avaliar a gordura intramuscular e adiposidade da medula óssea por ressonância magnética e estabelecer a associação destes parâmetros com a massa óssea e a os dados de microarquitetura trabecular
- Avaliar a associação entre HOMA-IR com massa óssea, microarquitetura trabecular, adiposidade muscular e TAMO.
- Avaliar o TBS da coluna lombar e sua relação com a DMO de coluna lombar, TAMO, parâmetros bioquímicos, parâmetros do trabeculado ósseo.
- Avaliar a relação do TBS com o HOMA-IR

Casuística e métodos

Seleção dos voluntários

Foram recrutados 101 indivíduos sendo 28 do grupo Controle (C: 18F, 10M), 36 do grupo Obeso/Sobrepeso (O: 24F/12M) e 37 do grupo Diabetes melito tipo 2 (DM2: 23F/14M). Os pacientes foram selecionados no Ambulatório de Diabetes e Endocrinologia do Centro Saúde Escola (CSE) da FMRP-USP, seguindo os critérios de inclusão e exclusão citados abaixo. O protocolo foi aprovado pelo comitê de ética do CSE-FMRP-USP (CAAE: 52563116.7.0000.5414) (Anexo I). Os participantes foram informados sobre todos os procedimentos que foram submetidos e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II).

Critérios de inclusão e exclusão

O critério de inclusão do grupo controle foi: indivíduos saudáveis de 30 a 70 anos. Os critérios de inclusão dos pacientes diabéticos foram: idade de 30 a 70 anos e DM2 diagnosticado há pelo menos cinco anos.

Foram excluídos do grupo controle e do grupo O os indivíduos que apresentaram glicose de jejum maior ou igual a 126 mg/dl. Adicionalmente, foram excluídos, do grupo C, O e do grupo DM2, indivíduos com insuficiência renal ou hepática, pessoas com história de tabagismo e etilismo, pessoas com história de uso de medicamentos que interferem no metabolismo mineral (carbonato de cálcio, vitamina D, calcitonina, bifosfonatos, inibidores de recaptção da serotonina, anticonvulsivantes, diuréticos tiazídicos, terapia de reposição hormonal e uso crônico de glicocorticóides) e os que tiverem história pessoal e familiar de

doenças osteometabólicas. Foram também excluídos do grupo DM2 indivíduos com evidências clínicas e bioquímicas de complicações crônicas do diabetes.

Exames

Bioquímicos

A coleta de sangue foi realizada com os indivíduos em jejum de 12 horas. As dosagens bioquímicas foram realizadas no Laboratório Central do HCFMRP-USP. Alíquotas de soro foram armazenadas a -70° C até o dia de sua utilização e foram destinadas às dosagens hormonais e fatores sistêmicos. As dosagens de cálcio, fósforo, glicose, TGO, TGP, creatinina, fosfatase alcalina e lipidograma foram realizadas em aparelho analisador bioquímico automático (KONELAB 60i, Wiener, Thermo Clinical Labsystem ou Ruukintie, Espoo, Finlândia). A osteocalcina foi determinada por ensaio imunoenzimático (hOST-EASIA Diasource, Louvain la Neuve, Bélgica) no laboratório de Metabolismo ósseo do HCFMRP-USP. As dosagens de 25(OH)D foram realizadas por quimioluminescência, em analisador imunológico automático (modelo Liaison, Diasorin, União Européia). O PTH intacto e a insulina foram determinados por quimioluminescência, por analisador automático (modelo Liaison, Diasorin, União Européia). A hemoglobina glicada foi dosada por HPLC (aparelho BIORAD D10). O telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (CTX) sérico foi dosado por eletroquimioluminescência (aparelho Elecsys, Roche). A adiponectina foi determinada por ensaio imunoenzimático (Human Adiponectin ELISA, TecoQuidel, Sissach, Suíça). O modelo de avaliação da homeostase (HOMA-IR) foi calculado segundo a fórmula: $\text{insulina sérica } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glicemia (mmol/l)} / 22,5$.

Densitometria óssea

Os voluntários foram submetidos a exame de densitometria óssea para as medidas da DMO em coluna lombar (L1-L4), colo do fêmur, fêmur total e 1/3 do antebraço.

A densitometria óssea de corpo total foi realizada para a obtenção da quantidade de gordura corporal total - % de gordura corporal total. Os resultados das DMO foram expressos em g/cm² e T-score. Foi utilizado um aparelho da marca Hologic (Discovery Wi, QDR series, Waltham, MA, USA). O erro de precisão foi de 0,87 %, 1,84 %, 1,46 %, 1,99 % e 0,98%, respectivamente, para coluna lombar (L1-L4), colo do fêmur, fêmur total, 1/3 do antebraço e corpo total. Os exames de densitometria óssea foram realizados no Centro de Imagens do HC-FMRP-USP. O índice de massa gorda (IMG) foi calculado dividindo a quantidade total de massa gorda pela altura ao quadrado (Kelly *et al.*, 2009). O índice de massa magra (IMM) foi calculado segundo Baumgartner, somando a quantidade de massa magra dos membros e dividindo este valor pela altura ao quadrado (Baumgartner *et al.*, 1998).

O TBS foi avaliado na coluna lombar (L1-L4) e na vértebra L3. TBS de L1-L4 foi calculado como o valor médio das medições individuais para as vértebras de L1 a L4 utilizando o Software TBS iNsight versão 3.0 (Med-Imaps, Genebra, Suíça).

Ressonância magnética

Os exames de ressonância magnética (RM) são realizados em aparelho 3.0 Tesla (Philips Medical System, modelo ACHIEVA).

Coluna lombar

A espectroscopia por ressonância magnética da vértebra L3 foi realizada utilizando bobina *phased array* para região lombar. Imagens ponderadas em T2 (TE: 120ms, espaçamento entre fatias (*gap*): 4,4mm, *echo-train-length*: 19 TR: 3900ms, espessura do corte: 4mm, *flip angle*: 45°) adquiridas em orientação sagital foram utilizadas como localizadoras para a espectroscopia. Um voxel cúbico de 20mm de lado posicionado sobre o

corpo vertebral L3 foi utilizado como volume de interesse para aplicação da técnica PRESS (espectroscopia), com 16 aquisições, com supressão do sinal da água, *flip angle* 90°, tempo de repetição (TR): 1600ms e múltiplos valores de tempo de eco (TE): 40/60/80ms. Os dados foram processados com o software LCmodel (PROVENCHER, 1993) com o qual foi calculada a adiposidade da medula óssea total (TAMOt), a partir da área sob a curva do sinal na região de 0,9; 1,3; 2,0; 5,3 ppm das concentrações de gorduras e 4,7 ppm da concentração da água. O pico da concentração de água foi igualmente corrigido ante o efeito de relaxação transversal. O pico na região de 1,3 ppm é correspondentes à fração saturada do TAMO – lipídeos saturados (TAMO SAT), o pico na região de 5,3 ppm corresponde à fração insaturada do TAMO – lipídeos insaturados (TAMO INSAT) e o pico de 2,0 ppm corresponde ao lipídio residual (LR), que é uma mistura indierenciável de lipídeos saturados e insaturados (figura 1). O valor que foi relatado no presente estudo como tecido adiposo da medula óssea total foi calculado a partir da fórmula: $[(\text{SAT} + \text{INSAT} + \text{LR})/(\text{SAT} + \text{INSAT} + \text{LR}) + \text{água}] \times 100$. A fração saturada do tecido adiposo da medula óssea foi calculada a partir da fórmula $[(\text{SAT})/(\text{SAT} + \text{INSAT} + \text{LR}) + \text{água}] \times 100$ e a fração insaturada $[(\text{INSAT})/(\text{SAT} + \text{INSAT} + \text{LR}) + \text{água}] \times 100$. O erro de precisão foi de 4,5 %.

Figura 1- Espectro obtido através de exame de ressonância magnética de hidrogênio, com processamento pelo software LCModel. As áreas sob a curva evidenciam quantidades de água e gordura na vértebra. A imagem no alto à esquerda mostra o voxel no centro do corpo.

Espectroscopia da tíbia esquerda

A diáfise da tíbia esquerda foi escolhida como região de interesse. Os sujeitos foram posicionados com os pés primeiro no aparelho de ressonância magnética, na posição supina e a bobina XL torso foi utilizada. Uma sequência localizadora foi utilizada para o posicionamento do voxel (*single voxel*) de 20x20x20mm. Foi realizada a espectroscopia de hidrogênio por ressonância magnética (sequencia PRESS) sem supressão de água com os seguintes parâmetros: TE:30 ms, TR:1600 ms, NSA 16 aquisições.

O programa LCModel foi utilizado para a quantificação dos lipídeos intraósseos. Os picos de lipídeos correspondem a área sob a curva de cada pico escolhido: insaturado (5,3 ppm), saturado (1,3 ppm) e lipídeos residuais (2,0 ppm). Os picos de lipídeos foram ajustados com o pico da água (4,7 ppm). O valor que foi relatado no presente estudo como tecido

adiposo da medula óssea total foi calculado a partir da fórmula: $[(LS + LI + LR)/(LS + LI + LR) + \text{água}] \times 100$. A fração saturada do tecido adiposo da medula óssea foi calculada a partir da fórmula $[(LS)/(LS + LI + LR) + \text{água}] \times 100$ e a fração insaturada $[(LI)/(LS + LI + LR) + \text{água}] \times 100$.

Figura 2 - Espectro da medula óssea da tíbia obtido através de exame de ressonância magnética de hidrogênio, com processamento pelo software LCModel. As áreas sob a curva evidenciam quantidades de água (4,7ppm) e gordura (1,3; 2,0 e 5,3 ppm).

Panturrilha esquerda – gordura do músculo sóleo

Foi realizada a espectroscopia por RM do músculo sóleo. Imagens gradiente-eco adquiridas em orientação axial foram utilizadas como localizadoras para a espectroscopia (TE: 11ms, TR: 400 ms, *gap*: 1,0 mm, espessura do corte: 4mm, *FOV*: 22cm). Um voxel de 20 x 20 x 49 cm posicionado no músculo sóleo, posicionado no local de maior área do músculo sóleo, evitando estruturas vasculares, servirá como volume de interesse para

aplicação da técnica PRESS (espectroscopia), com 48 aquisições, com supressão do sinal da água, espessura do corte de 5 mm, TE de 36ms e TR de 2400ms. Foi considerado o pico de gordura intra miócito o de 1,3 ppm e extra miócito 1,5ppm. A gordura muscular total foi obtida através da somatória dos picos 0,9; 1,1; 1,3; 1,5; 2,1 e 2,3 ppm. O pico de água corresponde ao pico 4,7 ppm (Bredella *et al*, 2013).

Figura 3 - Espectro por ressonância magnética da panturrilha esquerda de um voluntário do sexo masculino do grupo controle. As áreas sob as curvas evidenciam as quantidades de lipídeos intramiócitos (IMCL) e extramiócitos (EMCL).

Figura 4 - Espectro por ressonância magnética da panturrilha esquerda de um voluntário do sexo feminino do grupo DMT2. As áreas sob as curvas evidenciam as quantidades de lipídeos intramiócitos (IMCL) e extramiócitos (EMCL).

Micro-ressonância do trabeculado ósseo

Aquisição da imagem

O exame de imagem da tíbia esquerda foi utilizado para avaliar a microarquitetura óssea. Foi utilizada bobina *phased array* para região lombar. As imagens foram adquiridas com uma sequência de aquisição tridimensional FLASH (*fast low-angle shot sequence* - 3D FLASH), com TR e TE de 5,37 ms e 4,92 ms, respectivamente. Ângulo de flip = 45, largura de banda= 130 Hz/pixel, *field-of-view*: 100 mm, matriz 512x512, dimensão do voxel=0,234 mm x 0,234 mm, 60 fatias coronais, espessura da fatia= 0,3 mm, fator de aceleração (GRAPPA) = 2. Tempo de aquisição:15 min 18 s. A região escolhida foi a tíbia proximal.

Protocolo de processamento no 3D Slicer

A cartilagem de crescimento foi utilizada como ponto de referência, com o primeiro corte posicionado no local imediatamente distal a ela. Os cortes subsequentes foram feitos distalmente ao longo da tíbia. As imagens foram visualizadas com o software 3DSlicer e o cálculo do volume aparente trabecular ósseo e espessura trabecular aparente foram feitos com o uso de scripts customizados. Estes parâmetros foram obtidos através dos histogramas dos valores de tons de cinza das imagens conforme técnica descrita abaixo (Majumdar e Genant, 1997):

1. Imagens foram adquiridas com 234x234 micrômetros, espessura da fatia de 300 micrômetros (40 fatias);
2. Filtro mediana 2x2 voxels foi aplicado no volume e os tons de cinza da imagem foram invertidos;
3. A região trabecular do osso foi segmentada definindo uma região de interesse (Compston *et al.*) com base na borda interna do osso cortical (Ib);
4. Com o auxílio do histograma, a intensidade corte (I) foi definido pela metade da quantidade de pixels na moda da distribuição dentro da ROI: $I_1 = I_{max}/2$;

5. A intensidade de brilho limítrofe (I_r) foi calculada conforme a fórmula abaixo. Acima deste valor, os pixels representam osso trabecular e, abaixo, medula óssea:

$$I_r = I_b \cdot X + (1-X) \cdot I_l$$

6. A fração aparente do osso trabecular foi calculada pela razão BV/TV (número de pixels no osso trabecular/pixels totais). O valor de BV foi definido pela soma do número de pixels com valores acima do brilho da região cortical do osso (I_b), usada na segmentação anterior: $X = BV/TV$.

Os valores dos diferentes grupos foram submetidos à comparação pareada com um teste t (bicaudal, heterocedástico, com alfa definido em 0,05).

Figura 5 - Correspondências entre aspectos da imagem do trabeculado ósseo e a distribuição dos valores de brilho na imagem. a. Comparação entre imagens do trabeculado ósseo de um indivíduo saudável (à esquerda) e um indivíduo com osteoporose (à direita). As regiões marcadas tiveram seus valores de brilho selecionados para elaboração do histograma. b. Histograma da escala de cinza. Em preto o histograma do indivíduo controle e em vermelho o histograma do indivíduo com osteoporose. A linha azul representa o valor médio de brilho na região do osso cortical.

Análises das imagens

A região escolhida como volume de interesse foi localizada na tíbia proximal. A cartilagem de crescimento foi utilizada como ponto de referência no corte sagital. Com o auxílio de um marcador esférico (15 mm de raio) tangenciando a cartilagem de crescimento, foi localizado o ponto central do volume de interesse. Após a sinalização com um marcador

cúbico pontual, este ponto foi dilatado (oito vizinhos) até formar um cubo com 10 mm de aresta. Como resultado deste processo, o topo do volume de interesse sempre ficou posicionado distalmente a 10 mm da cicatriz de crescimento. Após a binarização da imagem, o volume resultante foi submetido ao pacote de análise BoneJ, para fazer os cálculos de volume trabecular aparente (BV), volume ósseo aparente (TV), densidade de conectividade (conn.D), separação média entre as trabéculas aparente (Th.Sp) e espessura média trabecular aparente (Tb.Th). O protocolo detalhado utilizado para as análises das imagens está no Anexo III.

Figura 6 - A: Imagem obtida por ressonância magnética de trabeculado ósseo. Neste local é selecionado o volume de interesse. B. Imagem binarizada. C: reconstrução do volume selecionado.

Análise estatística

Os resultados foram analisados por teste ANOVA, testes de correlação de Pearson e regressão linear simples e múltipla. Para a regressão linear múltipla foram consideradas como co-variáveis os parâmetros idade e índice de massa corporal (IMC). A diferença do sexo entre os grupos foi calculada por teste qui-quadrado. Todas as análises foram realizadas no software estatístico SAS 9.4 (SAS Institute Inc., SAS/STAT User's

Guide, Version 9.4, Cary, NC: SAS Institute INC.,2013) e os gráficos foram construídos no software estatístico R 3.3.2 e GraphPad Prism 5.

O cálculo do tamanho amostral foi realizado previamente e foi baseado em projeto piloto realizado com a metodologia descrita acima. Considerou-se a comparação de médias entre os grupos para a variável TAMO e consideram-se as seguintes estimativas:

- Média estimada do grupo DM2: 49.1
- Média estimada do grupo Obeso: 40.9
- Desvio-padrão: 10

Desta maneira, obtém-se um cálculo de tamanho de amostra mínimo de 25 indivíduos para cada grupo considerando como parâmetros o poder do teste de 80% e nível de significância de 5%.

Resultados

Foram recrutados 101 indivíduos sendo 28 do grupo Controle (C: 18F, 10M), 36 do grupo Obeso (O: 24F/12M) e 37 do grupo Diabetes melito tipo 2 (DM2: 23F/14M). Os grupos O e DM2 foram pareados quanto a peso, idade, altura e IMC. O grupo C foi pareado com os dois outros grupos por idade e altura. Os dados de caracterização dos grupos estão na Figura 1. Os grupos também foram adequadamente pareados segundo ao sexo (Figura 2).

Tabela 1 - Caracterização dos grupos

	C (n=28) 18F/10M	O (n=36) 24F/12M	DM2 (n=37) 23F/14M
Idade (anos)	50±11	52±11	54±9
Peso (Kg)	64±8	82±15**	84±15*
Altura (m)	1,67±0,08	1,65±0,09	1,65±0,11
IMC (Kg/m ²)	22,9±1,6	30,0±4,9**	31,1±5,3*

*significa que DM2>C, p<0.05

**Significa que O>C, p<0.05

C: grupo controle, O: grupo obeso e DM2: grupo diabetes melito tipo 2

Tabela 2 - Distribuição do sexo entre os grupos

Sexo	Grupo			Valor p
	C	O	DM2	
Feminino	18 (62%)	24 (67%)	23 (62%)	0,9224
Masculino	10 (38%)	12 (33%)	14 (38%)	

Valor p do teste de associação qui-quadrado

Os valores de glicemia sérica e de hemoglobina glicada foram maiores no grupo DM2 do que nos outros dois grupos. O cálcio, a fosfatase alcalina, o TGO e o IGF1 foram semelhantes entre os três grupos. O fósforo foi maior no grupo DM2 do que no grupo O, porém, nenhum voluntário apresentou fósforo fora dos limites da normalidade. O TGP foi

maior no grupo DM2 do que no grupo C. O colesterol foi semelhante entre os grupos, mas os níveis séricos de triglicérides foram maiores no grupo DM2 quando comparados com os outros dois grupos. O HDL e LDL foram maiores no grupo C do que no grupo DM2 e O. A vitamina D e o CTX foram semelhantes entre os grupos, porém a osteocalcina foi menor no grupo DM2 do que no grupo C. A adiponectina foi menor no grupo DM2 em comparação com os grupos C e O. A insulina e o HOMA-IR foram maiores no grupo O quando comparados com o grupo C (Tabela 3). Não foram analisados os níveis séricos de insulina no grupo DM2, pois alguns voluntários deste grupo usavam insulina.

Tabela 3 - Descrição e comparação dos resultados dos exames bioquímicos nos grupos avaliados

	C (n=28) 18F/10M	O (n=36) 24F/12M	DM2 (n=37) 23F/14M
Albumina (g/dL)	4,3±0,2	4,2±0,2	4,3±0,2
Glicemia(mg/dL)	90,6±10,6	93,4±11,0	159±65*#
Hemoglobina Glicada (%)	5,2±0,5	5,4±0,3	8,2±2,1*#
Cálcio Total (mg/dL)	9,7±0,6	9,7±0,5	9,8±0,4
Fósforo inorgânico (mg/dL)	3,5±0,5	3,3±0,5	3,8±0,8#
Fosfatase Alcalina (U/L)	149,8±43,9	162,4±57,1	161±55
TGO U/L	20,6±5,9	21,1±7,3	21,9±8,4
TGP U/L	21,6±10,2	25,4±15,2	31,4±17,3*
Creatinina (mg/dL)	0,8±0,2	0,8±0,2	0,8±0,2
IGF1 (ng/mL)	131,1±35,6	132,6±50,0	124,2±43,0
Colesterol (mg/dL)	198±39	192,2±38,2	175,6±41,8
Triglicérides (g/dL)	109,9±88,1	123,3±74,6	170,1±81,2*#
HDL (mg/mL)	51±10	45,3±10,9	41,2±10,2†
LDL (mg/mL)	124±31	122,4±31,5	100,4±32,3†
25(OH) vitamina D (ng/mL)	27,7±9,8	23,5±5,7	23,4±7,4
PTH (pg/mL)	48±19	60±27**§	46±20
Osteocalcina (ng/mL)	9,7±3,3	10,2±4,9†	7,4±3,2
CTX (ng/mL)	0,4±0,2	0,4±0,2	0,3±0,2
Adiponectina (ng/mL)	30±19	25±14	18±10§†
Insulina	5,3±3,0	12,2±7,3**	-
HOMA-IR	1,2±0,8	2,7±2,0**	-

* significa que DM2 > C, p<0.05

** significa que O > C, p<0.05

significa que DM2 > O, p<0,05

† significa que C > DM2, p<0,05

§ significa que O > DM2

C: grupo controle, O: grupo obeso e DM2: grupo diabetes melito tipo 2

A Tabela 4 mostra os resultados obtidos no exame de densitometria óssea. A DMO da coluna lombar e do 1/3 do rádio foram semelhantes entre os grupos (Figuras 7 e 8). Por outro lado, as médias de DMO do colo do fêmur e do fêmur total dos indivíduos do grupo DM2 foram maiores do que as médias dos indivíduos dos grupos C e O (Figuras 9 e 10). O IMM e o IMG foram menores no grupo C em comparação com os outros dois grupos. O TBS do grupo DM2 foi menor do que no grupo C (Tabela 4).

Avaliando o t-score dos indivíduos, considerando o colo do fêmur, fêmur total e coluna lombar, verificou-se que no grupo C foi encontrada uma prevalência de 67,85% de osteopenia (19 casos) e 3,57% de osteoporose (1 caso). No grupo O temos 44,44% de osteopenia (16 casos) e 2,77% de osteoporose. No grupo DM2 verificou-se que 35,13% dos indivíduos tinham osteopenia (13 casos) e não havia casos de osteoporose. Quando se considerou todos os sítios por densitometria óssea (1/3 rádio, coluna lombar, colo do fêmur e fêmur total), encontrou-se aumento dos casos de osteopenia e osteoporose. No grupo C observou-se que 64,28% dos casos tinham osteopenia (18 casos) e 17,85% osteoporose (5 casos). O grupo O tinha 63,88% de osteopenia (23 casos) e 5,5% de osteoporose (2 casos). E o grupo DM2 tinha 54,05% de osteopenia (20 casos) e 8,10% de osteoporose (3 casos).

Na avaliação do TBS, foi considerado normal quando o TBS foi maior ou igual a 1350 e inadequado quando o TBS foi menor que 1350. No grupo E se observou 21,7% de casos com TBS inadequado (5 casos), no grupo O 36,36% de casos com TBS inadequado (22 casos) e no grupo DM2 foram 77,7% de casos de TBS inadequado. O TBS de L1-L4 foi menor no grupo DM2 em comparação com o grupo controle (Figura 10). No grupo controle, 4 indivíduos com osteopenia tinham TBS inadequado (14%) e 1 indivíduo tinha TBS inadequado (4%). No grupo obeso, 5 indivíduos tinha TBS inadequado (14%) e 2 indivíduos tinham osteopenia e TBS inadequado (6%). No grupo DM2 14 indivíduos tinham osteopenia e TBS inadequado (38%) e 1 indivíduo tinha osteoporose e TBS inadequado (3%).

Tabela 4 - Resultados de densitometria óssea

		C (n=28) 18F/10M	O (n=36) 24F/12M	DM2 (n=37) 23F/14M
Coluna lombar (L1-L4)	DMO (g/cm ²)	0,983±0,099	1,008±0,124	1,052±0,146
	T - score	-0,8±0,9	-0,5±1,0	-0,1±1,2
L3	DMO (g/cm ²)	1,005±0,097	1,038±0,147	1,081±0,155
	T - score	-0,8±0,9	-0,5±1,3	-0,1±1,4
Colo do fêmur	DMO (g/cm ²)	0,755±0,115	0,829±0,128	0,874±0,139*#
	T-score	-1,0±1,0	-0,4±1,0	0±1,1
Fêmur total	DMO (g/cm ²)	0,867±0,121	0,930±0,134	1,000±0,130*#
	T-score	-0,8±0,9	-0,3±0,9	0,1±0,9
1/3 do rádio	DMO (g/cm ²)	0,672±0,068	0,675±0,076	0,677±0,068
	T-score	-1,1±1,1	-1,0±1,0	-1,0±1,0
IMM (Kg/m ²)		5,8±0,8	7,1±1,7**	7,6±1,4*
IMG (Kg/m ²)		8,2±1,8	12,2±3,8**	11,8±4,5*
Porcentagem de gordura corporal (%)		35±6	40±7**§	37±8
TBS L1-L4		1,396±0,081	1,342±0,127§	1,255±0,146†
TBS L3		1,426±0,094	1,359±0,150	1,298±0,144†

* significa que DM2 > C, p<0,05

** significa que O > C, p<0,05

significa que DM2 > O, p<0,05

† significa que C > DM2, p<0,05

§ significa que O > DM2, p<0,05

C: grupo controle, O: grupo obeso e DM2: grupo diabetes melito tipo 2

Figura 7 - Densidade mineral óssea (DMO) da coluna lombar (DMO L1-L4) do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2).

Figura 8 – Densidade mineral óssea (DMO) do colo do fêmur do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2).

Figura 9 – Densidade mineral óssea (DMO) do fêmur total do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2).

Figura 10 – Densidade mineral óssea (DMO) de 1/3 do rádio do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2).

Figura 11 – Escore trabecular ósseo (TBS) do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2).

A tabela 5 mostra os resultados obtidos no exame de espectroscopia da vértebra L3 e também da tíbia proximal esquerda. O TAMO SAT da tíbia esquerda foi maior no grupo C do que no grupo O (Tabela 5, Figura 12). A razão entre os lipídeos intramusculares foi maior no grupo DM2 do que no grupo C (Figura 13). Todos os outros parâmetros foram semelhantes entre os três grupos.

Tabela 5 - Resultados da espectroscopia na vértebra lombar (L3) e tíbia esquerda e espectroscopia do músculo sóleo

	C (n=28) 18F/10M	O (n=36) 24F/12M	DM2 (n=37) 23F/14M
TAMO L3 Total (%)	41,5±10,7	42,3±11,8	45,4±12,9
TAMO L3 SAT (%)	25,4±7,5	28,0±8,8	28,7±8,9
TAMO L3 INSAT (%)	5,5±3,0	3,8±3,0	4,1±3,2
TAMO Tíbia Total (%)	91,9±3,3	86,3±14,4	89,0±9,5
TAMO Tíbia SAT (%)	37,4±4,7 ††	30,9±7,7	33,9±5,0
TAMO Tíbia INSAT (%)	7,7±2,5	6,7±2,5	7,4±2,9
IMCL (UA)	690±460	1270±1270	20000±74000
EMCL (UA)	3000±1200	3600±2000	47400±170000
IMCL/EMCL	24,7±15,0	32,7±21	41,0±21,0*

* significa que DM2 > C, p<0.05

†† significa que C > O, p<0,05

C: grupo controle, O: grupo obeso e DM2: grupo diabetes melito tipo 2

Figura 12 – Adiposidade da medula óssea (TAMO) da tíbia proximal saturada do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2).

Figura 13 – Razão entre os lipídeos intra e extramioceulares do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2).

A tabela 6 mostra os resultados da sequência FLASH da ressonância magnética. Os parâmetros avaliados foram semelhantes entre os 3 grupos (Tabela 6). As figuras 14, 15, 16, 17 e 18 mostram os parâmetros do trabeculado ósseo da tíbia proximal.

Tabela 6 - Resultados do processamento das imagens obtidas por sequência FLASH da ressonância magnética

	C (n=28) 18F/10M	O (n=36) 24F/12M	DM2 (n=37) 23F/14M
Conectividade	698±280	781±372	739±335
Conn.D	0,40±0,16	0,45±0,21	0,42±0,19
BV/TV	0,53±0,03	0,53±0,04	0,53±0,03
Tb.Th (mm)	0,88±0,07	0,88±0,12	0,91±0,10
Tb.Sp (mm)	0,94±0,12	0,92±0,13	0,94±0,12

C: grupo controle, O: grupo obeso e DM2: grupo diabetes melito tipo 2

Figura 14 – Conectividade do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2).

Figura 15 – Densidade de conectividade (conn.D) do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2).

Figura 16 – Volume ósseo dividido por volume total (BV/TV) do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2).

Figura 17 – Espessura trabecular (Tb.Th) do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2).

Figura 18 – Espaçamento entre as trabéculas (Tb.Sp) do grupo controle (C), obeso (O) e diabético tipo 2 (DM2).

O IMC se correlacionou positivamente com a DMO do colo do fêmur e do fêmur total. Tanto na regressão linear simples, como na múltipla, observou-se associação positiva entre o IMC e a DMO de colo do fêmur ($R^2=0,13$; $p=0,0002$) e no fêmur total ($R^2=0,12$; $p=0,0003$). O IMG se correlacionou positivamente com a DMO do colo do fêmur e do fêmur total e negativamente com a DMO de 1/3 do rádio. Houve correlação positiva entre o índice de massa magra e a DMO da coluna lombar, colo do fêmur, fêmur total, 1/3 do rádio. Houve correlação positiva entre hemoglobina glicada e a DMO de colo do fêmur e fêmur total. Estas relações estão na Tabela 7. Também se observou associação positiva entre a

hemoglobina glicada e a DMO de colo do fêmur com $R^2= 0,06$ e $p= 0,01$, bem como com o fêmur total com $R^2=0,06$ e $p=0,009$. Estas associações positivas permanecem na regressão linear. A tabela da regressão linear simples e múltipla pode ser vista no Apêndice A.

Tabela 7 – Correlação dos parâmetros de composição corporal e da hemoglobina glicada com a densidade mineral óssea dos sítios avaliados

	r	p
IMC x DMO CF	0,36	0,0002
IMC x DMO FT	0,35	0,0003
% GC x DMO FT	-0,17	0,007
% GC x DMO 1/3 Rádio	-0,44	0,0001
IMG x DMO CF	0,25	0,01
IMG x DMO FT	0,14	0,15
IMG x DMO 1/3 Rádio	-0,28	0,004
IMM x DMO L1-L4	0,22	0,02
IMM x DMO CF	0,41	0,0001
IMM x DMO FT	0,49	0,0001
IMM x DMO 1/3 Rádio	0,29	0,003
DMO CF x HbA1c	0,25	0,01
DMO FT x HbA1c	0,25	0,009

IMC: índice de massa corporal; %CG: porcentagem de gordura corporal; IMG: índice de massa gorda; IMM: índice de massa magra; DMO: densidade mineral óssea; L1-L4: coluna lombar, CF: colo do fêmur; FT: fêmur total; 1/3 rádio: 1/3 distal do rádio; HbA1c: hemoglobina glicada, r: índice de correlação de Pearson; p: p-valor

A porcentagem de gordura corporal se correlacionou positivamente com a conn.D, porém se correlacionou negativamente com a DMO de fêmur total, colo do fêmur, Tb.Th e Tb.Sp. Houve correlação positiva entre o índice de massa magra com Tb.Th (Tabela 8, Figura 19). O Tb.Th teve correlação inversa com a idade ($r= -0,21$; $p=0,04$). A tabela com a análise de regressão linear simples e múltipla destes parâmetros está no apêndice B.

Tabela 8 – Correlação entre porcentagem de gordura corporal e índice de massa magra com parâmetros do trabeculado ósseo

	r	p
% CG x Tb.Th	-0,25	0,01
% GC x conn.D	0,19	0,06
% GC x Tb.Sp	-0,25	0,01
IMM x Tb.Th	0,44	0,0001

%CG: porcentagem de gordura corporal; IMM: índice de massa magra; Tb.Th: espessura média das trabéculas; conn.D: densidade de conectividade; Tb.Sp: separação média das trabéculas; r: índice de correlação de Pearson; p: p-valor

Figura 19 – Gráfico de dispersão entre a espessura média das trabéculas (Tb.Th) e o índice de massa magra.

A DMO de L1-L4 se correlacionou positivamente a conn.D, porém se correlacionou negativamente com o Tb.Sp. Na regressão linear houve tendência de associação entre a DMO de L1-L4 com a conectividade ($R^2=0,04$; $p=0,05$) e a conn.D ($R^2=0,04$; $p=0,05$). Por outro lado, houve associação negativa entre a DMO de coluna lombar e o Tb.Sp ($R^2=0,07$; $p=0,01$). Este mesmo padrão foi observado com a DMO do fêmur total, que se correlacionou positivamente com a conectividade, conn.D e o BV/TV, mas se correlacionou negativamente

com Tb.Sp (Tabela 9). A tabela da análise de regressão linear destes parâmetros está no Apêndice C.

Tabela 9 – Correlação entre a densidade mineral óssea e os parâmetros do trabeculado ósseo

	r	p
DMO L1-L4 x conn.D	0,2	0,02
DMO L1-L4 x Tb.Sp	-0,09	0,38
DMO FT x conn.D	0,2	0,04
DMO FT x BV/TV	0,19	0,06
DMO FT x Tb.Sp	-0,23	0,02

DMO: densidade mineral óssea; L1-L4: coluna lombar; FT: fêmur total; BV/TV: volume ósseo dividido por volume total; conn.D: densidade de conectividade; Tb.Sp: separação média das trabéculas; r: índice de correlação de Pearson; p: p-valor

Houve correlação positiva do TBS com a DMO da coluna lombar e do fêmur total. Não houve correlação entre o TBS com a DMO do colo do fêmur e do 1/3 do rádio (Tabela 10). A Figura 20 mostra a dispersão entre a DMO de coluna lombar e o TBS. Os resultados da regressão linear simples e múltipla destes parâmetros podem ser encontrados no Apêndice D.

Tabela 10 - Correlação entre a densidade mineral óssea da coluna lombar e do fêmur total e o TBS

	r	p
DMO L1-L4 x TBS L1-L4	0,52	0,0003
DMO CF x TBS L1-L4	0,23	0,12
DMO FT x TBS L1-L4	0,4	0,005
DMO 1/3 Rádio x TBS L1-L4	0,23	0,11

DMO: densidade mineral óssea; L1-L4: coluna lombar, CF: colo do fêmur; FT: fêmur total; 1/3 rádio: 1/3 distal do rádio; TBS: escore trabecular ósseo; r: índice de correlação de Pearson; p: p-valor

Figura 20 – Gráfico de dispersão entre a densidade mineral óssea da coluna lombar (DMO L1-L4) e o escore trabecular ósseo da coluna lombar (TBS L1-L4).

Houve tendência de correlação positiva entre o TBS L1-L4 e o BV/TV. Os dados mostram correlação negativa entre o TBS L1-L4 e os lipídeos intra e extramiocelulares. Houve correlação negativa entre a hemoglobina glicada e os triglicerídeos séricos com o TBS L1-L4. A associação entre o TBS e os triglicerídeos ($R^2=0,15$; $p=0,0007$) e a hemoglobina glicada ($R^2=0,15$; $p=0,0009$) permanecem na regressão linear. Não se observou correlação entre o TBS L1-L4 com HOMA-IR e TAMO L3 total (Tabela 11). A tabela de regressão

linear destes parâmetros está no Apêndice I. A tabela dos resultados de regressão linear simples e múltipla está no apêndice E.

Tabela 11 – Correlação entre TBS e BV/TV, lipídeos intramusculares, hemoglobina glicada, triglicerídeos séricos e HOMA-IR

	r	p
TBS L1-L4 x BV/TV	0,28	0,06
TBS L1-L4 x IMCL	-0,4	0,01
TBS L1-L4 x EMCL	-0,42	0,008
TBS L1-L1 x HbA1c	-0,32	0,03
TBS L1-L4 x Triglicérides	-0,48	0,0007
TBS L1-L4 x HOMA-IR	-0,1	0,5

TBS: escore trabecular ósseo; BV/TV: volume ósseo dividido por volume total; IMCL: lipídeos intramiocelulares; EMCL: lipídeos extramiocelulares; HbA1c: hemoglobina glicada; HOMA-IR: índice de resistência à insulina; r: índice de correlação de Pearson; p: p-valor

A Tabela 12 mostra a relação entre a DMO e os parâmetros relacionados com a resistência à insulina. Não houve correlação entre a DMO de coluna lombar, colo do fêmur e 1/3 do rádio com a insulina, porém, houve correlação positiva entre a DMO de fêmur total e a insulina. Não houve correlação entre a DMO de coluna lombar, fêmur total e 1/3 do rádio com o HOMA-IR, mas houve correlação positiva da DMO do colo do fêmur e o HOMA-IR. Houve correlação positiva entre a DMO de colo do fêmur e fêmur total e a razão entre os lipídeos intramusculares (Tabela 12). Na regressão linear com ajuste por idade e IMC, todas as relações entre estes parâmetros desaparecem, exceto a associação positiva entre a DMO de fêmur total e o IMCL/EMCL ($R^2 = 0,23$; $p = 0,0006$). A tabela dos resultados de regressão linear simples e múltipla está no apêndice F.

Tabela 12 – Correlação entre DMO dos sítios avaliados com HOMA-IR, insulina sérica e lipídeos intramusculares

	r	p
DMO L1-L4 x Insulina	0,03	0,76
DMO L1-L4 x HOMA-IR	0,19	0,12
DMO CF x Insulina	0,13	0,2
DMO CF x HOMA-IR	0,29	0,01
DMO FT x Insulina	0,4	0,005
DMO FT x HOMA-IR	0,15	0,21
DMO 1/3 Rádio x Insulina	0,23	0,11
DMO 1/3 Rádio x HOMA-IR	0,12	0,32
DMO CF x IMCL/EMCL	0,25	0,02
DMO FT x IMCL/EMCL	0,37	0,0006

DMO: densidade mineral óssea; L1-L4: coluna lombar; FT: fêmur total; CF: colo do fêmur; 1/3 rádio: 1/3 distal do rádio; IMCL: lipídeos intramiocelulares; EMCL: lipídeos extramiocelulares; HOMA-IR: índice de resistência à insulina; r: índice de correlação de Pearson; p: p-valor

Não foi encontrada correlação entre HOMA-IR com conn.D, BV/TV, Tb.Th e Tb.Sp.

Porém, houve correlação positiva entre os lipídeos intramusculares e o Tb.Th (Tabela 13). A Figura 20 mostra o gráfico de dispersão entre o Tb.Th e o IMCL/EMCL. A tabela de regressão linear destes parâmetros está no apêndice G.

Tabela 13 – Correlação entre os parâmetros do trabeculado ósseo e o HOMA-IR

	r	p
conn.D x HOMA-IR	0,04	0,72
BV/TV x HOMA-IR	-0,05	0,64
Tb.Th x HOMA-IR	0,12	0,32
Tb.Sp x HOMA-IR	0,03	0,80
Tb.Th x IMCL/EMCL	0,22	0,05

Conn.D: densidade de conectividade; BV/TV: volume ósseo dividido por volume total; Tb.Th: espessura média das trabéculas; Tb.Sp: espaçamento médio entre as trabéculas; IMCL: lipídeos intramiocelulares; EMCL: lipídeos extramiocelulares; HOMA-IR: índice de resistência à insulina; r: índice de correlação de Pearson; p: p-valor

Figura 21 – Gráfico de dispersão entre a espessura média das trabéculas (Tb.Th) e a razão entre os lipídeos intra e extramioelulares (IMCL/EMCL).

Houve correlação positiva do TAMO L3 total e saturado com a idade, porém, não houve correlação da idade com o TAMO da tíbia. Não houve associação entre peso, IMC e DMO com a TAMO de L3 e da tíbia proximal. Os resultados também mostraram que não existe correlação com o TAMO L3 total e o TBS (Tabela 14).

Tabela 14 – Correlação entre o tecido adiposo da medula óssea com a idade e o TBS

	r	p
TAMO L3 total x Idade	0,38	0,0003
TAMO L3 SAT x Idade	0,29	0,007
TAMO L3 total x TBS L1-L4	-0,5	0,13

TAMO: tecido adiposo da medula óssea; SAT: saturado; TBS: escore trabecular ósseo; r: índice de correlação de Pearson; p: p-valor

Houve correlação negativa entre os marcadores de remodelação óssea, osteocalcina e CTX, com a DMO de coluna lombar, colo do fêmur e fêmur total (Tabela 15). Na regressão linear as associações entre o CTX e a DMO de coluna lombar ($R^2=0,05$; $p=0,03$), colo do

fêmur ($R^2=0,1$; $p=0,004$) e fêmur total ($R^2=0,14$; $p=0,005$) permaneceram. Da mesma maneira, houve associação negativa entre a adiponectina e a DMO de coluna lombar ($R^2=0,07$; $p=0,005$), colo do fêmur ($R^2=0,14$; $p=0,0001$), fêmur total ($R^2=0,18$; $p<0,0001$) e 1/3 do rádio ($R^2=0,15$; $p<0,0001$). Estas associações permanecem mesmo após ajuste por idade e IMC. A tabela da regressão linear simples e múltipla dos parâmetros acima está no Apêndice H. A Figura 22 mostra os gráficos de dispersão entre o CTX e a DMO de coluna lombar (A), colo do fêmur (B) e fêmur total (C). A Figura 23 mostra a dispersão entre a adiponectina e a DMO de coluna lombar (A), colo do fêmur (B) e fêmur total (C).

Tabela 15 – Correlação entre a densidade mineral óssea dos sítios avaliados com osteocalcina, CTX e adiponectina

	r	p
DMO L1-L4 x Osteocalcina	-0,17	0,15
DMO CF x Osteocalcina	-0,19	0,1
DMO FT x Osteocalcina	-0,22	0,05
DMO L1-L4 x CTX	-0,23	0,03
DMO CF x CTX	-0,31	0,004
DMO FT x CTX	-0,37	0,0009
DMO L1-L4 x Adiponectina	-0,28	0,005
DMO CF x Adiponectina	-0,37	0,0001
DMO FT x Adiponectina	-0,43	0,0001
DMO 1/3 Rádio x Adiponectina	-0,38	0,0001

DMO: densidade mineral óssea; L1-L4: coluna lombar; FT: fêmur total; CF: colo do fêmur; 1/3 rádio: 1/3 distal do rádio; CTX: Telopectídeo carboxiterminal do colágeno tipo 1; r: índice de correlação de Pearson; p: p-valor

Figura 22 – A. Gráfico de dispersão entre densidade mineral óssea de coluna lombar (DMO L1-L4) e CTX. B. Gráfico de dispersão entre densidade mineral óssea de colo do fêmur (DMO CF) e CTX. C. Gráfico de dispersão entre densidade mineral óssea do fêmur total (DMO FT) e CTX.

Figura 23 – A. Gráfico de dispersão entre densidade mineral óssea de coluna lombar (DMO L1-L4) e adiponectina. B. Gráfico de dispersão entre densidade mineral óssea de colo do fêmur (DMO CF) e adiponectina. C. Gráfico de dispersão entre densidade mineral óssea do fêmur total (DMO FT) e adiponectina.

Os resultados mostraram que houve tendência de correlação negativa entre CTX e a conn.D e o BV/TV. Os dados mostram uma correlação positiva entre o CTX e o Tb.Sp (Tabela 16), além disso, esta associação se mantém na regressão linear simples ($R^2=0,18$; $p=0,0003$) e múltipla ($R^2=0,20$; $p=0,0002$). A tabela com os resultados da regressão linear simples e múltipla está no Apêndice I.

Tabela 16 – Correlação entre os parâmetros do trabeculado ósseo com o CTX

	r	p
Conn.D x CTX	-0,21	0,07
BV/TV x CTX	-0,33	0,004
Tb.Sp x CTX	0,42	0,0003
IMG x CTX	-0,26	0,02
% GC x CTX	-0,21	0,05

Conn.D: densidade de conectividade; BV/TV: volume ósseo dividido por volume total; Tb.Sp: espaçamento médio entre as trabéculas; IMG: índice de massa gorda; CTX: Telopectídeo carboxiterminal do colágeno tipo 1; IMCL: lipídeos intramiocelulares; EMCL: lipídeos extramiocelulares; r: índice de correlação de Pearson; p: p-valor

Os dados mostrados na Tabela 17 revelam correlação negativa entre a adiponectina, osteocalcina e o CTX com o IMCL/EMCL (Tabela 17). A associação entre a adiponectina e o IMCL/EMCL permaneceu na regressão linear ($R^2=0,06$; $p=0,03$). A tabela da regressão linear destes parâmetros está no Apêndice J. A Figura 23 mostra os gráficos de dispersão entre o CTX e a conectividade, BV/TV e Tb.Sp.

Tabela 17 – Correlação entre a razão de lipídeos intra com extramiocelular com a adiponectina, osteocalcina e CTX

	r	p
IMCL/EMCL x Adiponectina	-0,24	0,03
IMCL/EMCL x Osteocalcina	-0,25	0,05
IMCL/EMCL x CTX	-0,23	0,06

IMCL: lipídeos intramiocelulares; EMCL: lipídeos extramiocelulares; CTX: Telopectídeo carboxiterminal do colágeno tipo 1; r: índice de correlação de Pearson; p: p-valor

Figura 24 – Gráfico de dispersão entre A. conectividade e CTX. B. volume ósseo dividido por volume total (BV/TV) e CTX. C. separação entre as trabéculas (Tb.Sp) e CTX.

Discussão

Estudos epidemiológicos vêm identificando uma forte relação do aumento do índice de massa corporal da população mundial (Collaborators *et al.*, 2017) com risco para desenvolvimento de um conjunto de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, DM2, doença renal crônica e até mesmo câncer (Singh *et al.*, 2013; Lauby-Secretan *et al.*, 2016). Cerca de 17 milhões de mortes são causadas por doenças cardiovasculares e DM2 a cada ano (Lozano *et al.*, 2012). A obesidade e o DM2 são dois distúrbios metabólicos altamente prevalentes e que apresentam forte associação. A obesidade é caracterizada pelo excesso de ingestão de calorias, o que gera acúmulo de gordura corporal. A quantidade de lipídeos que o tecido adiposo consegue estocar, embora grande, não é ilimitada e quando sua capacidade de armazenamento é ultrapassada, ocorre o extravasamento dos ácidos graxos excedentes para outros sítios. Além disso, os adipócitos viscerais quando se tornam hipertróficos, possuem maior atividade lipolítica. Estes dois mecanismos favorecem a liberação de maior quantidade de ácidos graxos livres na circulação, acarretando em acúmulo ectópico de gordura, por exemplo, no fígado e no músculo (Tsatsoulis *et al.*, 2013). Estes adipócitos disfuncionais também secretam menores quantidades de adiponectina e maiores quantidades de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-6, contribuindo para o estado inflamatório crônico da obesidade (Unger e Scherer, 2010). O acúmulo de gordura no fígado e no músculo gera resistência à insulina nestes locais e pode levar à disfunção das células β -pancreáticas, culminando no desenvolvimento do DM2 (Heilbronn *et al.*, 2004; Russell, 2004).

É bem descrito na literatura que o DM2 pode levar a complicações macroangiopáticas, bem como a retinopatia, neuropatia e nefropatia. Porém, em relação à massa óssea o DM2 não parece ter influência negativa, levando à impressão inicial que o DM2 tem efeito protetor

contra fraturas. Porém, assim como na obesidade, no DM2 ocorre, paradoxalmente, maior risco de fratura independente da massa óssea (Bonds *et al.*, 2006; Schwartz, 2016). As fraturas nestes indivíduos ocorrem em locais distintos do corpo. Em indivíduos obesos, ocorrem maiores taxas de fraturas no quadril em comparação com indivíduos não obesos (Premaor *et al.*, 2010; Prieto-Alhambra *et al.*, 2012). Outros autores mostram que o risco de fraturas no úmero proximal, perna e tornozelo parece ser maior em obesos (Compston *et al.*, 2011; Prieto-Alhambra *et al.*, 2012). Por outro lado, existem trabalhos que mostram menor risco de fraturas no fêmur proximal e vértebra em adultos obesos (De Laet *et al.*, 2005). No DM2, estudos mostram que existe maior risco de fraturas principalmente no quadril e em vértebra (Vestergaard *et al.*, 2005; Janghorbani *et al.*, 2007; Dytfeld e Michalak, 2017). Desta forma, além das doenças reconhecidas como consequências da obesidade e do DM2, certamente a fragilidade óssea deve ser incorporada às complicações destas duas doenças (Schwartz *et al.*, 2001; Rubin e Patsch, 2016).

A qualidade óssea inclui a sua composição (proporção de mineral, colágeno, água e proteínas de matriz), as características desses componentes (quantidade e tipo de ligação do colágeno, tamanho e estrutura dos cristais de hidroxapatita, bem como grau de mineralização), arquitetura óssea (tamanho, geometria, densidade e microarquitetura trabecular) e quantidade de microdanos (comprimento, densidade e localização da fissura) (Kijowski *et al.*, 2012). A DMO é geralmente usada como um dos principais determinantes da resistência óssea, mas a DMO prediz cerca de 50% das fraturas. A outra metade das fraturas ocorre mesmo quando o indivíduo não tem diagnóstico de osteoporose por densitometria óssea (Siris *et al.*, 2001). O DM2 faz parte das situações em que a massa óssea é preservada ou aumentada, mas, em contraste, há maior risco de fraturas. O presente trabalho confirma que o DM2 não prejudica a massa óssea. A DMO da coluna lombar e 1/3 do rádio foram semelhantes entre os grupos, já a DMO do fêmur total e do colo do fêmur do grupo DM2 foi

maior do que do grupo controle. Em trabalho anterior, o grupo de indivíduos com DM2 tiveram massa óssea maior até mesmo quando comparados com o grupo obeso (De Araújo *et al.*, 2017). Estes resultados estão de acordo com Cutrim *et al.* (2007), que mostraram que indivíduos com DM2 possuem massa óssea semelhante quando comparada com o grupo controle. Da mesma maneira, Schwartz *et al.* (2001) mostraram que a massa óssea de indivíduos diabéticos foi elevada em comparação com um grupo de indivíduos normoglicêmicos (Schwartz *et al.*, 2001). Em estudo recente, Yu *et al.* (2017) mostraram que os indivíduos com DM2 possuíam massa óssea semelhante à de um grupo controle formado por obesos não diabéticos. Portanto, é necessário salientar que existe certa unanimidade na literatura, mostrando que o DM2 não compromete a massa óssea mesmo em relação a obesidade.

No presente estudo, observou-se correlação positiva entre a hemoglobina glicada e massa óssea. A hemoglobina mantida abaixo de 7% pode diminuir o risco de complicações microvasculares. O grupo DM2 era predominantemente composto por indivíduos com mau controle metabólico, pois a sua média da hemoglobina glicada foi de 8,2%. O controle glicêmico inadequado também pode afetar indiretamente o risco de fraturas, aumentando a incidência de complicações microvasculares, como neuropatia retinopatia e nefropatia que podem aumentar o risco de quedas. Por outro lado, os dados atuais estão alinhados com estudo anterior que mostra não haver influência negativa do descontrole metabólico sobre a massa óssea. Cutrim *et al.* (2007) avaliaram o impacto do controle do diabetes e não encontraram diferença entre os grupos, o grupo de indivíduos avaliados com mau controle metabólico apresentou massa óssea semelhante a massa óssea dos grupos controle normoglicêmico e DM2 com bom controle metabólico (Cutrim *et al.*, 2007).

A hiperglicemia pode gerar mudanças nos parâmetros do controle do metabolismo ósseo, mas no presente estudo essas mudanças parecem não terem sido suficientes para alterar

a massa óssea negativamente até o momento. Por outro lado, estudos mostram que o descontrole metabólico do diabetes pode alterar a qualidade óssea em homens diabéticos japoneses. Este trabalho avaliou homens diabéticos e revelou que estes indivíduos tinham massa óssea maior que o grupo controle, enquanto que o TBS foi apenas semelhante ao do grupo controle. Além disto, estes autores mostraram que a hemoglobina glicada se relacionou negativamente com o TBS (Iki *et al.*, 2017). Outro trabalho, em homens e mulheres na pós-menopausa, mostrou que o estado hiperglicêmico prolongado pode estar relacionado com aumento da DMO, mas pode resultar na deterioração da estrutura óssea sugerida por diminuição do TBS (Napolitani, 1969). Em contrapartida, trabalho realizado em meninas com DM1 mostrou que o mau controle metabólico pode alterar o eixo GH/IGF1, levando à diminuição da densidade óssea (Moyer-Mileur *et al.*, 2008). Porém, estes resultados não são comparáveis com os obtidos no presente estudo, tendo em vista que Moyer-Mileur *et al.* estudaram mulheres adolescentes com DM1. Existem claras diferenças entre o diabetes tipo 1 e 2. O DM1 é caracterizado por deficiência absoluta de insulina, baixos níveis séricos de IGF1 e de hormônios esteroides, os quais afetam a DMO e não são características presentes no DM2 (Cutrim *et al.*, 2007; Rosen, 2008). Ao contrário, o DM2 está associado a diversos fatores que favorecem a manutenção e o desenvolvimento de massa óssea, como a obesidade, o hiperandrogenismo e a hiperinsulinemia. (Heath *et al.*, 1980)

A densidade mineral óssea pode ser influenciada por um conjunto de fatores, sendo um dos mais explorados o peso corporal. No presente estudo houve correlação positiva entre o IMC e a DMO de colo do fêmur e fêmur total. Nesta mesma linha, existem estudos que mostram que indivíduos com IMC mais baixo têm maior risco de fraturas (De Laet *et al.*, 2005), enquanto a obesidade era vista como fator protetor contra as fraturas (Albala *et al.*, 1996). O IMM teve correlação positiva com a DMO de todos os sítios avaliados. Em concordância com estes resultados, Reid (2010) mostrou que existe relação positiva do peso

com a DMO. Na hipótese do mecanostato se sugere que ocorra adaptação dos ossos às cargas mecânicas geradas por seu uso voluntário, como a contração muscular, ligando a ação do músculo diretamente na estrutura e resistência óssea (Frost, 2003). Certamente o aumento do peso corporal aumenta a carga mecânica do esqueleto. O aumento do peso corporal também se associa à maior produção de estrógenos, podendo ter papel na redução da remodelação óssea. A perda de massa magra e sua disfunção, a sarcopenia, pode aumentar o risco de fratura, pois está relacionada com o aumento do risco de quedas (De Laet *et al.*, 2005). Evidências mais recentes mostram que o tecido muscular participa não só da modulação do metabolismo energético, mas também do metabolismo ósseo através da secreção de miocinas, a miostatina e a irisina. A miostatina inibe o aumento da massa muscular e pode promover o acúmulo de gordura. A supressão deste fator leva ao aumento de massa muscular e em paralelo de massa óssea (Hamrick *et al.*, 2002). A irisina sérica aumenta principalmente após o exercício físico. Em ratos com dieta que induz à obesidade, foi encontrada maiores níveis de irisina secretada pelo tecido adiposo branco. Este mecanismo pode ser adaptativo para a prevenção das morbidades consequentes da obesidade. Adicionalmente, estudos experimentais mostram que animais tratados com irisina recombinante apresentam melhora em parâmetros de massa óssea, como aumento da cortical óssea, geometria e resistência óssea (Colaïanni e Grano, 2015).

Houve correlação positiva do IMG com a DMO do CF e do FT e negativa com 1/3 do antebraço. Por outro lado, houve correlação negativa da porcentagem de gordura corporal com a DMO do FT e 1/3 do rádio. A relação entre a massa gorda e a massa óssea é complexa e incompletamente compreendida. Reid (2010) exhibe dados onde a porcentagem de massa gorda tem associação positiva com a DMO de fêmur total e a porcentagem de massa magra tem associação negativa com a DMO de fêmur total. O efeito do peso corporal tem contribuição tanto da quantidade de massa gorda e massa magra. Porém, ainda não existem

dados suficientes para elucidar qual o efeito que se sobressai na determinação da DMO, se é o efeito mecânico do peso ou a ação metabólica da massa magra e gorda. Em adição, certamente a adiponectina, insulina, amilina, leptina e estrogênios estão envolvidos neste mecanismo (Reid, 2010). No presente trabalho, observou-se relação negativa da porcentagem de gordura corporal com a DMO do antebraço, o que leva a hipótese de que o antebraço, por ser um sítio que não sofre o efeito mecânico do peso corporal, pode sofrer influência diferente dos demais tecidos mesenquimais (Vogt *et al.*, 2002). Mais estudos precisam ser realizados para elucidar as controvérsias do efeito da massa gorda na massa óssea, pois existem resultados conflitantes na literatura. Existem trabalhos que não verificaram relação da massa gorda com a massa óssea (Manzoni *et al.* 1996; Petit *et al.* 2005), trabalhos que verificaram relação positiva (Leonard *et al.* 2004; Clark *et al.* 2006) e outros que verificaram relação negativa (Goulding *et al.* 2000; Weiler *et al.* 2000). Os resultados do presente trabalho estão alinhados com os resultados da literatura que mostram o efeito positivo da massa magra no tecido ósseo e negativo da massa gorda na qualidade óssea. Em concordância com os dados do presente estudo, Kaji *et al.* (2013) mostraram que a porcentagem de gordura corporal apresentou correlação negativa com a densidade mineral óssea (Kaji, 2013). Compston *et al.* (2011) relataram que a obesidade não protegia contra fraturas em mulheres na pós-menopausa e que, de fato, estava associada a um risco aumentado de fraturas de perna e tornozelo (Compston *et al.*, 2011). Em adolescentes obesas existe correlação negativa entre a DMO e a relação da taxa de tecido adiposo visceral/tecido adiposo subcutâneo (Russell, 2004). Russel *et al* mostraram que os níveis circulantes de adipocinas e consequentemente o estado inflamatório crônico podem mediar as associações inversas do tecido adiposo visceral com densidade óssea (Russell e Misra, 2010).

Buscando aprimorar a avaliação da massa óssea nos indivíduos diabéticos, desenvolveu-se um protocolo de avaliação do trabeculado ósseo por ressonância magnética. A

técnica de medida de trabéculas por ressonância magnética é inédita no Brasil e inovadora. Além disto, não existe na literatura dados de avaliação de estrutura óssea por ressonância magnética no DM2. Com esta técnica, é possível avaliar parâmetros como o BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp e conn.D. No presente estudo, o sítio escolhido para a avaliação por foi o trabeculado ósseo da tíbia proximal esquerda. Não se verificou diferença entre os parâmetros do trabeculado ósseo avaliado por ressonância magnética entre os três grupos. Em estudo anterior, Furst *et al.* (2016), avaliaram o rádio distal e a tíbia 2 em grupos por HR-pQCT, um grupo compreendia indivíduos com diabetes melito tipo 2 (n=16) e um grupo controle sem diabetes (n=19). No antebraço, o BV/TV e a espessura das trabéculas foram maiores no grupo controle em comparação com o grupo DM2. Em concordância com os resultados do presente estudo, na tíbia os parâmetros do trabeculado ósseo foram semelhantes entre dois grupos (Furst *et al.*, 2016). Os autores sugeriram que esta diferença de resultados entre o rádio e a tíbia se deve ao fato de que a tíbia suporta o peso corporal, ao contrário do rádio que não sofre essa ação. Os autores também chamam a atenção que a microestrutura do osso esponjoso varia, particularmente entre ossos longos, vértebras e ossos pélvicos (Furst *et al.*, 2016). Portanto, este estudo revela por mais uma técnica a ausência de comprometimento quantitativo ósseo no DM2.

O presente trabalho mostrou relação positiva da densidade mineral óssea com a conn.D e BV/TV e revela correlação negativa da DMO com o espaçamento entre as trabéculas. Também houve correlação negativa entre Tb.Th com a idade. Segundo Furst *et al.* o aumento da idade diminui o número de trabéculas, bem como a DMO trabecular. Por outro lado, o aumento da idade eleva a separação entre as trabéculas e reduz a DMO cortical no rádio e na tíbia. Com base nestes resultados, os autores fizeram a hipótese de que as trabéculas ósseas não são substituídas, mas diminuem progressivamente em número com a idade.

Os resultados da relação da massa gorda com os parâmetros do trabeculado ósseo são controversos. Enquanto se observou relação negativa da porcentagem de gordura corporal com o Tb.Th e Tb.Sp, também se observou relação positiva da porcentagem de gordura corporal com a conn.D. Trabalho anterior avaliou, por tomografia computadorizada quantitativa periférica, 115 mulheres adolescentes e foi verificado que aquelas com maior percentual de gordura corporal tinham tamanho ósseo e resistência cortical menores tanto no rádio quanto na tíbia em comparação com controles com uma porcentagem normal de gordura corporal pareados por idade e sexo (Pollock *et al.* 2007). Por outro lado, Wetzsteon et al. (2008) relataram que crianças com excesso de peso tinham maiores índices de resistência óssea na tíbia quando comparadas a crianças com peso normal. Outros autores fizeram a hipótese que as crianças com sobrepeso e obesas têm maior massa muscular esquelética em relação à sua altura e estas associações positivas entre o peso corporal e os parâmetros ósseos podem ser explicadas pelo aumento da massa muscular isoladamente (Leonard *et al.* 2004). Estes resultados contraditórios estimulam mais estudos para elucidar influência da gordura corporal nos parâmetros do trabeculado ósseo. No presente trabalho observou-se correlação positiva com o IMM e o Tb.Th. Estes resultados seguem a mesma linha da relação positiva entre o IMM e a densidade mineral óssea.

Existe grande interesse no desenvolvimento de técnicas não invasivas para aprimorar o diagnóstico de osteoporose. O TBS é um índice de textura baseado na avaliação das variações dos níveis de cinza dos pixels nas imagens de DXA da coluna lombar. O TBS tem uma correlação significativa com micro imagem CT de vértebras de cadáveres e biópsia do osso ilíaco em homens e mulheres com osteoporose idiopática e fraturas (Muschitz *et al.*, 2015). O benefício do TBS em conjunto com a DMO para avaliação de risco de fratura tem sido documentado em vários estudos transversais e prospectivos (Hans, Barthe, *et al.*, 2011; Boutroy *et al.*, 2013; Harvey *et al.*, 2015).

No presente trabalho, o TBS do grupo DM2 foi menor do que nos outros dois grupos. Estes resultados são comparáveis com os obtidos no estudo Manitoba, no qual o TBS foi menor e a densidade mineral óssea maior no DM2 em comparação com o grupo controle (Leslie *et al.*, 2018). Os mecanismos para aumento do risco de fratura em diabetes são provavelmente multifatoriais e podem incluir problemas na qualidade óssea. Existem trabalhos com HR-pQCT mostrando que pode haver aumento da porosidade da cortical no DM2, a qual não é detectada na densitometria óssea (Seeman, 2007; Holzer *et al.*, 2009). Por outro lado, Furst *et al.* (2016) mostraram que não ocorre diferença no trabeculado ósseo da tíbia entre indivíduos diabéticos e controles (Furst *et al.* 2016). Mais trabalhos são necessários para esclarecer quais as propriedades esqueléticas no diabetes tipo 2 que afetam a medida do TBS. No presente trabalho, o alvo da avaliação foi o componente trabecular do osso. Embora não tenha sido detectada diferença nos parâmetros do trabeculado ósseo entre os grupos, observou-se que o TBS teve tendência de correlação positiva com o BV/TV. Este resultado está em concordância com dados anteriores onde o TBS parece possuir relação com a microarquitetura óssea, porém não possui resolução suficiente para mensurar estes parâmetros (Bousson *et al.*, 2012). Ainda, a avaliação deste parâmetro em conjunto com a avaliação da DMO pode ser particularmente útil na prevenção de fraturas no DM2, doença na qual a DMO é paradoxalmente aumentada (Bousson *et al.*, 2012).

Leslie *et al* (2018) mostraram que o TBS é capaz de prever fraturas osteoporóticas em mulheres brancas na pós-menopausa e com DM2. Em concordância direta com estes dados, o presente estudo mostra que há relação positiva entre a densidade mineral óssea de todos os sítios avaliados com o TBS. O TBS apresentou relação inversa com a hemoglobina glicada, níveis séricos de triglicerídeos e com os lipídeos intramusculares, mas não teve correlação com o HOMA-IR. Estes dados concordam parcialmente com os resultados de Iki *et al.* (2017), que avaliaram 1683 homens com e sem DM2. Os níveis séricos de glicose sérica,

hemoglobina glicada e HOMA-IR foram relacionados inversamente com o TBS. Nesse trabalho, as análises de regressão linear múltipla revelaram que os índices glicêmicos (glicose sérica e HbA1c) estavam associados ao aumento da DMO e redução do TBS, e o HOMA-IR estava associado apenas ao TBS (Iki *et al.*, 2017). Desta maneira, em conjunto com os dados apresentados acima (correlação positiva da hemoglobina glicada com a DMO), pode-se inferir que o DM2 não prejudica a massa óssea, mas o descontrole da doença pode ter papel fundamental nos parâmetros de qualidade do tecido ósseo.

Ainda não está bem estabelecido qual o papel da resistência à insulina na massa óssea. de Araújo *et al.* (2017) avaliaram 3 grupos, compostos por indivíduos controle, obesos e diabéticos tipo 2. Em concordância com os resultados do presente estudo, os autores mostraram que a resistência à insulina não está associada a prejuízo de massa óssea, pois o grupo com diabetes tipo 2 apresentou massa óssea maior que o grupo obeso e controle em todos os sítios avaliados (De Araujo *et al.*, 2017). Reforçando os resultados do presente estudo, Lima *et al.* estudaram a síndrome de Berardinelli, doença onde ocorre lipodistrofia generalizada que gera resistência grave à insulina. Nestes indivíduos não se observa baixa massa óssea. O presente estudo também não se observou relação negativa do HOMA-IR com os parâmetros estudados do trabeculado ósseo, bem como se observou tendência de correlação positiva entre lipídeos intramiocelulares e a espessura das trabéculas. Desta forma, estes dados confirmam que a resistência à insulina não tem impacto negativo na massa óssea.

Nas últimas décadas, tem ganhado importância estudos sobre papel que o tecido adiposo possui na modulação do metabolismo ósseo. Isto estimula mais pesquisas relacionadas com a importância da quantidade e da distribuição de gordura corporal. A obesidade é um dos principais determinantes do DM2, mas não só a quantidade de gordura estocada é importante, como também o local onde ela se acumula (Weiss, 2007). Trabalho anterior mostrou que não houve relação do tecido adiposo visceral (VAT), dos lipídeos intrahepáticos (LIH) e do

TAMO com a massa óssea dos indivíduos diabéticos tipo 2. O presente trabalho complementa o trabalho anterior com a avaliação das gorduras intra (IMCL) e extramiocelulares (EMCL) no músculo sóleo. A razão entre estes lipídeos (IMCL/EMCL) foi maior nos indivíduos diabéticos em comparação com o grupo controle. Estes resultados estão de acordo com dados anteriores da literatura que mostram aumento dos lipídeos intramusculares no desenvolvimento da resistência à insulina (Bachmann *et al.*, 2001; Stefan *et al.*, 2014). No presente trabalho, observou-se que os lipídeos intramusculares possuem relação positiva com a massa óssea, mas negativa com o TBS. Estes resultados, atrelados aos dados discutidos anteriormente sobre a relação negativa da gordura corporal com o TBS, reforçam que o acúmulo de gordura pode ter papel negativo na qualidade óssea.

Um sítio de armazenamento de gordura antes pouco estudado é o tecido adiposo da medula óssea, antes visto somente como tecido de preenchimento. Mais recentemente, pesquisas apontam que o TAMO também é capaz de produzir fatores que afetam diretamente osteoblastos e osteoclastos, como a secreção de citocinas inflamatórias, promovendo o recrutamento de osteoclastos e assim, a perda de massa óssea (JILKA 2007). A localização do TAMO faz com que ocorra uma importante interação com tecido ósseo, podendo influenciar a remodelação óssea (Kawai *et al.*, 2012). No presente trabalho não se verificou aumento do TAMO nos indivíduos diabéticos nos dois sítios avaliados (tíbia proximal e vértebra L3). Estes resultados sugerem que o TAMO não é um sítio de armazenamento de lipídeos em situações de excesso de energia. Patsch *et al.* (2013) avaliaram o TAMO da coluna lombar de diabéticos tipo 2 com e sem fraturas e compararam seus resultados com um grupo de indivíduos normoglicêmicos com fraturas e outro sem fraturas. Este trabalho verificou que o TAMO total foi semelhante entre os grupos e estes dados estão em concordância com os dados do presente trabalho. Por outro lado, Patsch revelou que os indivíduos diabéticos com e sem fraturas tiveram valores de TAMO saturado maiores que os dois grupos controles. Os

diabéticos com fraturas tiveram níveis mais baixos de lipídeos insaturados da medula óssea (Patsch *et al.* 2013). No presente trabalho não houve diferença entre as frações do TAMO na L3. Na tíbia, o grupo C apresentou maior TAMO SAT em comparação com o grupo O. É importante ressaltar que ainda não existe na literatura a padronização da fórmula para calcular o TAMO, assim como não está bem estabelecido qual é o melhor local para fazer a sua medida. Enquanto o presente estudo avaliou o TAMO na tíbia proximal e na terceira vértebra lombar, o trabalho de Patsch avaliou a média do TAMO entre as vértebras L1, L2 e L3. Yu *et al.* (2017) mensuraram o TAMO nas vértebras L1 e L2 e também na diáfise e na metáfise do fêmur. Estes autores verificaram que existe diferença na TAMO nos diversos sítios avaliados. Enquanto na coluna e na metáfise do fêmur a fração lipídeos/água foi maior no grupo diabético, na diáfise femoral não se observou diferença entre os grupos (Yu *et al.*, 2017). No presente estudo também é possível identificar que a quantidade de TAMO na tíbia é maior que na vértebra L3. Enquanto na vértebra L3 a média do TAMO total é próxima a 40%, na tíbia a média pode chegar a mais de 90%. Desta maneira, é necessário ter cautela para comparar os estudos sobre a adiposidade da medula óssea. Os diabéticos avaliados no presente trabalho não tinham história prévia de fratura. Uma limitação do presente estudo é não ter avaliado os indivíduos prospectivamente. de Araújo *et al.* (2017) avaliaram diabéticos tipo 2, obesos e indivíduos controle e não observaram alterações nas quantidades de TAMO entre eles. Os dados do presente estudo estão de acordo com resultados anteriores e confirmam que em situações com abundância de calorias, o TAMO parece não se comportar como um sítio de estoque de energia. Curiosamente, na anorexia nervosa, uma situação clínica de desnutrição por auto-imposição de jejum, a perda de massa óssea e redução de massa gorda corporal está associada ao aumento de adiposidade de medula (Bredella *et al.*, 2009).

Observou-se relação positiva do TAMO L3 total e SAT com a idade. Trabalho recente avaliou indivíduos eutróficos e observou que existe correlação positiva do TAMO de L3 e suas frações com a idade e a relação da fração saturada com a idade foi mais forte que a correlação com a insaturada (Maciel *et al.*, 2017). Na literatura existe a hipótese de que o aumento do componente saturado do TAMO é prejudicial para o tecido ósseo, já o insaturado parece proteger o osso contra fraturas (Patsch, Li, *et al.*, 2013). No grupo C o TAMO SAT da tíbia foi maior do que no grupo O. No presente trabalho não se observou relação entre peso, IMC e DMO com o TAMO. Apesar de não se observar correlação da TAMO com a DMO, no presente trabalho se observa que grupo C apresentou taxas mais altas de osteopenia e osteoporose do que os outros dois grupos, em paralelo com o aumento da TAMO saturada na tíbia. Yu *et al.* (2017) avaliaram o TAMO nas vértebras L1 e L2 e no fêmur. Estes autores observaram existir correlação negativa da TAMO da coluna lombar com a DMO. Por outro lado, não existiu correlação entre o TAMO do fêmur com a DMO. Estes dados estão parcialmente de acordo com os dados do presente trabalho, que não apresentou relação da DMO com o TAMO em nenhum sítio avaliado. No trabalho de Yu, os indivíduos avaliados tinham níveis elevados de IMC (acima de 45 kg/m²), ou seja, obesidade grave, enquanto os indivíduos do presente trabalho apresentavam obesidade menos grave, com média de IMC em torno de 30kg/cm². Outra diferença encontrada entre os dois trabalhos é que no presente estudo o grupo DM2 apresentou DMO maior no colo do fêmur e fêmur total em comparação com os outros dois grupos e no estudo de Yu a DMO era semelhante entre o grupo DM2 e controle.

Estudos mostram que o TAMO também pode se comportar como um sofisticado órgão endócrino, contribuindo para a secreção de adiponectina sérica. Esta adipocina atua na melhora da sensibilidade insulínica, regula a secreção de insulina, além de possui propriedades anti-inflamatórias e anti-ateroscleróticas (Mpalaris *et al.*, 2016). No presente

trabalho, observou-se que a adiponectina sérica foi menor no grupo DM2 do que no controle. Estes dados concordam com dados prévios da literatura, que mostram que os níveis séricos de adiponectina são reduzidos em indivíduos com obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo 2 (Hotta et al. 2000). Os resultados do presente trabalho mostram que houve correlação negativa da adiponectina com a massa óssea. Richards *et al.* (2007) avaliaram 17354 mulheres e verificaram que a DMO é menor nos indivíduos com níveis mais elevados de adiponectina (Richards *et al.*, 2007). Russel *et al.* (2010) avaliaram 15 adolescentes obesas do sexo feminino e mostraram que o tecido adiposo visceral tem relação negativa com a DMO da coluna (Russell *et al.*, 2010). Esta relação negativa pode ocorrer devido ao efeito inflamatório crônico da obesidade mediada pelas adipocinas, como, por exemplo, a diminuição da adiponectina. Os estudos sobre os efeitos da adiponectina na massa óssea ainda são controversos. Ela pode ter ação no sistema nervoso central, inibindo a atividade simpática e por este meio aumentar a taxa de formação óssea. A adiponectina também pode ter ação periférica aumentando a proliferação e diferenciação de osteoblastos, enquanto inibe a osteoclastogênese (Jurimae *et al.*, 2008). Por outro lado, a adiponectina, através da via fosfatidilinositol-3-kinase-FoxO1 (PI3K-FoxO1), pode bloquear a proliferação e favorecer a apoptose de osteoblastos. Quando estimulada, a via fosfatidilinositol-3-kinase-FoxO1 (PI3K-FoxO1) leva a diminuição da osteocalcina e também da formação óssea (Kajimura *et al.*, 2013). Biver *et al.* (2011) publicaram uma metanálise sobre a influência da adiponectina, leptina, resistina e visfatina e a grelina na DMO e no risco de fratura em homens e mulheres saudáveis. Foram incluídos 59 estudos e o tamanho amostral total foi de 10.451 voluntários. Assim como no presente estudo, foi encontrada uma correlação inversa entre os níveis séricos de adiponectina e DMO na coluna lombar, fêmur total e corpo total em mulheres na pós-menopausa e em homens. Os autores concluem que a adiponectina é a mais relevante

adipocina negativamente associada com a DMO, independente sexo e menopausa (Biver *et al.*, 2011).

Uma marca da doença óssea no DM2 é ter níveis séricos baixos de marcadores de remodelação óssea. No presente trabalho, os níveis séricos de CTX foram semelhantes entre os grupos. Por outro lado, os níveis séricos de osteocalcina foram menores no grupo DM2 em comparação com o grupo controle. No estudo de Okazaki *et al.*, os autores mostraram que os níveis de CTX estavam diminuídos em indivíduos diabéticos com mau controle da glicemia (Okazaki *et al.*, 1997). Kim *et al.* (2017) avaliaram crianças obesas e verificaram que os níveis séricos de osteocalcina foram significativamente menores em crianças com sobrepeso ou obesas e se associaram negativamente à gordura corporal mesmo após ajuste por idade, sexo e IMC (Kim *et al.*, 2014). A hiperglicemia pode suprimir a maturação dos osteoblastos. Assim, os diabéticos mal controlados podem apresentar diminuição na mineralização óssea (Bouillon *et al.* 1995). Os níveis baixos de marcadores de remodelação óssea sugerem menor renovação óssea, podendo acumular danos em sua estrutura. O presente trabalho acrescentou que a porcentagem de gordura corporal e índice de massa gorda tiveram correlação negativa com os níveis séricos de CTX. Em concordância com estes resultados, Mosca *et al.* (2017) avaliaram 391 adolescentes e verificaram correlação negativa entre o CTX e a osteocalcina com o IMC e a massa gorda corporal (Mosca *et al.*, 2017). No presente trabalho também se observou relação negativa da osteocalcina e do CTX com a DMO. Em conjunto os baixos níveis séricos de marcadores de remodelação óssea em diabéticos sugerem que a menor taxa de remodelação óssea favorece a manutenção da massa óssea de indivíduos com DM2. Em reforço à estes dados o presente trabalho mostra existir correlação negativa entre o CTX e a conectividade, conn.D e o BV/TV, bem como correlação positiva do CTX com o espaçamento entre as trabéculas. Este é o primeiro trabalho que avaliou a relação do CTX com os parâmetros do trabeculado ósseo no DM2.

Os níveis séricos de adiponectina apresentaram correlação negativa com a taxa entre IMCL/EMCL. Estes resultados concordam com os resultados de Moom *et al.* (2018) onde a adiponectina teve relação positiva com o VAT e com o desenvolvimento da resistência à insulina. A adiponectina pode participar na redução dos níveis de glicose no plasma em camundongos submetidos a refeição hipergordurosa (Fruebis *et al.*, 2001), e diretamente regula o metabolismo da glicose e a sensibilidade à insulina em camundongos C57BL6J (Yamauchi *et al.*, 2002). A razão IMCL/EMCL apresentou correlação negativa com a osteocalcina e o CTX. A relação inversa entre os lipídeos intramusculares com a osteocalcina e o CTX sugere que a disfunção muscular por acúmulo tecidual de lipídeos tem papel não só no desenvolvimento das doenças crônicas, como por exemplo, o diabetes tipo 2, mas também tem papel no tecido ósseo. Esta relação inversa sugere que os lipídeos musculares contribuem para a diminuição da capacidade de reparação/renovação óssea dos pacientes com DM2 seja prejudicada, sendo um mecanismo provável para o surgimento de fragilidade esquelética. Trabalho recente acompanhou 34 adolescentes obesas por 1 ano e realizaram ultrassonografia de abdome e exames séricos de CTX e osteocalcina. Estes autores realizaram um programa de perda de peso corporal nestas voluntárias e encontraram resultados satisfatórios quanto a diminuição do peso atrelado a diminuição de massa gorda e aumento de massa magra. Mesmo com a diminuição do peso corporal não se observou alteração nos níveis séricos de osteocalcina e CTX, mas, em concordância com os resultados do presente estudo, se observou associação negativa da porcentagem de massa gorda com a osteocalcina (Campos *et al.* 2018). Possivelmente este é o primeiro trabalho a avaliar a relação dos lipídeos intramusculares com os marcadores de remodelação óssea nos indivíduos diabéticos.

Em conjunto, estes resultados sugerem que a fragilidade óssea no DM2 é multifatorial e envolve alterações no próprio tecido ósseo, capazes de diminuir sua qualidade e também alterações no metabolismo energético que podem influenciar a atividade de remodelação

óssea. Elucidar os mecanismos responsáveis por fragilidade óssea nos indivíduos diabéticos é importante para estabelecer novos métodos de prevenção das morbidades decorrentes das fraturas.

Conclusão

Possivelmente, este é o primeiro trabalho que avaliou o trabeculado ósseo por ressonância magnética em indivíduos com DM2. Em conjunto, os dados obtidos no presente estudo revelam que os indivíduos diabéticos não possuem prejuízo de massa óssea, nem alterações no trabeculado ósseo da tíbia proximal. Nesta doença, o tecido adiposo da medula óssea não se comportou como sítio de armazenamento de gordura e parece não ter relação negativa na massa óssea. Ainda, os resultados deste trabalho contemplam que a massa magra possui relação positiva com a densidade mineral óssea e a massa gorda, bem como os lipídeos intramusculares possuem relação negativa com o TBS. Os resultados acrescentam que o CTX, a osteocalcina e a adiponectina parecem ter efeito negativo na massa óssea e o CTX pode estar relacionado negativamente com os parâmetros do trabeculado ósseo. Este trabalho reforça que a resistência à insulina não tem efeito negativo na massa óssea.

Referências

ALBALA, C. *et al.* Obesity as a protective factor for postmenopausal osteoporosis. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 20, n. 11, p. 1027-32, Nov 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8923160> >.

BACHMANN, O. P. *et al.* Effects of intravenous and dietary lipid challenge on intramyocellular lipid content and the relation with insulin sensitivity in humans. **Diabetes**, v. 50, n. 11, p. 2579-84, Nov 2001. ISSN 0012-1797 (Print)

BAUMGARTNER, R. N. *et al.* Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. **Am J Epidemiol**, v. 147, n. 8, p. 755-63, Apr 15 1998. ISSN 0002-9262 (Print)

BIVER, E. *et al.* Influence of adipokines and ghrelin on bone mineral density and fracture risk: a systematic review and meta-analysis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 9, p. 2703-13, Sep 2011. ISSN 1945-7197 (Electronic)

BONDS, D. E. *et al.* Risk of fracture in women with type 2 diabetes: the Women's Health Initiative Observational Study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, n. 9, p. 3404-10, Sep 2006. ISSN 0021-972X (Print)

Bouillon, R. *et al.* Influence of age, sex, and insulin on osteoblast function: osteoblast dysfunction in diabetes mellitus. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 4, n. 80, p. 1194-202.

BOUSSON, V. *et al.* Trabecular bone score (TBS): available knowledge, clinical relevance, and future prospects. **Osteoporos Int**, v. 23, n. 5, p. 1489-501, May 2012. ISSN 1433-2965 (Electronic)

BOUTROY, S. *et al.* Trabecular bone score improves fracture risk prediction in non-osteoporotic women: the OFELY study. **Osteoporos Int**, v. 24, n. 1, p. 77-85, Jan 2013. ISSN 1433-2965 (Electronic)

BRANDT, C. *et al.* Plasma and muscle myostatin in relation to type 2 diabetes. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37236, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)

BREDELLA, M. A. *et al.* Increased bone marrow fat in anorexia nervosa. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 6, p. 2129-36, Jun 2009. ISSN 1945-7197 (Electronic)

BREDELLA, M. A. *et al.* Marrow Adipose Tissue Quantification of the Lumbar Spine by Using Dual-Energy CT and Single-Voxel (1)H MR Spectroscopy: A Feasibility Study. **Radiology**, v. 277, n. 1, p. 230-5, Oct 2015. ISSN 1527-1315 (Electronic)

CAMPOS, R. *et al.* Relationship between adiponectin and leptin on osteocalcin in obese adolescents during weight loss therapy. **Arch Endocrinol Metab**, v. 62, n. 3, p. 275-284, Jun 2018. ISSN 2359-4292 (Electronic)

CAMPOS, R. M. *et al.* Influence of visceral and subcutaneous fat in bone mineral density of obese adolescents. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 56, n. 1, p. 12-8, Feb 2012. ISSN 1677-9487 (Electronic)

CAWTHORN, W. P. *et al.* Bone marrow adipose tissue is an endocrine organ that contributes to increased circulating adiponectin during caloric restriction. **Cell Metab**, v. 20, n. 2, p. 368-375, Aug 5 2014. ISSN 1932-7420 (Electronic)

CLARK, E. M.; NESS, A. R.; TOBIAS, J. H. Adipose tissue stimulates bone growth in prepubertal children. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, n. 7, p. 2534-41, Jul 2006. ISSN 0021-972X (Print)

COLAIANNI, G.; GRANO, M. Role of Irisin on the bone-muscle functional unit. **Bonekey Rep**, v. 4, p. 765, 2015. ISSN 2047-6396 (Print)

COLLABORATORS, G. B. D. O. *et al.* Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. **N Engl J Med**, v. 377, n. 1, p. 13-27, Jul 6 2017. ISSN 1533-4406 (Electronic)

COMPSTON, J. E. *et al.* Obesity is not protective against fracture in postmenopausal women: GLOW. **Am J Med**, v. 124, n. 11, p. 1043-50, Nov 2011. ISSN 1555-7162 (Electronic)

CONFAVREUX, C. B.; LEVINE, R. L.; KARSENTY, G. A paradigm of integrative physiology, the crosstalk between bone and energy metabolisms. **Mol Cell Endocrinol**, v. 310, n. 1-2, p. 21-9, Oct 30 2009. ISSN 1872-8057 (Electronic)

CUTRIM, D. M. *et al.* Lack of relationship between glycemic control and bone mineral density in type 2 diabetes mellitus. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, n. 2, p. 221-7, Feb 2007. ISSN 0100-879X (Print)

DANFORTH, E., JR. Failure of adipocyte differentiation causes type II diabetes mellitus? **Nat Genet**, v. 26, n. 1, p. 13, Sep 2000. ISSN 1061-4036 (Print)

DE ARAUJO, I. M. *et al.* Marrow adipose tissue spectrum in obesity and type 2 diabetes mellitus. **Eur J Endocrinol**, v. 176, n. 1, p. 21-30, Jan 2017. ISSN 1479-683X (Electronic)

DE LAET, C. *et al.* Body mass index as a predictor of fracture risk: a meta-analysis. **Osteoporos Int**, v. 16, n. 11, p. 1330-8, Nov 2005. ISSN 0937-941X (Print)

DE LIEFDE, I. *et al.* Bone mineral density and fracture risk in type-2 diabetes mellitus: the Rotterdam Study. **Osteoporos Int**, v. 16, n. 12, p. 1713-20, Dec 2005. ISSN 0937-941X (Print)

DE PAULA, F. J. *et al.* The Relationship of Fat Distribution and Insulin Resistance with Lumbar Spine Bone Mass in Women. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0129764, 2015. ISSN 1932-6203.

DE PAULA, F. J.; HOROWITZ, M. C.; ROSEN, C. J. Novel insights into the relationship between diabetes and osteoporosis. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 26, n. 8, p. 622-30, Nov 2010. ISSN 1520-7560 (Electronic)

DEFRONZO, R. A. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 58, n. 4, p. 773-95, Apr 2009. ISSN 1939-327X (Electronic)

DHALIWAL, R. *et al.* Bone quality assessment in type 2 diabetes mellitus. **Osteoporos Int**, v. 25, n. 7, p. 1969-73, Jul 2014. ISSN 1433-2965 (Electronic)

DUCY, P. The role of osteocalcin in the endocrine cross-talk between bone remodelling and energy metabolism. **Diabetologia**, v. 54, n. 6, p. 1291-7, Jun 2011. ISSN 1432-0428 (Electronic)

DYTFELD, J.; MICHALAK, M. Type 2 diabetes and risk of low-energy fractures in postmenopausal women: meta-analysis of observational studies. **Aging Clin Exp Res**, v. 29, n. 2, p. 301-309, Apr 2017. ISSN 1720-8319 (Electronic)

FERRON, M. *et al.* Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. **Cell**, v. 142, n. 2, p. 296-308, Jul 23 2010. ISSN 1097-4172 (Electronic)

FROST, H. M. Bone's mechanostat: a 2003 update. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**, v. 275, n. 2, p. 1081-101, Dec 2003. ISSN 1552-4884 (Print)

FRUEBIS, J. *et al.* Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 4, p. 2005-10, Feb 13 2001. ISSN 0027-8424 (Print)

FULZELE, K. *et al.* Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. **Cell**, v. 142, n. 2, p. 309-19, Jul 23 2010. ISSN 1097-4172 (Electronic)

FURST, J. R. *et al.* Advanced Glycation Endproducts and Bone Material Strength in Type 2 Diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 101, n. 6, p. 2502-10, Jun 2016. ISSN 1945-7197 (Electronic)

GOULDING, A. *et al.* Overweight and obese children have low bone mass and area for their weight. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 24, n. 5, p. 627-32, May 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10849586>>.

HAMRICK, M. W.; MCPHERRON, A. C.; LOVEJOY, C. O. Bone mineral content and density in the humerus of adult myostatin-deficient mice. **Calcif Tissue Int**, v. 71, n. 1, p. 63-8, Jul 2002. ISSN 0171-967X (Print)

HANS, D. *et al.* Bone microarchitecture assessed by TBS predicts osteoporotic fractures independent of bone density: the Manitoba study. **J Bone Miner Res**, v. 26, n. 11, p. 2762-9, Nov 2011. ISSN 1523-4681 (Electronic)

HANS, D. *et al.* Correlations between trabecular bone score, measured using anteroposterior dual-energy X-ray absorptiometry acquisition, and 3-dimensional parameters of bone microarchitecture: an experimental study on human cadaver vertebrae. **J Clin Densitom**, v. 14, n. 3, p. 302-12, Jul-Sep 2011. ISSN 1094-6950 (Print)

HANS, D.; STENOVA, E.; LAMY, O. The Trabecular Bone Score (TBS) Complements DXA and the FRAX as a Fracture Risk Assessment Tool in Routine Clinical Practice. **Curr Osteoporos Rep**, v. 15, n. 6, p. 521-531, Dec 2017. ISSN 1544-2241 (Electronic)

HARDOUIN, P.; PANSINI, V.; CORTET, B. Bone marrow fat. **Joint Bone Spine**, v. 81, n. 4, p. 313-9, Jul 2014. ISSN 1778-7254 (Electronic)

HARVEY, N. C. *et al.* Trabecular bone score (TBS) as a new complementary approach for osteoporosis evaluation in clinical practice. **Bone**, v. 78, p. 216-24, Sep 2015. ISSN 1873-2763 (Electronic)

HEATH, H., 3RD; MELTON, L. J., 3RD; CHU, C. P. Diabetes mellitus and risk of skeletal fracture. **N Engl J Med**, v. 303, n. 10, p. 567-70, Sep 4 1980. ISSN 0028-4793 (Print)

HEILBRONN, L.; SMITH, S. R.; RAVUSSIN, E. Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 28 Suppl 4, p. S12-21, Dec 2004.

HINDORF, C. *et al.* EANM Dosimetry Committee guidelines for bone marrow and whole-body dosimetry. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 37, n. 6, p. 1238-50, Jun 2010. ISSN 1619-7089 (Electronic)

HOLZER, G. *et al.* Hip fractures and the contribution of cortical versus trabecular bone to femoral neck strength. **J Bone Miner Res**, v. 24, n. 3, p. 468-74, Mar 2009. ISSN 1523-4681 (Electronic)

HOTTA, K. *et al.* Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, n. 6, p. 1595-9, Jun 2000. ISSN 1079-5642 (Print)

IKI, M. *et al.* Hyperglycemia is associated with increased bone mineral density and decreased trabecular bone score in elderly Japanese men: The Fujiwara-kyo osteoporosis risk in men (FORMEN) study. **Bone**, v. 105, p. 18-25, Dec 2017. ISSN 1873-2763 (Electronic)

JANGHORBANI, M. *et al.* Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. **Am J Epidemiol**, v. 166, n. 5, p. 495-505, Sep 1 2007. ISSN 0002-9262 (Print)

JANSSON, J. O. *et al.* Body weight homeostat that regulates fat mass independently of leptin in rats and mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 115, n. 2, p. 427-432, Jan 9 2018. ISSN 1091-6490 (Electronic)

JILKA, R. L. *et al.* Quantifying osteoblast and osteocyte apoptosis: challenges and rewards. **J Bone Miner Res**, v. 22, n. 10, p. 1492-501, Oct 2007. ISSN 0884-0431 (Print)

JURIMAE, J. *et al.* The influence of ghrelin, adiponectin, and leptin on bone mineral density in healthy postmenopausal women. **J Bone Miner Metab**, v. 26, n. 6, p. 618-23, 2008. ISSN 0914-8779 (Print)

JUSTESEN, J. *et al.* Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. **Biogerontology**, v. 2, n. 3, p. 165-71, 2001. ISSN 1389-5729 (Print)

KAJI, H. Linkage between muscle and bone: common catabolic signals resulting in osteoporosis and sarcopenia. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 16, n. 3, p. 272-7, May 2013. ISSN 1473-6519 (Electronic)

KAJIMURA, D. *et al.* Adiponectin regulates bone mass via opposite central and peripheral mechanisms through FoxO1. **Cell Metab**, v. 17, n. 6, p. 901-15, Jun 4 2013. ISSN 1932-7420 (Electronic)

KARIM, L.; VASHISHTH, D. Heterogeneous glycation of cancellous bone and its association with bone quality and fragility. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35047, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)

KAWAI, M.; DE PAULA, F. J.; ROSEN, C. J. New insights into osteoporosis: the bone-fat connection. **J Intern Med**, v. 272, n. 4, p. 317-29, Oct 2012. ISSN 1365-2796 (Electronic)

KAWAI, M.; ROSEN, C. J. PPARgamma: a circadian transcription factor in adipogenesis and osteogenesis. **Nat Rev Endocrinol**, v. 6, n. 11, p. 629-36, Nov 2010. ISSN 1759-5037 (Electronic)

KELLY, T. L.; WILSON, K. E.; HEYMSFIELD, S. B. Dual energy X-Ray absorptiometry body composition reference values from NHANES. **PLoS One**, v. 4, n. 9, p. e7038, Sep 15 2009. ISSN 1932-6203 (Electronic)

KIJOWSKI, R. *et al.* Evaluation of trabecular microarchitecture in nonosteoporotic postmenopausal women with and without fracture. **J Bone Miner Res**, v. 27, n. 7, p. 1494-500, Jul 2012. ISSN 1523-4681 (Electronic)

KIM, G. S. *et al.* Reduced serum total osteocalcin is associated with central obesity in Korean children. **Obes Res Clin Pract**, v. 8, n. 3, p. e201-98, May-Jun 2014. ISSN 1871-403X (Print)

KRUG, R. *et al.* In vivo ultra-high-field magnetic resonance imaging of trabecular bone microarchitecture at 7 T. **J Magn Reson Imaging**, v. 27, n. 4, p. 854-9, Apr 2008. ISSN 1053-1807 (Print)

KUME, S. *et al.* Advanced glycation end-products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone. **J Bone Miner Res**, v. 20, n. 9, p. 1647-58, Sep 2005. ISSN 0884-0431 (Print)

LANDI, F.; ONDER, G.; BERNABEI, R. Sarcopenia and diabetes: two sides of the same coin. **J Am Med Dir Assoc**, v. 14, n. 8, p. 540-1, Aug 2013. ISSN 1538-9375 (Electronic)

LAUBY-SECRETAN, B. *et al.* Body Fatness and Cancer--Viewpoint of the IARC Working Group. **N Engl J Med**, v. 375, n. 8, p. 794-8, Aug 25 2016. ISSN 1533-4406 (Electronic)

LEE, N. K. *et al.* Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. **Cell**, v. 130, n. 3, p. 456-69, Aug 10 2007. ISSN 0092-8674 (Print)

LEE, S. W. *et al.* Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. **J Am Soc Nephrol**, v. 15, n. 6, p. 1537-45, Jun 2004. ISSN 1046-6673 (Print)

LEONARD, M. B. *et al.* Obesity during childhood and adolescence augments bone mass and bone dimensions. **Am J Clin Nutr**, v. 80, n. 2, p. 514-23, Aug 2004. ISSN 0002-9165 (Print)

LESLIE, W. D. *et al.* Risk-equivalent T-score adjustment for using lumbar spine trabecular bone score (TBS): the Manitoba BMD registry. **Osteoporos Int**, v. 29, n. 3, p. 751-758, Mar 2018. ISSN 1433-2965 (Electronic)

LI, Z. *et al.* Development, regulation, metabolism and function of bone marrow adipose tissues. **Bone**, v. 110, p. 134-140, May 2018. ISSN 1873-2763 (Electronic)

LIANG, Y. *et al.* Low osteocalcin level is a risk factor for impaired glucose metabolism in a Chinese male population. **J Diabetes Investig**, v. 7, n. 4, p. 522-8, Jul 2016. ISSN 2040-1124 (Electronic)

LIMA, J. G. *et al.* Bone Density in Patients With Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy Is Higher in Trabecular Sites and in Type 2 Patients. **J Clin Densitom**, v. 21, n. 1, p. 61-67, Jan - Mar 2018. ISSN 1094-6950 (Print)

LOZANO, R. *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095-128, Dec 15 2012. ISSN 1474-547X (Electronic)

MACIEL, J. G. *et al.* Marrow Fat Quality Differences by Sex in Healthy Adults. **J Clin Densitom**, v. 20, n. 1, p. 106-113, Jan - Mar 2017. ISSN 1094-6950 (Print)

MAJUMDAR, S. *et al.* Correlation of trabecular bone structure with age, bone mineral density, and osteoporotic status: in vivo studies in the distal radius using high resolution

magnetic resonance imaging. **J Bone Miner Res**, v. 12, n. 1, p. 111-8, Jan 1997. ISSN 0884-0431 (Print)

MAJUMDAR, S.; GENANT, H. K. High resolution magnetic resonance imaging of trabecular structure. **Eur Radiol**, v. 7, n. 10, p. 51-5, Feb 21 1997. ISSN 1432-1084 (Electronic)

MANOLAGAS, S. C.; ALMEIDA, M. Gone with the Wnts: beta-catenin, T-cell factor, forkhead box O, and oxidative stress in age-dependent diseases of bone, lipid, and glucose metabolism. **Mol Endocrinol**, v. 21, n. 11, p. 2605-14, Nov 2007. ISSN 0888-8809 (Print)

MANZONI, P. et al. Influence of body composition on bone mineral content in children and adolescents. **Am J Clin Nutr**, v. 64, n. 4, p. 603-7, Oct 1996. ISSN 0002-9165 (Print)

MCCARTHY, A. D. et al. Advanced glycation endproducts interfere with integrin-mediated osteoblastic attachment to a type-I collagen matrix. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 5, p. 840-8, May 2004. ISSN 1357-2725 (Print)

MEUNIER, P. et al. Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. A quantitative study of 84 iliac bone biopsies. **Clin Orthop Relat Res**, v. 80, p. 147-54, Oct 1971. ISSN 0009-921X (Print)

MOON, H. U. et al. The Association of Adiponectin and Visceral Fat with Insulin Resistance and beta-Cell Dysfunction. **J Korean Med Sci**, v. 34, n. 1, p. e7, Jan 7 2019. ISSN 1598-6357 (Electronic)

MOSCA, L. N. et al. The impact of excess body fat on bone remodeling in adolescents. **Osteoporos Int**, v. 28, n. 3, p. 1053-1062, Mar 2017. ISSN 1433-2965 (Electronic)

MOYER-MILEUR, L. J. et al. IGF-1 and IGF-binding proteins and bone mass, geometry, and strength: relation to metabolic control in adolescent girls with type 1 diabetes. **J Bone Miner Res**, v. 23, n. 12, p. 1884-91, Dec 2008. ISSN 1523-4681 (Electronic)

MPALARIS, V. et al. Serum leptin, adiponectin and ghrelin concentrations in post-menopausal women: Is there an association with bone mineral density? **Maturitas**, v. 88, p. 32-6, Jun 2016. ISSN 1873-4111 (Electronic)

MUSCHITZ, C. et al. TBS reflects trabecular microarchitecture in premenopausal women and men with idiopathic osteoporosis and low-traumatic fractures. **Bone**, v. 79, p. 259-66, Oct 2015. ISSN 1873-2763 (Electronic)

NAPOLI, N. *et al.* Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. **Nat Rev Endocrinol**, v. 13, n. 4, p. 208-219, Apr 2017. ISSN 1759-5037 (Electronic)

NAPOLITANI, F. [Psychomaieutics: a new analytical and existential method of psychotherapy]. **Arch Psicol Neurol Psichiatr**, v. 30, n. 1, p. 73-6, Jan-Feb 1969. ISSN 0004-0150 (Print)

NUTTALL, M. E.; GIMBLE, J. M. Is there a therapeutic opportunity to either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis? **Bone**, v. 27, n. 2, p. 177-84, Aug 2000. ISSN 8756-3282 (Print)

OKAZAKI, R. *et al.* Metabolic improvement of poorly controlled noninsulin-dependent diabetes mellitus decreases bone turnover. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, n. 9, p. 2915-20, Sep 1997. ISSN 0021-972X (Print)

PARK, S. W. *et al.* Decreased muscle strength and quality in older adults with type 2 diabetes: the health, aging, and body composition study. **Diabetes**, v. 55, n. 6, p. 1813-8, Jun 2006. ISSN 0012-1797

PATSCH, J. M. *et al.* Bone marrow fat composition as a novel imaging biomarker in postmenopausal women with prevalent fragility fractures. **J Bone Miner Res**, v. 28, n. 8, p. 1721-8, Aug 2013. ISSN 1523-4681 (Electronic)

PATSCH, J. M. *et al.* Increased cortical porosity in type 2 diabetic postmenopausal women with fragility fractures. **J Bone Miner Res**, v. 28, n. 2, p. 313-24, Feb 2013. ISSN 1523-4681 (Electronic)

PETIT, M. A. *et al.* Proximal femur bone geometry is appropriately adapted to lean mass in overweight children and adolescents. **Bone**, v. 36, n. 3, p. 568-76, Mar 2005. ISSN 8756-3282 (Print)

POLLOCK, N. K. *et al.* Is adiposity advantageous for bone strength? A peripheral quantitative computed tomography study in late adolescent females. **Am J Clin Nutr**, v. 86, n. 5, p. 1530-8, Nov 2007. ISSN 0002-9165 (Print)

PREMAOR, M. O. *et al.* Obesity and fractures in postmenopausal women. **J Bone Miner Res**, v. 25, n. 2, p. 292-7, Feb 2010. ISSN 1523-4681 (Electronic)

PRIETO-ALHAMBRA, D. *et al.* The association between fracture and obesity is site-dependent: a population-based study in postmenopausal women. **J Bone Miner Res**, v. 27, n. 2, p. 294-300, Feb 2012. ISSN 1523-4681 (Electronic)

REID, I. R. Fat and bone. **Arch Biochem Biophys**, v. 503, n. 1, p. 20-7, Nov 1 2010. ISSN 1096-0384 (Electronic)

RICHARDS, J. B. *et al.* Serum adiponectin and bone mineral density in women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 4, p. 1517-23, Apr 2007. ISSN 0021-972X (Print)

ROSEN, C. J. Sugar and bone: a not-so sweet story. **J Bone Miner Res**, v. 23, n. 12, p. 1881-3, Dec 2008. ISSN 1523-4681 (Electronic)

ROSEN, C. J.; BOUXSEIN, M. L. Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? **Nat Clin Pract Rheumatol**, v. 2, n. 1, p. 35-43, Jan 2006. ISSN 1745-8382 (Print)

RUBIN, M. R.; PATSCH, J. M. Assessment of bone turnover and bone quality in type 2 diabetic bone disease: current concepts and future directions. **Bone Res**, v. 4, p. 16001, 2016. ISSN 2095-4700 (Print)

RUSSELL, A. P. Lipotoxicity: the obese and endurance-trained paradox. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 28 Suppl 4, p. S66-71, Dec 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15592489>>.

RUSSELL, M. *et al.* Visceral fat is a negative predictor of bone density measures in obese adolescent girls. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 3, p. 1247-55, Mar 2010. ISSN 0021-972x.

RUSSELL, M.; MISRA, M. Influence of ghrelin and adipocytokines on bone mineral density in adolescent female athletes with amenorrhea and eumenorrheic athletes. **Med Sport Sci**, v. 55, p. 103-13, 2010. ISSN 0254-5020 (Print)

SAITO, M.; MARUMO, K. Effects of Collagen Crosslinking on Bone Material Properties in Health and Disease. **Calcif Tissue Int**, v. 97, n. 3, p. 242-61, Sep 2015. ISSN 1432-0827 (Electronic)

SAMUEL, V. T.; PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. **Lancet**, v. 375, n. 9733, p. 2267-77, Jun 26 2010. ISSN 1474-

SCHELLER, E. L. *et al.* Bone marrow adipocytes resist lipolysis and remodeling in response to beta-adrenergic stimulation. **Bone**, v. 118, p. 32-41, Jan 2019. ISSN 1873-2763 (Electronic)

SCHELLER, E. L. *et al.* Region-specific variation in the properties of skeletal adipocytes reveals regulated and constitutive marrow adipose tissues. **Nat Commun**, v. 6, p. 7808, Aug 6 2015. ISSN 2041-1723 (Electronic)

SCHWARTZ, A. V. *et al.* Older women with diabetes have an increased risk of fracture: a prospective study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 1, p. 32-8, Jan 2001. ISSN 0021-972X (Print)

SCHWARTZ, A. V. Epidemiology of fractures in type 2 diabetes. **Bone**, v. 82, p. 2-8, Jan 2016. ISSN 1873-2763 (Electronic)

SEEMAN, E. Is a change in bone mineral density a sensitive and specific surrogate of anti-fracture efficacy? **Bone**, v. 41, n. 3, p. 308-17, Sep 2007. ISSN 8756-3282 (Print)

SEMPLE, R. K. EJE PRIZE 2015: How does insulin resistance arise, and how does it cause disease? Human genetic lessons. **Eur J Endocrinol**, v. 174, n. 5, p. R209-23, May 2016. ISSN 1479-683X (Electronic)

SINGH, G. M. *et al.* The age-specific quantitative effects of metabolic risk factors on cardiovascular diseases and diabetes: a pooled analysis. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e65174, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic)

SIRIS, E. S. *et al.* Identification and fracture outcomes of undiagnosed low bone mineral density in postmenopausal women: results from the National Osteoporosis Risk Assessment. **JAMA**, v. 286, n. 22, p. 2815-22, Dec 12 2001. ISSN 0098-7484 (Print)

STEFAN, N.; SCHICK, F.; HARING, H. U. Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. **N Engl J Med**, v. 371, n. 23, p. 2236-7, Dec 4 2014. ISSN 1533-4406 (Electronic)

STEIN, E. M. *et al.* Abnormal microarchitecture and reduced stiffness at the radius and tibia in postmenopausal women with fractures. **J Bone Miner Res**, v. 25, n. 12, p. 2572-81, Dec 2010. ISSN 1523-4681 (Electronic)

TSATSOULIS, A. *et al.* Insulin resistance: an adaptive mechanism becomes maladaptive in the current environment - an evolutionary perspective. **Metabolism**, v. 62, n. 5, p. 622-33, May 2013. ISSN 1532-8600 (Electronic)

UNGER, R. H.; SCHERER, P. E. Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to lipotoxicity. **Trends Endocrinol Metab**, v. 21, n. 6, p. 345-52, Jun 2010. ISSN 1879-3061 (Electronic)

VESTERGAARD, P.; REJNMARK, L.; MOSEKILDE, L. Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk. **Diabetologia**, v. 48, n. 7, p. 1292-9, Jul 2005. ISSN 0012-186X (Print)

VOGT, M. T. *et al.* Distal radius fractures in older women: a 10-year follow-up study of descriptive characteristics and risk factors. The study of osteoporotic fractures. **J Am Geriatr Soc**, v. 50, n. 1, p. 97-103, Jan 2002. ISSN 0002-8614 (Print)

WEILER, H. A. *et al.* Percent body fat and bone mass in healthy Canadian females 10 to 19 years of age. **Bone**, v. 27, n. 2, p. 203-7, Aug 2000. ISSN 8756-3282 (Print)

WEISS, R. Fat distribution and storage: how much, where, and how? **Eur J Endocrinol**, v. 157 Suppl 1, p. S39-45, Aug 2007. ISSN 0804-4643 (Print)

WETZSTEON, R. J. *et al.* Bone structure and volumetric BMD in overweight children: a longitudinal study. **J Bone Miner Res**, v. 23, n. 12, p. 1946-53, Dec 2008. ISSN 1523-4681 (Electronic)

YAMAUCHI, T. *et al.* Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nat Med**, v. 8, n. 11, p. 1288-95, Nov 2002. ISSN 1078-8956 (Print)

YU, E. W. *et al.* Marrow adipose tissue composition in adults with morbid obesity. **Bone**, v. 97, p. 38-42, Apr 2017. ISSN 1873-2763 (Electronic)

Anexos

Anexo I

**CENTRO DE SAÚDE ESCOLA
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

OF. 016/2016-CEP/CSE-FMRP-USP

Ribeirão Preto, 14 de Março de 2016.

Prezada Senhora,

Comunicamos que o projeto de pesquisa abaixo especificado foi analisado e **APROVADO** "ad referendum" do Comitê de Ética em pesquisa do Centro de Saúde Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na data de 11 de Março de 2016.

CAAE: 52563116.7.0000.5414

Projeto de pesquisa: "Acometimento muscular e esquelético por acúmulo tecidual de gordura no diabetes melito tipo 2"

Pesquisadora: Iana Mizumukai de Araújo

Em atendimento à Resolução 466/12, deverá ser encaminhado a este CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer intercorrência ou a sua interrupção.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Laércio Joel Franco
Coordenador do CEP/CSE-FMRP-USP

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Francisco José Albuquerque de Paula
Docente do Departamento de Clínica Médica da FMRP/USP

Anexo II

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Pacientes portadores de diabetes melito tipo 2)****TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA**

Acometimento muscular e esquelético por acúmulo tecidual de gordura no diabetes melito tipo 2

Pesquisadora: Iana Mizumukai de Araújo / Orientador: Prof. Dr. Francisco José Albuquerque de Paula

Sr(a). Paciente,

O (a) senhor (a) é portador (a) de diabetes melito tipo 2. Convidamos o (a) senhor (a) a **participar desta pesquisa** que irá avaliar diversos aspectos da **evolução da doença óssea metabólica em pessoas com diabetes melito tipo 2 (DM2)**. A doença óssea metabólica é um “enfraquecimento” dos ossos que pode ser grande (neste caso, chamamos de osteoporose) ou pequeno (neste caso, chamamos de osteopenia). Com essa pesquisa, desejamos saber se o (a) senhor (a) tem osteoporose ou osteopenia. Também queremos pesquisar a ocorrência de fratura da coluna e a quantidade de gordura na medula do osso. Assim, tentaremos entender um pouco mais da osteoporose e osteopenia na sua doença. Caso o (a) senhor (a) aceite entrar para a pesquisa, deverá participar das seguintes etapas:

a) Fará uma coleta de sangue para exames que fazem parte desta pesquisa (glicemia de jejum, insulina, leptina, adiponectina, albumina, creatinina, TGO, TGP, fósforo inorgânico, fosfatase alcalina, paratormônio (PTH), vitamina D, cálcio total, osteocalcina e telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo 1 e IGF-1). A picada da agulha vai doer um pouco e poderá acontecer um pequeno hematoma no local da punção. A quantidade de sangue retirada vai ser o equivalente a três colheres de sopa. Esta coleta de sangue será realizada somente uma vez.

b) Fará um exame de densitometria óssea. Esse exame vai acontecer em uma data agendada conforme sua disponibilidade. No dia marcado, o (a) senhor (a) deverá comparecer no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e, assim, saber se tem massa óssea normal, osteoporose ou osteopenia. O exame de densitometria óssea não dói, dura **cerca de 15 minutos** e não precisa de jejum. Ele envolve uma quantidade muito pequena de radiação, sendo bem menos do que a radiação de uma radiografia do pulmão. Este exame será realizado somente uma vez durante a pesquisa.

c) **Fará uma ressonância magnética** para ver a quantidade de gordura do osso da coluna, no abdome, músculo da panturrilha e no fígado, pois desejamos saber se está aumentada em quem tem DM2. Esse exame será agendado conforme sua disponibilidade. Vai durar **cerca de 40 minutos**, também não dói e não tem radiação. Pode haver algum desconforto por causa do barulho do aparelho. Algumas pessoas incomodam-se com o fato de ter que se deitar dentro de um tubo semifechado. Este exame será realizado somente uma vez durante a pesquisa.

As informações coletadas como parte deste estudo serão destruídas quando não forem mais necessárias?

Nós não sabemos quando suas informações deixarão de ser utilizadas, e não existe prazo para expiração das informações. Porém, somente os resultados dos seus exames serão utilizados, não sendo, de forma alguma, disponibilizada alguma informação que te identifique, como nome, RG e CPF.

Caso seja consentindo pelo senhor (a), as suas amostras de sangue serão armazenadas por tempo indeterminado em biorrepositório sob custódia do Prof. Dr. Francisco José A. de Paula e qualquer uso que não conste neste termo só será realizado com o seu consentimento posterior. E caso seja cogitado o uso de alguma amostra de soro para o uso futuro dessas informações, novo projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). A retirada do consentimento de guarda das suas amostras de sangue em biorrepositório poderá ser feita a qualquer momento, com validade a partir da data da sua decisão, por meio de documento assinado pelo senhor (a) ou contato por telefone da pesquisadora Iana M. de Araujo (16-36022938).

Eu posso interromper minhas informações após elas começarem a ser utilizadas?

Se o(a) senhor (a) deixar o estudo, e não desejar ter mais nenhuma informação pessoal coletada, sobre o(a) senhor (a) deverá notificar por escrito ao Dr. Francisco J. A. de Paula. O (a) senhor (a) poderá também entrar em contato com a Pesquisadora Iana Mizumukai de Araújo por telefone (16) 981550524/36022938 e sua solicitação de interromper a coleta de informações será honrada. Para notificar ao Dr. Francisco J. A. de Paula, por escrito, envie sua solicitação para: Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, Ribeirão Preto SP.

O que acontecerá se eu sofrer danos por participar neste estudo?

Em caso de dano ou doença resultante deste estudo clínico, o tratamento de emergência médica está disponível. O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto não compensará o (a) senhor (a) ou sua companhia de seguro no evento de qualquer dano. Porém, o senhor (a) tem o direito de procurar obter indenização por danos eventuais através dos meios legais vigentes na Legislação Brasileira.

Quais são os meus direitos como um participante?

Fazer parte deste estudo é uma escolha sua. Você pode escolher não participar ou pode deixar de participar do estudo a qualquer momento. Deixar de participar do estudo não resultará em nenhuma penalidade ou perda de benefícios que o (a) senhor (a) tem direito.

Caso o (a) senhor (a) desistir de participar da pesquisa, **NÃO terá nenhum prejuízo de seu atendimento regular nas unidades de saúde.**

O (a) Sr(a), tem o direito de ter acesso a todos os resultados dos seus exames. Não existe nenhum custo para você ou responsável em participar deste estudo. Ressaltamos que não haverá identificação dos dados pessoais, pois serão de **natureza confidencial**, usados unicamente para fins da pesquisa. Estamos à disposição para **esclarecer qualquer dúvida**. O benefício desta pesquisa para o senhor (a) é a realização dos exames de sangue e de imagem, bem como ter acesso aos seus resultados e laudos e também esperamos que no futuro, estes resultados **possam beneficiar outros pacientes**. Este documento será emitido em duas vias, sendo uma de sua propriedade e a outra será arquivada por nós. Caso o (a) senhor (a) **não concorde em participar** dessa pesquisa, seu **acompanhamento clínico em todas as Unidades de Saúde será feito da mesma maneira**, sem prejuízo algum.

Caso necessite de esclarecimentos adicionais, poderá entrar em contato com:

Pesquisador Principal: Francisco José Albuquerque de Paula, (16) 3602-2938

Demais Pesquisadores: Iana Mizumukai de Araújo, (16) 981550524 ou e-mail: iana.mizumukai@gmail.com

____/____/____

Nome do sujeito de pesquisa

Assinatura

Data

__/__/____

Testemunha imparcial

Assinatura

Data

__/__/____

Nome do pesquisador

Assinatura

Data

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Voluntários saudáveis)

TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA

Acometimento muscular e esquelético por acúmulo tecidual de gordura no diabetes melito
tipo 2

Pesquisadora: Iana Mizumukai de Araújo / Orientador: Prof. Dr. Francisco José Albuquerque de Paula

Sr(a),

Convidamos o (a) senhor (a) a **participar desta pesquisa** que irá avaliar diversos aspectos da **evolução da doença óssea metabólica em pessoas com diabetes melito tipo 2 (DM2)**. A doença óssea metabólica é um “enfraquecimento” dos ossos que pode ser grande (neste caso, chamamos de osteoporose) ou pequeno (neste caso, chamamos de osteopenia).

Com essa pesquisa, desejamos saber se os pacientes que tem DM2 tem massa óssea normal, osteoporose ou osteopenia. Também queremos pesquisar a quantidade de gordura na sua medula do osso. Assim, tentaremos entender um pouco mais sobre o enfraquecimento ósseo nessa doença. **Como o (a) senhor (a) não tem diabetes melito tipo 2, vai ser muito importante para servir como comparação.**

Caso o (a) senhor (a) aceite entrar para a pesquisa, deverá participar das seguintes etapas:

a) Fará uma coleta de sangue para exames que fazem parte desta pesquisa (glicemia de jejum, insulina, leptina, adiponectina, albumina, creatinina, TGO, TGP, fósforo inorgânico, fosfatase alcalina, paratormônio (PTH), vitamina D, cálcio total, osteocalcina e telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo 1 e IGF-1). A picada da agulha vai doer um pouco e poderá acontecer um pequeno hematoma no local da punção. A quantidade de sangue retirada vai ser o equivalente a três colheres de sopa. Será realizada a coleta de sangue somente uma vez durante o período do estudo.

c) Fará um exame de densitometria óssea. Esse exame vai acontecer em uma data agendada conforme sua disponibilidade. No dia marcado, o (a) senhor (a) deverá comparecer no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e, assim, saber se tem massa óssea normal, osteoporose ou osteopenia. Esse exame também vai ver fratura se em sua coluna há alguma fratura, que pode ocorrer mesmo quando a pessoa não sente dor na coluna. O exame de densitometria óssea não dói, dura **cerca de 15 minutos** e não precisa de jejum. Ele envolve

uma quantidade muito pequena de radiação, sendo bem menos do que a radiação de uma radiografia do pulmão. Este exame é realizado somente uma vez durante a pesquisa.

Fará uma ressonância magnética para ver a quantidade de gordura do osso da coluna, no abdome, músculo da panturrilha e no fígado, pois desejamos saber se está aumentada em quem tem DM2. Esse exame será agendado conforme sua disponibilidade. Vai durar **cerca de 40 minutos**, também não dói e não tem radiação. Pode haver algum desconforto por causa do barulho do aparelho. Algumas pessoas incomodam-se com o fato de ter que se deitar dentro de um tubo semifechado. Este exame será realizado somente uma vez durante a pesquisa.

As informações coletadas como parte deste estudo serão destruídas quando não forem mais necessárias?

Nós não sabemos quando suas informações deixarão de ser utilizadas para esta pesquisa. Porém, somente os resultados dos seus exames serão utilizados, não sendo, de forma alguma, disponibilizada alguma informação que te identifique, como nome, RG e CPF.

Caso seja consentindo pelo senhor (a), as suas amostras de sangue serão armazenadas por tempo indeterminado em biorrepositório sob custódia do Prof. Dr. Francisco José Albuquerque de Paula e qualquer uso que não conste neste termo só será realizado com o seu prévio consentimento. E para o uso futuro dessas informações, novo projeto será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). A retirada do consentimento de guarda das suas amostras de sangue em biorrepositório poderá ser feita a qualquer momento, com validade a partir da data da sua decisão, por contato telefônico ou e-mail (16-36022938 ou iana.mizumukai@gmail.com).

Eu posso interromper minhas informações após elas começarem a ser utilizadas?

Se o(a) senhor (a) deixar o estudo, e não desejar ter mais nenhuma informação pessoal coletada, sobre o(a) senhor (a) deverá notificar por escrito ao Dr. Francisco J. A. de Paula. O (a) senhor (a) poderá também entrar em contato com a Pesquisadora Iana Mizumukai de Araújo por telefone (16) 981550524/36022938 e sua solicitação de interromper a coleta de informações será honrada. Para notificar ao Dr. Francisco J. A. de Paula, por escrito, envie sua solicitação para: Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, Ribeirão Preto SP.

O que acontecerá se eu sofrer danos por participar neste estudo?

Em caso de dano ou doença resultante deste estudo clínico, o tratamento de emergência médica está disponível. O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto não compensará o (a) senhor (a) ou sua companhia de seguro no evento de qualquer dano. Porém, o senhor (a) tem o direito de procurar obter indenização por danos eventuais através dos meios legais vigentes na Legislação Brasileira.

Quais são os meus direitos como um participante?

Fazer parte deste estudo é uma escolha sua. Você pode escolher não participar ou pode deixar de participar do estudo a qualquer momento. Deixar de participar do estudo não resultará em nenhuma penalidade ou perda de benefícios que o (a) senhor (a) tem direito.

Caso o (a) senhor (a) desistir de participar da pesquisa, **NÃO terá nenhum prejuízo de seu atendimento regular nas unidades de saúde.**

O (a) Sr(a), tem o direito de ter acesso aos resultados dos seus exames e caso seja solicitado, terá acesso a todos os resultados que desejar. Não existe nenhum custo para você ou responsável em participar deste estudo. Ressaltamos que não haverá identificação dos seus dados pessoais, pois serão de **natureza confidencial**, usados unicamente para fins da pesquisa. Estamos à disposição para **esclarecer qualquer dúvida**. O benefício desta pesquisa para o senhor (a) é a realização dos exames de sangue e de imagem, bem como ter acesso aos seus resultados e laudos e também esperamos que no futuro, estes resultados **possam beneficiar outros pacientes**. Este documento será emitido em duas vias, sendo uma de sua propriedade e a outra será arquivada por nós. Caso o (a) senhor (a) **não concorde em participar** dessa pesquisa, seu **acompanhamento clínico será feito da mesma maneira**, sem prejuízo algum.

Caso necessite de esclarecimentos adicionais, poderá entrar em contato com:

Pesquisador Principal: Francisco José Albuquerque de Paula, (16) 3602-2938 ou e-mail: fjpaula@fmrp.usp.br

Demais Pesquisadores: Iana Mizumukai de Araújo, (16) 981550524 ou e-mail: iana.mizumukai@gmail.com

_____ __/__/____	_____	_____
Nome do sujeito de pesquisa	Assinatura	Data
_____ __/__/____	_____	_____
Testemunha imparcial	Assinatura	Data
_____ __/__/____	_____	_____
Nome do pesquisador	Assinatura	Data

Anexo III

PROTOCOLO DE PROCESSAMENTO DE MICRO-RESSONÂNCIA DA TÍBIA

BAIXAR IMAGENS NO KPACS

- Do lado esquerdo no QUERY, seleccionar NETWORK
- Procurar pelo nome ou data do exame
- Seleccionar a imagem clicando no ícone branco e depois em RETRIEVE
- Do lado esquerdo no QUERY, seleccionar DATABASE
- Seleccionar a imagem e clicar em EXPORT
- Clicar em BURN ON CD/DVD
- Escolher um conhecido diretório clicando na pasta
- Clicar em Create CD Project → colocar o nome do voluntário
- A imagem será salva em DICOM

BINARIZAÇÃO NO SLICER

- Para abrir a imagem: clicar em DICOM browser
- Ir em IMPORT e escolher a pasta
- Escolher a imagem e clicar em LOAD
- Após as imagens abertas, clicar em MODULO → Editor → OK
- No espaço Master volume de estar seleccionada a imagem 3D_b_FFE_PERNA ESQ
- No espaço Merge Volume deve estar seleccionada a imagem 3D_b_FFE_PERNA ESQ-label
- Pintar a CORTICAL de verde (número 1), usar pincel tamanho 2 pixels
- Pintar o TRABECULADO de amarelo (número 2), usar pincel tamanho 2 pixels, clicar em 8 vizinhos e clicar no DILATE EFFECT 20 vezes
- Seleccionar em MODULES → HCFMRP → Trabeculado
- No espaço GRAYSCALE VOLUME seleccionar o arquivo 3D_b_FFE_PERNA ESQ

- No espaço LABEL MAP selecionar 3D_b_FFE_PERNA ESQ-label
- ROI Label Value: 2 (amarelo)
- Cortical Bone Label Value: 1 (verde)
- Clicar em APPLY
- No canto superior esquerdo das imagens clicar no alfinete → Desligar Label (none) → Desligar F (none) → E em Background (B) selecionar RESULT VOLUME
- Clicar em EXPORT e copiar os dados do histograma colando no Excel
- Renomear para 3D_FFE_PernaESQ_Result e apertar OK
- Salvar como formato NIFTI nome do voluntário em uma pasta → Ressonância Tibia

ANÁLISES NO BONE J

- Clicar em IMPORTAR → NIfTI analyze (necessita instalação de *plugin*)
- Clicar em IMAGE TYPE → 8-bit
- Clicar em IMAGE → TOOLS→MAKE SUBSTACK→ colocar o número das fatias a selecionar, usando hífen para separar os números
- Selecionar o quadrado com a ferramenta de seleção
- IMAGE → CROP
- Plugins → BONE J → Connectivity, Volume Fraction
- Salvar com nome do participante na pasta conhecida

Apêndices

Apêndice A – Análise de regressão linear simples e múltipla dos parâmetros

	Modelo 1			Modelo 2		
	Estimativa	p valor	R ²	Estimativa	p valor	R ²
IMC x DMO CF	14,8	0,0002	0,13	14,8	0,0003	0,13
IMC x DMO FT	14,3	0,0003	0,12	14,2	0,0003	0,13
% GC x DMO FT	-9,7	0,07	0,03	-21,2	<0,0001	0,34
% GC x DMO 1/3 Rádio	-47,6	<0,0001	0,19	-42,5	<0,0001	0,36
IMG x DMO CF	7,5	0,01	0,06	-1,65	0,3	0,65
IMG x DMO FT	4,12	0,15	0,02	-5,1	0,006	0,67
IMG x DMO 1/3 Rádio	-16,32	0,004	0,08	-12	0,0004	0,69
IMM x DMO L1-L4	2,8	0,02	0,05	1,6	0,1	0,39
IMM x DMO CF	4,8	<0,0001	0,17	2,4	0,01	0,42
IMM x DMO FT	5,6	<0,0001	0,24	3,5	0,0003	0,46
IMM x DMO 1/3 Rádio	6,7	0,003	0,08	8	<0,0001	0,5
DMO CF x HbA1c	0,01	0,01	0,06	0,013	0,05	0,18
DMO FT x HbA1c	0,018	0,009	0,06	0,01	0,08	0,15

Apêndice B – Análise de regressão linear simples e múltipla dos parâmetros de

	Modelo 1			Modelo 2		
	Estimativa	p valor	R ²	Estimativa	p valor	R ²
% GC x conectividade	0,004	0,06	0,04	0,004	0,07	0,25
% CG x Tb.Th	-19,4	0,01	0,06	-30,3	<0,0001	0,36
% GC x conn.D	7,8	0,06	0,04	6,8	0,07	0,25
% GC x Tb.Sp	-16,2	0,01	0,07	-17,4	0,003	0,3
IMM x Tb.Th	7,2	<0,0001	0,2	4,6	0,001	0,47

Apêndice C – Análise de regressão linear simples e múltipla

	Modelo 1			Modelo 2		
	Estimativa	p valor	R ²	Estimativa	p valor	R ²
DMO L1-L4 x conectividade	0,00008	0,05	0,04	0,00007	0,05	0,06
DMO L1-L4 x conn.D	0,13	0,05	0,04	0,13	0,06	0,006
DMO L1-L4 x Tb.Sp	-0,28	0,01	0,07	-0,3	0,007	0,1
DMO FT x Conectividade	0,00008	0,04	0,04	0,00008	0,03	0,19
DMO FT x Conn.D	0,14	0,04	0,04	0,15	0,03	0,19
DMO FT x BV/TV	0,74	0,06	0,04	0,67	0,07	0,18
DMO FT x Tb.Sp	-0,25	0,02	0,05	-0,28	0,006	0,22

Apêndice D – Análise de regressão linear simples e múltipla da

	Modelo 1			Modelo 2		
	Estimativa	p valor	R ²	Estimativa	p valor	R ²
DMO L1-L4 x TBS L1-L4	0,22	0,05	0,05	0,49	0,0004	0,2
DMO CF x TBS L1-L4	0,04	0,654	0	0,32	0,009	0,22
DMO FT x TBS L1-L4	0,07	0,5	0,01	0,39	0,002	0,23
DMO 1/3 Rádio x TBS L1-L4	0,11	0,07	0,04	0,11	0,1	0,05

Apêndice E – Análises de regressão linear simples e múltipla

	Modelo 1			Modelo 2		
	Estimativa	p valor	R ²	Estimativa	p valor	R ²
TBS L1-L4 x BV/TV	0,45	0,3	0,01	0,44	0,2	0,32
TBS L1-L4 x IMCL	-5,4	0,1	0,04	-2,52E-07	0,03	0,43
TBS L1-L4 x EMCL	-2,96	0,04	0,06	-4,29E-06	0,08	0,41
TBS L1-L1 x HbA1c	-0,02	0,0009	0,15	-0,01	0,09	0,38
TBS L1-L4 x Triglicérides	-0,0006	0,0007	0,15	-0,0002	0,1	0,38
TBS L1-L4 x HOMA-IR	-0,005	0,5	0,01	0,001	0,8	0,27

Apêndice F – Análises de regressão linear simples e múltipla

	Modelo 1			Modelo 2		
	Estimativa	p valor	R ²	Estimativa	p valor	R ²
DMO L1-L4 x Insulina	0,002	0,21	0,2	0,002	0,33	0,02
DMO L1-L4 x HOMA-IR	0,012	0,12	0,03	0,01	0,2	0,04
DMO CF x Insulina	0,006	0,01	0,1	0,003	0,17	0,19
DMO CF x HOMA-IR	0,02	0,01	0,09	0,01	0,13	0,19
DMO FT x Insulina	0,003	0,22	0,02	0,00001	0,9	0,1
DMO FT x HOMA-IR	0,01	0,02	0,02	0,003	0,7	0,1
DMO 1/3 Rádio x Insulina	0,001	0,3	0,01	0,002	0,2	0,003
DMO 1/3 Rádio x HOMA-R	0,005	0,3	0,01	0,006	0,3	0,03
DMO CF x IMCL/EMCL	0,001	0,02	0,06	0,001	0,1	0,16
DMO FT x IMCL/EMCL	0,002	0,0006	0,14	0,002	0,006	0,23

Apêndice G – Análises de regressão linear simples e múltipla da

	Modelo 1			Modelo 2		
	Estimativa	p valor	R ²	Estimativa	p valor	R ²
Conectividade x HOMA-IR	8,9	0,7	0	7,9	0,7	0,03
conn.D x HOMA-IR	0,005	0,7	0	0,004	0,7	0,03
BV/TV x HOMA-IR	-0,001	0,64	0	-0,001	0,7	0,004
Tb.Th x HOMA-IR	0,007	0,3	0,01	-0,0006	0,9	0,19
Tb.Sp x HOMA-IR	0,002	0,8	0	-0,001	0,8	0,05
Tb.Th x IMCL/EMCL	0,001	0,05	0,05	0,0009	0,1	0,2

Apêndice H – Análises de regressão linear simples e múltipla

	Modelo 1			Modelo 2		
	Estimativa	p valor	R ²	Estimativa	p valor	R ²
DMO L1-L4 x Osteocalcina	-0,00608	0,15	0,03	-0,005	0,2	0,03
DMO CF x Osteocalcina	-0,006	0,1	0,03	-0,005	0,2	0,12
DMO FT x Osteocalcina	-0,008	0,05	0,05	-0,006	0,1	0,1
DMO L1-L4 x CTX	-0,18	0,03	0,05	-0,16	0,07	0,07
DMO CF x CTX	-0,27	0,004	0,1	-0,22	0,01	0,19
DMO FT x CTX	-0,31	0,0009	0,14	-0,27	0,004	0,2
DMO L1-L4 x Adiponectina	-0,02	0,005	0,07	-0,0022	0,01	0,09
DMO CF x Adiponectina	-0,003	0,0001	0,14	-0,003	0,0003	0,26
DMO FT x Adiponectina	-0,004	<0,0001	0,18	-0,003	<0,0001	0,28
DMO 1/3 Rádio x Adiponectina	-0,008	<0,0001	0,15	-0,002	<0,0001	0,18

Apêndice I – Análises de regressão linear simples e múltipla do

	Modelo 1			Modelo 2		
	Estimativa	p valor	R ²	Estimativa	p valor	R ²
Conectividade x CTX	-449	0,07	0,04	-422	0,09	0,05
Conn.D x CTX	-0,25	0,07	0,04	-0,24	0,1	0,05
BV/TV x CTX	-0,07	0,004	0,11	-0,07	0,005	0,11
Tb.Sp x CTX	0,31	0,0003	0,18	0,33	0,0002	0,2

Apêndice J – Análises de regressão linear simples e múltipla

	Modelo 1			Modelo 2		
	Estimativa	p valor	R ²	Estimativa	p valor	R ²
IMCL/EMCL x Adiponectina	-0,31	0,03	0,06	-0,23	0,1	0,13
IMCL/EMCL x Osteocalcina	-1,3	0,05	0,06	-1,2	0,06	0,17
IMCL/EMCL x CTX	-30,9	0,06	0,06	-25,9	0,1	0,15