LAURA DA SILVA GIRÃO LOPES

**O papel dos hormônios entéricos GLP-2 e serotonina no
metabolismo ósseo de mulheres pós-menopausadas
portadoras de Diabetes Mellitus tipo 2**

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

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra. Márcia Nery

Co-orientador: Dr. Pedro Henrique Silveira Correa

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lopes, Laura da Silva Girão

O papel dos hormônios entéricos GLP-2 e serotonina no metabolismo ósseo de mulheres pós-menopausadas portadoras de Diabetes Mellitus tipo 2 / Laura da Silva Girão Lopes. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Márcia Nery.

Coorientador: Pedro Henrique Silveira Correa.

Descritores: 1.Osso 2.Diabetes Mellitus tipo 2 3.Trato gastrointestinal
4.Alimentação 5.Peptídeo 2 semelhante ao glucagon 6.Serotonina

USP/FM/DBD-218/14

Dedico essa tese à minha família

**“O começo de todas as ciências
é o espanto de as coisas serem o que são”**

(Aristóteles)

Agradecimentos

A conclusão dessa tese representa um ganho de difícil mensuração, já que envolve não só um crescimento profissional, mas também ganhos pessoais consideráveis. O resultado foi muito positivo, de forma que todo o caminho, mesmo cheio de obstáculos, seria refeito novamente caso o tempo pudesse voltar. Portanto, agradecer é apenas reconhecer que nada seria possível sem o empenho de cada um aqui citado, e talvez de muitos outros não lembrados formalmente.

A Deus, pela concessão de dons sem os quais nenhuma produção aconteceria.

Aos meus pais, pelos exemplos de obstinação, pelo carinho e pela verdadeira substituição das minhas tarefas como mãe quando a minha ausência foi necessária.

Aos meus irmãos Rafael e Junior, estando presentes ou não, pelo amor incondicional.

À minha cunhada Cristiane, pelo compartilhamento das angústias que temos como mãe.

À minha avó Pilar, pela alegria e descontração.

Ao meu esposo Jailson, pelo incentivo, parceria, paciência e também pelo amor, que tanto suavizaram momentos difíceis.

À minha filha Júlia e meu sobrinho Mateus, fontes inesgotáveis do meu desejo de viver, tão importantes e capazes de me revigorar quando as dificuldades surgiam.

Às amigas Catarina, Patrícia Mara e Maria Lúcia, pelos almoços e conversas tão agradáveis que me fazem muita falta em Fortaleza.

À Dra. Márcia Nery, pelos conhecimentos e pela disponibilidade, e pelo exemplo de idoneidade.

Ao Dr. Pedro Henrique, pelas ideias que fizeram germinar esse projeto, regadas por sua simplicidade e otimismo.

Ao Bruno Ferraz, pelo brilhantismo tão acessível.

Às pacientes, que dedicaram seu tempo por um ganho tão ínfimo na sua saúde comparado com a aquisição dos meus conhecimentos.

A Rosa Fukui, pela admirável capacidade de trabalho e pelas tantas palavras de incentivo, e tão ou mais importante do que tudo isso, pela amizade.

A Maria do Carmo, pelo grande esforço, sem o qual a coleta de dados não estaria terminada, e acima de tudo também pelo companheirismo.

Aos funcionários do LIM 18, especialmente à Greci, que tornaram possível a realização dos testes de refeição e dosagens, e à Dra Elizabeth Rossi, sempre disposta na resolução dos muitos percalços.

A Cida, sempre disposta a ajudar.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

- Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).
- Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação, 2011.
- Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Gráficos

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Osteoporose e Diabetes Mellitus	2
1.2	Interação entre o metabolismo ósseo e o energético	9
1.3	Efeito da alimentação sobre o metabolismo ósseo.....	12
1.4	Hormônios entéricos	13
1.4.1	GLP-2	15
1.4.2	Serotonina	17
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	Objetivo geral.....	24
2.2	Objetivos específicos.....	24
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	25
3.1	Exames complementares iniciais.....	28
3.2	Reposição de 25hidroxivitamina D	29
3.3	Teste de refeição mista	30
3.4	Ensaio para as medidas de osteocalcina, CTX, GLP-2 e serotonina	32
3.5	Análise estatística.....	33
4	RESULTADOS	34
5	DISCUSSÃO	47
6	CONCLUSÃO	54
7	ANEXOS.....	56
8	REFERÊNCIAS	68

Listas

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<	menor do que
>	maior do que
=	igual a
5-HIAA	<i>5-Hidroxiindol Acetic Acid</i>
5-HT	Serotonina
5-HTP	5-Hidróxi-Triptofano
5-HTT	Serotonin Transporter
5-HT2A	Subtipo de receptor serotoninérgico
AGE	<i>Advanced glycation endproducts</i>
ALT	Alanina aminotransferase
AMS	Ambulatório médico dos servidores do HCFMUSP
AST	Aspartato aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
BRAZOS	<i>Brazilian Osteoporosis Study</i>
CART	<i>Cocaine amphetamine regulated transcript</i>
CO	controle
CREB	<i>cAMP response elemento binding protein</i>
CTX	<i>C-telopeptide fragments of collagen type 1</i>
DXA	<i>Dual energy X-ray absorptiometry</i>
DM	Diabetes Mellitus

DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMO	Densidade mineral óssea
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPP IV	Protease dipeptidil-peptidase IV
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay</i>
FRAX	Instrumento de avaliação do risco de fraturas da Organização Mundial da Saúde
FSH	Hormônio folículo-estimulante
g	gramas
GIP	Gastric inhibitory polypeptide
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
GLP-2	Glucagon-like peptide 2
HbA1c	Hemoglobina glicada
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HOMA-IR	Medida de resistência insulínica calculada pelo <i>“homeostasis model assessment index”</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
IMC	Índice de massa corporal
ISRS	Inibidores seletivos de receptação da serotonina
kg/m ²	quilogramas por metro quadrado
LH	Hormônio luteinizante
LIM	Laboratório de investigação médica
Lrp5	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein-5</i>

MAO	monoamina oxidase
mg	miligramas
mg/dL	miligramas por decilitro
mL	mililitros
mL/min	mililitros por minuto
ng/mL	nanogramas por mililitro
NTX	<i>N-telopeptide fragments of collagen type 1</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	valor-p
PTH	Paratormônio
PC	enzima convertase do prohormônio
r	coeficiente de correlação de Pearson
TP	triptofano
Tph	enzima triptofano-hidroxilase
SERT	<i>Serotonin transporter</i>
SNC	Sistema nervoso central
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TGI	Trato gastrointestinal
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TSH	Hormônio tireo-estimulante
UI	unidades internacionais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática da ligação entre o metabolismo ósseo e o energético	11
Figura 2 -	Fluxograma de recrutamento dos sujeitos do estudo	31

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Curvas das concentrações de CTX sérico com seus perfis médios e respectivos erros-padrão dos grupos das diabéticas (cor vermelha) e controles (cor preta) ao longo dos tempos do teste de refeição..... 42
- Gráfico 2 - Comparações do Δ CTX (CTX do tempo 180 minutos do teste de refeição – CTX basal) entre os grupos DM e CO 42
- Gráfico 3 - Curvas das concentrações de osteocalcina plasmática com seus perfis médios e respectivos erros-padrão dos grupos das diabéticas (cor vermelha) e controles (cor preta) ao longo dos tempos do teste de refeição..... 43
- Gráfico 4 - Curvas das concentrações de GLP-2 sérico com seus perfis médios e respectivos erros-padrão dos grupos das diabéticas (cor vermelha) e controles (cor preta) ao longo dos tempos do teste de refeição..... 44
- Gráfico 5 - Curvas das concentrações de serotonina sérica com seus perfis médios e respectivos erros-padrão dos grupos das diabéticas (cor vermelha) e controles (cor preta) ao longo dos tempos do teste de refeição..... 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Comparação das variáveis clínicas e densitométricas iniciais das pacientes de acordo com o grupo (portadoras de diabetes ou controles)	36
Tabela 2 -	Comparação de outras variáveis clínicas e densitométricas das pacientes de acordo com o grupo (portadoras de diabetes ou controles)	37
Tabela 3 -	Descrição de algumas variáveis clínicas nas pacientes diabéticas	38
Tabela 4 -	Descrição das variáveis laboratoriais iniciais das pacientes de acordo com o grupo (portadoras de diabetes ou controles)	40
Tabela 5 -	Descrição das variáveis CTX ¹ , osteocalcina, GLP-2 ² e serotonina avaliados de acordo com o grupo (portadoras de diabetes ou controle) e com o tempo em minutos ao longo do Teste de Refeição	57
Tabela 6 -	Resultados das comparações múltiplas de Tukey para a as concentrações séricas de CTX ¹ segundo os grupos (portadoras de diabetes ou controles) analisados individualmente em intervalos do Teste de Refeição, e depois comparados entre si em cada tempo do Teste de Refeição	58
Tabela 7 -	Resultado das análises de variância (ANOVA) para comparação dos marcadores ao longo do Teste de Refeição entre os grupos (portadoras de diabetes e controles) a partir dos fatores grupo e tempo	59
Tabela 8 -	Resultados das comparações múltiplas de Tukey para a as concentrações plasmáticas de osteocalcina segundo os grupos (portadoras de diabetes ou controles) comparados entre si em cada intervalo do Teste de Refeição	60

Tabela 9 -	Resultados das comparações múltiplas de Tukey para a as concentrações séricas de GLP-2 ¹ comparadas entre si em cada intervalo do Teste de Refeição na amostra total (portadoras de diabetes e controles)	61
Tabela 10 -	Resultados das comparações múltiplas de Tukey para a as concentrações séricas de serotonina segundo os grupos (portadoras de diabetes ou controles) analisados individualmente em intervalos do Teste de Refeição, e depois comparados entre si em cada tempo do Teste de Refeição	62
Tabela 11 -	Resultado das correlações entre as variáveis IMC ¹ , DMO ² e os marcadores CTX ³ , osteocalcina, GLP-2 ⁴ e serotonina estudados ao longo dos tempos do teste de refeição na amostra avaliada	63

Resumo

Lopes LSG. *O papel dos hormônios entéricos GLP-2 e serotonina no metabolismo ósseo de mulheres pós-menopausadas portadoras de Diabetes Mellitus tipo 2* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica associada a danos, disfunção e insuficiência de diversos órgãos, sendo a fragilidade óssea apontada por estudos recentes como também associada ao DM. Os mecanismos que justificam o maior risco de fraturas em diabéticos tipo 2 não são bem compreendidos. A influência do trato gastrointestinal e seus hormônios no remodelamento ósseo tem sido comprovada em animais e em indivíduos saudáveis, sendo o *Glucagon-like peptide-2* (GLP-2) e a serotonina hormônios com produção intestinal estimulada pela ingestão de nutrientes, existindo algumas evidências de que os mesmos têm efeitos no metabolismo ósseo. O presente estudo comparou a dinâmica dos marcadores ósseos, da serotonina e do GLP-2 em resposta à refeição mista em mulheres pós-menopausadas diabéticas em relação a controles não diabéticas. Foram incluídas 43 mulheres pós-menopausadas com densidade mineral óssea (DMO) reduzida, 23 com diabetes (grupo DM) e 20 controles (grupo CO). Depois do jejum de 12 horas, essas mulheres foram submetidas ao teste de refeição padrão, e as amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0, 30, 60, 120 e 180 minutos para a dosagem de telopeptídeo C-terminal do colágeno tipo I sérico (CTX), osteocalcina (OC), GLP-2 e serotonina. O grupo DM apresentou maior índice de massa corporal, bem como maior densidade mineral óssea (DMO) de colo de fêmur e quadril. Nos tempos basais as mulheres diabéticas apresentaram concentrações plasmáticas de LH e FSH, bem como dos marcadores ósseos osteocalcina e CTX menores que no grupo CO. Em resposta a refeição padrão houve, em ambos os

grupos, diminuição na concentração do CTX e da osteocalcina, e aumento na de GLP-2, sem alteração significativa da serotonina. A resposta do CTX à refeição foi menor no grupo DM, e a da serotonina maior no grupo CO em um único tempo do teste. Em relação a OC e ao GLP-2, não houve diferença entre os grupos avaliados ao longo do teste de refeição. As mulheres diabéticas tipo 2 tiveram maior DMO de fêmur. Além disso, os resultados sugerem que o remodelamento ósseo das mulheres diabéticas está alterado, com os marcadores ósseos reduzidos. A influência da ingestão de nutrientes na reabsorção óssea também foi alterada pela DM, não se reconhecendo nesse estudo qualquer papel do GLP-2 ou da serotonina na alteração do metabolismo ósseo em mulheres diabéticas tipo 2.

DESCRITORES: Osso, Diabetes Mellitus tipo 2, Trato gastrointestinal, Alimentação, Peptídeo 2 semelhante ao glucagon, Serotonina.

Summary

Lopes LSG. *The role of enteric hormones GLP-2 and serotonin on bone metabolism in postmenopausal women with type 2 diabetes* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

Type 2 diabetes mellitus is metabolic disease associated with long-term damage, dysfunction, and failure of various organs; recent studies indicate that diabetes itself is associated with bone fragility. The mechanisms underlying the increased fracture risk in type 2 diabetes are not well understood. The influence of the gastrointestinal tract and its hormones in bone remodeling has been demonstrated in animals and in healthy subjects. Glucagon-like peptide-2 (GLP-2) and serotonin are enteric hormones stimulated by nutrient intake, and there is some evidence that these hormones could have some effects on bone metabolism. We studied the dynamics of bone markers, serotonin and GLP-2 in response to a mixed meal in diabetic postmenopausal women, in comparison with nondiabetic controls. 43 post-menopausal women with reduced bone mineral density (BMD) were enrolled, 23 with diabetes (DM group) and 20 normal control (CO group). After an overnight fast (12h), subjects were submitted to a standard meal test. Blood samples were drawn for C-terminal crosslinked telopeptide (CTX), osteocalcin (OC), GLP-2 and serotonin at 0, 30, 60, 120 and 180 minutes. The DM group had higher body mass index, and higher BMD of the femoral neck and hip. The basal values of LH and FSH as well as the bone markers osteocalcin and CTX were lower in the DM group than in the CO group. After the standard meal test, there was a decrease in the concentration of CTX and osteocalcin, and an increase in GLP-2 in both groups. No changes in concentrations of serotonin were observed over the test meal. The response of the CTX meal was lower in the DM group, and the serotonin concentration was greater in the CO group in a single test time. In

relation to e OC and GLP-2, there were no differences among the groups throughout the test meal. Type 2 diabetic women had higher bone mineral density (BMD) in the femur. Furthermore, the results suggest that the bone remodeling of diabetic women is altered, with their biochemical bone markers reduced. The influence of nutrient intake on bone resorption was also altered by DM, but in this study we could not recognize the role of GLP- 2 and serotonin in influencing the bone metabolism in type 2 diabetic.

DESCRIPTORS: Bone, Type 2 diabetes, Gastrointestinal tract, Food, Glucagon-like peptide 2, Serotonin

1 INTRODUÇÃO

1.1 Osteoporose e Diabetes Mellitus

A osteoporose é uma doença osteometabólica comum, além de ser a principal causa de fratura por fragilidade esquelética ⁽¹⁾. Clinicamente, a fratura por fragilidade pode ser definida como a resultante de um trauma mínimo, ou mesmo aquela sem nenhum trauma identificável pelo indivíduo ⁽²⁾. A osteoporose causa anualmente no mundo mais de 8,9 milhões de fraturas, das quais 4,5 milhões ocorrem nas Américas e Europa ⁽³⁾.

A incidência de fraturas de fêmur em populações ocidentais aumentou ao longo da segunda metade do último século. Alguns fatores ambientais como o sedentarismo, a insuficiência de vitamina D e o aumento na sobrevida dos idosos são apontados como contribuintes, embora não completamente compreendidos. Estudos comparativos das fraturas dos demais sítios nos diferentes continentes ao longo dos anos são escassos, não se reconhecendo nenhum padrão temporal ⁽⁴⁾.

O estudo BRAZOS (*Brazilian Osteoporosis Study*) foi o único levantamento epidemiológico brasileiro de abrangência nacional abordando fraturas osteoporóticas. Numa amostra de 2.420 indivíduos com idade superior a 40 anos e representativa das cinco regiões do país, a prevalência de fratura por fragilidade foi de 15,1% em mulheres, e de 12,8% em homens ⁽⁵⁾.

Este estudo também mostrou que, além de idade avançada, sedentarismo, história familiar de fratura de fêmur, tabagismo, quedas recorrentes e pior qualidade de vida, o diabetes mellitus (DM) também foi uma condição associada a fraturas por fragilidade ⁽⁵⁾.

Vários outros estudos identificaram uma associação entre diabetes e risco de fratura ⁽⁶⁾, sendo os estudos mais numerosos, e os resultados mais consistentes para fratura de fêmur ⁽⁷⁾. A meta-análise de Janghorbani e colaboradores ressaltou que essa associação foi mais forte para portadores de DM1 (Diabetes mellitus tipo 1) em relação aos diabéticos tipo 2 ⁽⁷⁾. O estudo Roterdã demonstrou que portadores de DM2 (Diabetes mellitus tipo 2) tiveram maior risco de fraturas não vertebrais em relação aos pacientes com diagnóstico de intolerância à glicose e aos indivíduos normais ⁽⁸⁾.

O tempo de diagnóstico da doença e o controle glicêmico dos diabéticos parecem ser fatores importantes para o aumento do seu risco de fraturas ^(9, 10). Um tempo maior do que 5 anos de diagnóstico, bem como concentrações de hemoglobina glicada superiores a 7,5% foram associados a maior risco de fratura em importantes estudos populacionais que compararam portadores de DM a indivíduos normais ^(9, 10).

Em relação às fraturas vertebrais, não há consenso quanto ao risco aumentado em diabéticos: há estudos mostrando relação entre diabetes e fraturas vertebrais ⁽¹¹⁾, enquanto outros não encontram associação estatisticamente significativa entre DM2 e fraturas em outros sítios que não o quadril ⁽⁷⁾.

Esse aumento do risco de fraturas em indivíduos diabéticos tipo 2 não pode ser explicado pela sua densidade mineral óssea (DMO). O estudo Roterdã incluiu mais de 700 diabéticos tipo 2 e relatou DMO aumentada nesses indivíduos nos sítios colo de fêmur e coluna vertebral, sendo esse aumento de DMO, após ajuste estatístico, independente de: idade, gênero, índice de massa corporal, tabagismo, uso de diuréticos de alça ou tiazídicos, risco de quedas e dificuldade na marcha ⁽⁸⁾.

A meta-análise de Ma e colaboradores reforçou os achados do estudo Roterdã, tendo mostrado que a DMO foi aumentada em cerca de 25 a 50% em diabéticos tipo 2 comparados com controles saudáveis nos sítios colo femoral, quadril e coluna vertebral, mas não no antebraço. Comparando ainda esses diabéticos tipo 2 entre si, faixa etária jovem, sexo masculino, maior índice de massa corporal e, surpreendentemente, maiores dosagens de hemoglobina glicada (HbA1c) foram associados a maior DMO ⁽¹²⁾.

No entanto, deve-se ressaltar que o achado de DMO aumentada em diabéticos tipo 2, apesar de preponderante, não é consensual. Majima *et al* descreveram DMO de rádio, mas não de coluna lombar e de colo de fêmur, menor em pessoas com DM2 do que em indivíduos saudáveis. Outro dado interessante nessa amostra de diabéticos foi a descrição da relação inversa existente entre DMO média e controle glicêmico medido pela HbA1c ⁽¹³⁾.

Os resultados discrepantes da literatura no que se refere a DMO em indivíduos diabéticos tipo 2 podem ser explicados pela falta de uniformidade dos sítios analisados, além de diferenças clínicas como IMC e grau de

resistência insulínica, sendo a influência de fatores como a presença de complicações relacionadas a DM na DMO descrita por alguns autores⁽¹⁴⁾.

A resistência à insulina, que é muito variável entre pessoas com DM2, é descrita por Arikan e colaboradores como uma variável inversamente correlacionada com a DMO. Esse estudo compara a DMO entre dois grupos de pacientes diabéticos tipo 2 com diferentes graus de resistência insulínica estimada pelo HOMA – IR (resistência insulínica avaliada pelo “*homeostasis model assessment index*”), pareados para idade e IMC, e seus autores concluem que a resistência insulínica aumentada foi associada a um efeito negativo sobre a DMO em portadores de DM2 ⁽¹⁵⁾.

As alterações de massa óssea detectadas na densitometria observadas em pacientes com DM2 podem não refletir o risco de fratura a que estão sujeitos. Trabalho canadense recente realizado a partir de um grande banco de dados evidencia que o modelo FRAX* subestima o risco de fraturas maiores e de quadril nos diabéticos, uma vez que a presença de DM foi um preditor independente de fraturas em relação às demais variáveis clínicas incluídas no modelo. Discute-se portanto que o DM deva ser incluído nas variáveis clínicas da FRAX, e que a DMO seja um marcador com valor preditivo de fraturas diferente em diabéticos tipo 2 quando comparado com indivíduos saudáveis, pois a ocorrência de fraturas é aumentada nesta população independente da DMO ⁽¹⁶⁾.

* Instrumento de avaliação do risco de fraturas de um indivíduo utilizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a partir de características clínicas

Algumas condições com efeitos negativos no metabolismo ósseo de portadores de DM2 podem ser citadas, dentre elas o uso de alguns medicamentos com ações adversas no esqueleto, podendo assim contribuir para o aumento do risco de fraturas em diabéticos ⁽¹⁷⁾. Alguns estudos clínicos demonstram, por exemplo, um aumento na incidência de fraturas periféricas em mulheres pós-menopausadas com DM2 na vigência de tratamento com glitazonas ⁽¹⁸⁾, embora isso não tenha sido confirmado por resultados de ensaio clínico recente com o uso de pioglitazona ⁽¹⁹⁾. Os inibidores seletivos da recaptação da serotonina, empregados no tratamento dos transtornos depressivos, mais comuns em diabéticos que na população geral, também podem estar associados à perda óssea ^(17, 20).

Outro fator possivelmente implicado neste aumento do risco de fraturas inclui o maior risco de quedas em diabéticos, explicado pela presença de complicações crônicas como retinopatia e neuropatia diabéticas, bem como pela ocorrência de hipoglicemias ⁽¹⁷⁾.

Alterações hormonais associadas a condições como síndrome metabólica e DM2 têm repercussões negativas na integridade óssea. Entre elas a diminuição das concentrações séricas de IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) e, em homens diabéticos, de testosterona ⁽²¹⁾, além do hiperparatireoidismo secundário à insuficiência renal e a deficiência de vitamina D. A composição corporal, incluindo as ações da leptina e adiponectina ⁽²²⁾, também possivelmente influencia a remodelação óssea em diabéticos ⁽¹⁷⁾.

Como a resistência óssea é determinada: pela DMO, por propriedades estruturais ósseas e pela qualidade óssea, sugere-se que alterações nestes dois últimos fatores expliquem a maior propensão dos diabéticos tipo 2 à ocorrência de fraturas ^(23, 24).

O papel das células mesenquimais pluripotentes na qualidade óssea pode ser importante para a compreensão do aumento do risco de fraturas em indivíduos diabéticos. Essas células podem se diferenciar em adipócitos, osteócitos, condrócitos, miócitos e células neuronais, e estudo recente demonstrou que, quando submetidas à hiperglicemia crônica, as células mesenquimais pluripotentes de diabéticos tipo 2 evoluem para senescência e apoptose mais frequentemente se comparadas com a de controles saudáveis, além de apresentarem uma maior predileção para a diferenciação em adipócitos, reduzindo assim o seu potencial de diferenciação osteogênica e condrogênica. Portanto, a inadequada função dessas células em portadores de DM2 pode sugerir que o tecido ósseo submetido a fraturas tem seu mecanismo de microrreparo defeituoso, o que merece esclarecimento em estudos adicionais ⁽²⁵⁾.

A qualidade do osso pode ser alterada em diabéticos pela ação dos AGEs (*Advanced glycation endproducts*) ⁽²³⁾, que contribuem para o surgimento de várias complicações crônicas do diabetes ⁽²⁶⁾. No tecido ósseo, sugere-se que os AGEs se ligam às fibras de colágeno e induzem a maior ocorrência das ligações cruzadas não enzimáticas, alterando assim a função e estrutura do colágeno ^(24, 27). Uma vez que boa parte da estrutura da matriz óssea é composta por fibras de colágeno, a alteração dessa

proteína pode ser um importante fator na fragilidade óssea dos portadores de DM ⁽²³⁾.

Concentração urinária elevada de pentosidina, um dos AGEs conhecidos, tem sido apontada como um preditor de fraturas vertebrais ⁽²⁸⁾ e também de fraturas em todos os sítios ⁽²⁷⁾ em indivíduos idosos diabéticos, independente da DMO ou de qualquer outro fator de risco ^(27, 28).

Além de anormalidades nas células mesenquimais e na estrutura do colágeno, existem evidências de que a remodelação óssea é alterada em diabéticos. Os dados de marcadores de *turnover* ósseo em diabéticos são conflitantes. Alguns autores demonstraram medidas séricas de marcadores de formação óssea menores em mulheres diabéticas pós-menopausadas comparadas com controles não diabéticas ⁽²⁹⁾, enquanto outros relataram valores séricos menores apenas nos marcadores de reabsorção óssea ⁽³⁰⁾. Outro grupo também publicou resultados mostrando medidas diminuídas de osteocalcina e NTX (*N-telopeptide fragments of collagen type 1*), portanto, de formação e reabsorção óssea respectivamente ⁽³¹⁾.

É questionável ainda se existe e qual a magnitude da influência da melhora do controle glicêmico sobre a saúde do osso em diabéticos. Um estudo demonstrou que a melhora do controle glicêmico após três semanas de intensificação do tratamento em diabéticos tipo 2 em uso de antidiabéticos orais diminuiu o *turnover* ósseo, medido pelos marcadores deoxipiridinolina urinária, CTX (*C-telopeptide fragments of collagen type 1*), urinário e fosfatase alcalina óssea sérica ⁽³²⁾.

1.2 Interação entre o metabolismo ósseo e o energético

Por outro lado, há muitas evidências de que o metabolismo ósseo e energético se influenciam mutuamente através de vários mediadores estudados em modelos de animais ⁽³³⁾, sendo a influência do metabolismo energético e seu papel na fragilidade óssea desconhecidos e pouco explorados em humanos.

A leptina, hormônio secretado pelos adipócitos, é um desses mediadores do sistema de co-dependência entre o metabolismo ósseo e energético. Sua ação no núcleo arqueado promove diminuição do apetite e do gasto energético. Esse hormônio também age no sistema nervoso simpático, no neurotransmissor CART (*Cocaine Amphetamine Regulated Transcript*), na Neuromedina U e na serotonina, influenciando por meio dessas vias o metabolismo ósseo, diminuindo tanto a formação quanto a reabsorção ósseas ⁽³³⁾.

Outro elemento de ligação entre a remodelação óssea e o metabolismo energético é a osteocalcina ⁽³⁴⁾. É uma proteína sintetizada pelos osteoblastos, ocorrendo, após a sua síntese, modificações pós-translacionais caracterizadas pela excisão de um pré-propeptídeo e a carboxilação de três resíduos de ácido glutâmico presentes em sua molécula. Essa carboxilação explica a grande afinidade da osteocalcina pela hidroxiapatita presente na matriz óssea ⁽³³⁻³⁵⁾.

O processo de descarboxilação da osteocalcina, por outro lado, é estimulado pelos osteoclastos, e resulta na liberação da osteocalcina subcarboxilada, que pode ter nenhum ou até dois resíduos carboxilados, e

que anteriormente estava ligada à matriz óssea. A osteocalcina subcarboxilada parece ser a forma ativa do ponto-de-vista metabólico, pois experimentos em ratos demonstram que ela exerce efeito direto sobre as células beta, estimulando a produção de insulina, bem como efeito indireto na sensibilização à insulina a partir da ação nos adipócitos, estimulando a produção de adiponectina ^(34, 36).

A figura abaixo ilustra esse sistema de co-dependência entre o metabolismo ósseo e o energético ^(33, 34), cuja ligação pode ser explicada pelas ações da insulina e da leptina sobre a osteocalcina e suas formas. A insulina estimula a produção de osteocalcina pelos osteoblastos e favorece a predominância da sua forma subcarboxilada, que é a forma ativa sobre o metabolismo energético e glicêmico. Por outro lado, a leptina secretada pelos adipócitos, age no sistema nervoso central inibindo a produção de serotonina e aumentando o tônus simpático, causando assim uma regulação negativa na reabsorção óssea, e consequentemente facilitando o predomínio da forma carboxilada, que é a fração dita inativa que se liga fortemente à hidroxiapatita da matriz óssea ⁽³⁴⁾.

FONTE: Ducky P, 2011.

Figura 1 - Representação esquemática da ligação entre o metabolismo ósseo e o energético, cuja ligação pode ser explicada pelas ações da insulina e da leptina sobre a osteocalcina e suas formas. A insulina estimula a produção de osteocalcina pelos osteoblastos e favorece a predominância da sua forma subcarboxilada, que é a forma ativa sobre o metabolismo energético. A leptina secretada pelos adipócitos age no sistema nervoso central inibindo a produção de serotonina e aumentando o tônus simpático, causando assim uma regulação negativa na reabsorção óssea, e consequentemente facilitando o predomínio da forma carboxilada, que é a fração dita inativa que se liga fortemente hidroxapatita da matriz óssea

1.3 Efeito da alimentação sobre o metabolismo ósseo

O metabolismo energético também exerce uma influência em termos no metabolismo ósseo observada pelo efeito agudo da alimentação no processo de remodelação óssea. A variação diurna dos marcadores de reabsorção óssea é bem reconhecida, ocorrendo uma queda nas suas concentrações durante o dia e aumento no período noturno, sendo a alimentação um fator reconhecido como um dos grandes contribuintes para esse fenômeno ^(37, 38). A ingestão de refeições mistas, ou mesmo isoladas de glicose, proteína ou gordura em indivíduos normais diminuiu a reabsorção óssea agudamente, sendo essa diminuição iniciada poucos minutos após a ingestão e demonstrada pelas concentrações séricas e urinárias do CTX ^(37, 39).

O efeito da ingestão de nutrientes na formação óssea não é consenso na literatura, existindo alguns autores que descrevem que não há influência ⁽⁴⁰⁾, e outros que relatam que os marcadores de formação óssea também apresentam um padrão de diminuição diurna de suas concentrações, embora essa magnitude de variação seja menor do que a dos marcadores de reabsorção óssea ⁽⁴¹⁾.

A hiperinsulinemia pós-prandial, outro fator presente após a ingestão de nutrientes, não explica a supressão aguda dos marcadores do *turnover* ósseo como demonstrado por estudo de clamp euglicêmico e hipoglicêmico hiperinsulinêmicos ⁽⁴²⁾.

Chailurkit e colaboradores estudaram o efeito da ingestão de 75 gramas de glicose oral na reabsorção óssea de mulheres pós-

menopausadas com diferentes graus de tolerância à glicose e mostraram que a glicose oral suprimiu as medidas subsequentes de CTX sérico, sendo que esse efeito encontra-se atenuado nas mulheres com diagnóstico de DM2 ⁽⁴³⁾.

A administração de glicose parenteral não produz supressão da reabsorção óssea, sugerindo que a resposta aguda dos marcadores de reabsorção óssea possivelmente esteja relacionada aos hormônios entéricos ⁽⁴³⁾. Outro elemento que fortalece o papel dos hormônios entéricos é o fato de que a administração de octreotida, um análogo de longa ação da somatostatina e potente inibidor das secreções dos peptídeos gastrintestinais e pancreáticos, abole por completo a supressão da reabsorção óssea normalmente induzida pela glicose ingerida e aumenta as concentrações séricas do hormônio paratireoidiano (PTH) ⁽³⁹⁾.

1.4 Hormônios entéricos

Os hormônios entéricos com ação incretínica são liberados após ingestão oral de glicose, ou mesmo sob estímulo por refeição, e aumentam a secreção de insulina. Pertencem à mesma família de peptídeos com estrutura semelhante ao glucagon, sendo todos derivados do processamento da proteína proglucagon realizado pela enzima convertase do prohormônio (PC) de forma tecido-específica. Os mais estudados pela sua potência incretínica são o GIP (*"Gastric Inhibitory Polypeptide"*) e o GLP-1 (*"Glucagon-like Peptide 1"*) ⁽⁴⁴⁾.

Em indivíduos saudáveis, esse efeito incretínico é responsável por cerca de 70% da secreção pós-prandial insulínica ⁽⁴⁵⁾, embora esse valor exato esteja sujeito à influência dos muitos fatores que influenciam o complexo eixo entero-insular responsável pela resposta fisiológica de secreção insulínica aos alimentos ingeridos ⁽⁴⁴⁾.

O GIP é produzido pelas células K localizadas principalmente na porção mais proximal do intestino em resposta à ingestão de carboidratos e gorduras. Na sua forma não degradada é um importante hormônio com efeito incretínico, tendo uma ação aditiva com o GLP-1 ⁽⁴⁵⁾.

Os efeitos do GIP são menos conhecidos do que os do GLP-1. Ele não promove, ao contrário do GLP-1, retardo no esvaziamento gástrico e supressão na secreção de glucagon. Existem receptores para o GIP no sistema nervoso central, tecido adiposo e osso, embora essas ações tenham importância pouco conhecida do ponto-de-vista clínico ⁽⁴⁵⁾.

O GLP-1 é um hormônio liberado em resposta a sinais hormonais e neurais, sendo sintetizado principalmente pelas células L intestinais presentes predominantemente no jejuno distal, íleo e cólon. Sua ação biológica é limitada pela meia-vida de cerca de 2 minutos, sendo mais de 50% da quantidade secretada degradada antes mesmo da chegada à circulação plasmática. Tem importante ação no metabolismo de carboidratos na medida em que regula, através de um sistema dependente de glicose, a secreção e a biossíntese de insulina, além de uma atuação, bem demonstrada em estudos “*in vitro*”, na proliferação e neogênese de células beta pancreáticas ⁽⁴⁵⁾.

Existem receptores de GLP-1 localizados em outros sítios além do pancreático, tendo sido demonstradas algumas ações benéficas no sistema cardiovascular em situações de injúria isquêmica, alterações na contratilidade miocárdica, além de ações antiapoptóticas nos neurônios, indução de natriurese e modulação no eixo hipotálamo-hipofisário⁽⁴⁵⁾.

1.4.1 GLP-2

O GLP-2 (*Glucagon-like Peptide 2*) é outro hormônio entérico também produzido principalmente pelas células enteroendócrinas tipo L presentes no íleo distal e cólon, sendo co-secretado com o GLP-1. Esse hormônio é produzido em resposta aos mesmos estímulos nutricionais, hormonais e neurais que ocorrem associados a ingestão de carboidratos e lipídios, sendo o efeito das proteínas de pouca importância⁽⁴⁶⁾.

A porção biologicamente ativa do GLP-2 (GLP-2₁₋₃₃), assim como a do GLP-1, sofre inativação quase completa pela enzima DPP IV (*protease dipeptidil peptidase IV*), sendo o composto resultante o GLP-2₂₋₃₃. A DPP IV tem sua ação enzimática preferencial sobre o GLP-1 em relação ao GLP-2. A meia-vida do GLP-2 é de 7 minutos, sendo sua principal ação fisiológica o trofismo sobre a mucosa intestinal, promovendo seu crescimento e melhorando sua função absorviva^(46, 47). O GLP-2 diminui a secreção de ácido gástrico, inibe o esvaziamento gástrico e aumenta o fluxo sanguíneo intestinal⁽⁴⁸⁾.

Essa ação trófica intestinal foi inicialmente testada em ratos com síndrome do intestino curto, resultando em ganho de peso considerável ⁽⁴⁹⁾. Atualmente o uso terapêutico do análogo do GLP-2, a Teduglutida, que é resistente a DPP IV, tem sido ampliado para outras doenças intestinais inflamatórias em humanos, incluindo enterite induzida por antiinflamatórios não-esteroidais, mucosite secundária a quimioterápicos e doenças inflamatórias intestinais, como doença de Crohn e colite ulcerativa ⁽⁴⁶⁾.

A importância de um fator produzido pelo cólon, possivelmente o GLP-2, sobre a reabsorção óssea foi inicialmente demonstrada ao se observar que indivíduos com síndrome do intestino curto colectomizados tinham menor resposta do CTX a uma refeição mista quando comparados com outros com esta síndrome sem colectomia ou com controles normais: isso implicava a ação de um fator colônico sobre este marcador de reabsorção óssea. Os mesmos autores mostraram mudança nos marcadores ósseos após administração parenteral de GLP-2 ^(50, 51).

A injeção subcutânea de GLP-2 em mulheres pós-menopausadas e saudáveis, bem como em pacientes com a Síndrome do intestino curto, promoveu redução das concentrações de CTX sérico e urinário, tanto após dose única noturna, quanto após uso prolongado, apontando assim o GLP-2 como sendo esse fator intestinal relacionado à inibição pós-prandial da reabsorção óssea ^(48, 52, 53).

Todos esses dados apontam para o papel do GLP-2 como um dos fatores hormonais relacionado à ação da alimentação no metabolismo ósseo, especialmente na diminuição da reabsorção óssea. As prováveis

explicações para a ação do GLP-2 sobre o processo de remodelação óssea incluem ações diretas sobre os osteoclastos, alterações nas vias de sinalização entre osteoblastos e osteoclastos, ou mesmo a indução de síntese de fatores de crescimento ou de diferenciação que inibem a função reabsortiva dos osteoclastos ⁽⁴⁰⁾. Estudo recente lista o GLP-2 como uma das drogas que diminui a reabsorção óssea através de modificações dos subtipos de osteoclastos predominantes e de sua atividade, não ocorrendo aumento no seu número ⁽⁵⁴⁾.

1.4.2 Serotonina

Outro elemento cuja influência sobre o metabolismo ósseo tem sido debatida mais recentemente é a serotonina, sendo ela, assim como o GLP-2, um hormônio entérico. Sua síntese se processa em alguns passos, sendo o triptofano (TP) a substância inicial que, sob a ação da enzima triptofano-hidroxilase (Tph), se transforma em 5-HTP (5-Hidroxi-Triptofano), sendo esta etapa a limitante e mais importante para a síntese de serotonina. Existem duas isoformas enzimáticas Tph1 e Tph2, presentes respectivamente no intestino e no SNC. Outras reações ocorrem, culminando com a produção da substância final 5-HT, que é a serotonina ⁽⁵⁵⁾.

A serotonina é um neurotransmissor monoaminérgico sintetizado nos neurônios serotoninérgicos do Sistema Nervoso Central (SNC). O seu papel nos transtornos afetivos e depressivos é bem compreendido, além de sua influência em funções cognitivas como memória, humor e sono ⁽⁵⁵⁾.

O controle neuronal da fisiologia óssea é uma área de interesse recente, pois o tecido ósseo é innervado por neurônios simpáticos e sensoriais. A síntese neuronal da serotonina é negativamente controlada pela leptina, que atua na diminuição da expressão da Tph2 nessas células. Por mecanismos indiretos e ainda pouco conhecidos, a serotonina produzida no SNC parece atuar estimulando a remodelação óssea, tanto formação quanto reabsorção ⁽⁵⁶⁾.

Cerca de 95% da serotonina periférica é sintetizada e armazenada nas células enterocromafins das criptas presentes principalmente no duodeno, sob estímulo após as refeições efetuado pela acetilcolina, estimulação simpática, aumento da pressão intraluminal e diminuição do pH do trato gastrointestinal (TGI). Essa substância produzida no intestino é liberada para a circulação, sendo rapidamente captada pelas plaquetas por dois transportadores de membrana identificados: 5-HTT e SERT (transportador de serotonina), sendo estocada nas plaquetas na forma de grânulos densos, o que constitui a quase totalidade da serotonina circulante. A serotonina produzida periféricamente não cruza a barreira hematoencefálica por ter sua molécula carregada positivamente, tornando esses dois compartimentos independentes do ponto-de-vista funcional ⁽⁵⁵⁾.

A serotonina é metabolizada pela enzima MAO (Monoamina Oxidase) por uma reação de deaminação oxidativa, transformando-se em 5-HIAA ("*5-Hidroxiindol Acetic Acid*"), processo que ocorre preferencialmente no fígado. Quando a via hepática de metabolização da serotonina não

ocorre, essa substância é então metabolizada no endotélio dos capilares pulmonares ⁽⁵⁵⁾.

A presença ubíqua de receptores da serotonina em seres humanos permite inferir seu papel em vários sistemas fisiológicos. Pelo menos 7 famílias de receptores 5-HT já foram identificados com muitos subtipos. Estes receptores são acoplados à proteína G, tendo quase sempre como segundo mensageiro o monofosfato de adenosina cíclico ⁽⁵⁵⁾.

No TGI, a serotonina tem importante papel na secreção intestinal e na sua peristalse. Nas plaquetas, atua na agregação plaquetária, e no sistema cardiovascular, regula a contração da musculatura lisa. Evidências existem para o seu papel no crescimento e diferenciação celular e desenvolvimento ⁽⁵⁵⁾.

A serotonina tem ação sobre o metabolismo da glicose. Poucas evidências anteriores sugeriam que a serotonina tinha um efeito hiperglicemiante. No entanto, trabalhos mais atuais apontam essa substância como um agente hipoglicemiante, sendo o mecanismo exato ainda desconhecido. Alguns estudos explicam esse fenômeno pela expressão de receptores de serotonina do tipo 5-HT_{2A} na musculatura esquelética de animais e humanos, cuja ativação resultaria em um aumento da captação de glicose. A insulina parece não mediar esse efeito ⁽⁵⁵⁾.

Evidências da presença de receptores de serotonina em osteoblastos, osteócitos e fibroblastos, além de estudos moleculares mostrando que a serotonina pode estimular um aumento da atividade da

fosfatase alcalina mediada por PTH (Hormônio da paratireóide) em clones de osteoblastos, contribuíram para o início da compreensão das ações da serotonina no metabolismo ósseo ⁽⁵⁵⁾.

O gene chamado Lrp5 (*Low-density lipoprotein receptor-related protein 5*) passou a ter sua biologia ligada ao osso a partir de estudos de mutações nesse gene. A Síndrome de excesso de massa óssea (*The high bone mass syndrome*) é uma doença que se manifesta em adolescentes e que persiste na idade adulta, e decorre de mutação com ganho de função no gene Lrp5. Por outro lado, as mutações com perda de função desse mesmo gene causam a osteoporose com pseudoglioma, uma doença associada à cegueira ao nascimento, com perda progressiva de massa óssea que se manifesta nos dois primeiros anos de vida do indivíduo portador ⁽⁵⁷⁾.

Estudos utilizando microarranjos de DNA (ácido desoxirribonucleico) revelaram que o gene Tph1, cujo produto é a enzima triptofano-hidroxilase 1, enzima-chave na produção intestinal de serotonina periférica, tem sua expressão muito aumentada quando ocorre mutação com perda de função da proteína do gene Lrp5. Resultados concordantes foram retirados a partir da observação de que pacientes portadores de mutações com perda de função da proteína do gene Lrp5 apresentam elevadas concentrações séricas de serotonina, o contrário também ocorrendo nos pacientes com mutações com ganho de função do gene Lrp5 ⁽⁵⁸⁾.

A partir desses dados, conclui-se que a expressão do gene Lrp5 favorece a formação óssea por meio da diminuição da produção de

serotonina produzida no intestino. Portanto, a serotonina periférica tem ação inibitória na formação óssea ⁽⁵⁸⁾.

Acredita-se que a serotonina produzida no intestino liga-se ao receptor serotoninérgico Htr1b, presente na superfície do osteoblasto, ativando então o fator transcricional CREB (*cAMP response element binding protein*), o que culmina na diminuição da proliferação dos osteoblastos, embora esse processo ainda seja pouco conhecido ^(58, 59).

Portanto, admite-se que a serotonina tenha ações diferentes no metabolismo ósseo a depender da origem da síntese, se neuronal ou intestinal. A de origem central atua estimulando as vias de formação e reabsorção óssea, enquanto a periférica tem ação inibitória na formação óssea ⁽⁵⁶⁾.

Estudo clínico recente avaliou a relação entre a medida da serotonina sérica, a DMO avaliada pelo método DEXA (*Dual Energy X-ray Absorptiometry*) medida nos sítios corpo total e coluna vertebral, a DMO volumétrica trabecular no colo do fêmur e de coluna avaliada por Tomografia computadorizada quantitativa, além de parâmetros microestruturais ósseos no rádio distal, estes últimos avaliados por Tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução. Análises multivariadas demonstraram que a medida de serotonina é um preditor negativo de DMO volumétrica trabecular de colo de fêmur total e de espessura trabecular de rádio, o que confirma a importância da serotonina periférica na regulação da massa óssea em humanos ⁽⁶⁰⁾.

Conclui-se portanto que o TGI possui ações fisiológicas no controle do metabolismo ósseo através de diferentes vias, sendo o GLP-2 e a serotonina hormônios atuantes nesse processo. No sentido de compreender o papel desses hormônios gastrintestinais no *turnover* ósseo e para estudar o seu eventual papel nas alterações ósseas do diabetes nos propomos a avaliar a remodelação óssea de mulheres pós-menopausadas portadoras de DM2 por meio de suas dosagens em teste de refeição mista, comparando com controles pós-menopausadas não diabéticas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito de uma refeição mista sobre as concentrações séricas dos marcadores de remodelação óssea osteocalcina e CTX (telopectídeo C-terminal do pró-colágeno tipo I), bem como sobre as concentrações séricas dos hormônios entéricos GLP-2 e serotonina, nos tempos basal (imediatamente antes da refeição), 30, 60, 120 e 180 minutos após a refeição, em mulheres portadoras de DM2 e pós-menopausadas com baixa densidade mineral óssea (DMO).

2.2 Objetivos específicos

- Estudar associação das medidas basais de CTX, osteocalcina, GLP-2 e serotonina com a DMO;
- Analisar associação das medidas basais de CTX, osteocalcina, GLP-2 e serotonina com o IMC e do IMC com a DMO.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Estudamos mulheres menopausadas há pelo menos 4 anos[†] com osteopenia (definida pela OMS como densidade mineral óssea com T-score entre -1,0 e -2,5, medida pela técnica DEXA) ou osteoporose (o mesmo T-score estando -2,5 ou menor), divididas em 2 grupos: o primeiro, composto por portadoras de diabetes tipo 2 (diagnóstico pelos critérios da Sociedade Brasileira de Diabetes – SBD[‡]), e o segundo, dito controle, por mulheres sem diagnóstico de Diabetes Mellitus nem qualquer outra alteração no metabolismo dos carboidratos (Glicemia de jejum Alterada ou Intolerância à glicose pelos critérios da SBD[§]). As mulheres tinham IMC entre 20 e 35 kg/m².

Considerou-se como diagnóstico de menopausa quando houvesse relato do último sangramento menstrual há mais de 4 anos nas mulheres não hysterectomizadas e/ou alterações hormonais compatíveis, que foram medidas séricas de FSH > 35mUI/mL e de estradiol < 15pg/mL.

O grupo das mulheres portadoras de diabetes tipo 2 (grupo DM) foi recrutado no ambulatório de Diabetes do serviço de Endocrinologia do

[†] O motivo para a inclusão de mulheres que tivessem pelo menos quatro anos de menopausa é que após esse período as taxas de remodelação óssea já devem estar aumentadas, o que permite a detecção pelos ensaios de dosagem dos marcadores de remodelação óssea com maior sensibilidade.

[‡] Glicemia plasmática de jejum ≥ 126 mg/dL ou glicemia duas horas pós-sobrecarga de 75 g de glicose ≥ 200 mg/dL ou glicemia plasmática ao acaso ≥ 200 g/dL com sintomas de hiperglicemia.

[§] Glicemia plasmática de jejum entre 100-126 mg/dL ou glicemia duas horas pós-sobrecarga de 75 g de glicose 140-200 mg/dL.

HCFMUSP (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo), e o grupo controle (grupo CO), no ambulatório dos funcionários dos servidores do complexo hospitalar do HC-FMUSP (AMS – Atendimento Médico aos Servidores). As pacientes foram convidadas a participar do estudo, e às que desejassem, era oferecido o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), em anexo, com preenchimento devido. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do hospital onde o estudo foi conduzido.

Os critérios de exclusão aplicados foram todos os abaixo especificados, que compreendem condições, doenças ou uso de medicamentos que alteram o metabolismo ósseo, ou a anatomia ou a funcionalidade do intestino, o que poderia comprometer a fisiologia dos hormônios entéricos:

- hiperglicemia no momento do oferecimento da refeição mista maior que 250 mg/dL; qualquer doença aguda com comprometimento do estado geral; colectomia prévia; imobilização por tempo maior que 6 meses; nefropatia diabética na forma de macroalbuminúria ou de *clearance* de creatinina estimado pela fórmula de Cockcroft-Gault** menor do que 60 ml/min; insuficiência renal aguda; insuficiência hepática, outra doença óssea que não osteoporose atribuída à menopausa; dosagem sérica de 25-hidroxivitamina D persistentemente abaixo de 20 ng/ml, mesmo após reposição nas pacientes deficientes; síndrome de Cushing; hipertireoidismo descompensado; hipogonadismo que não a insuficiência gonadal menopáusica; tabagismo; etilismo com uso diário de 20 g de álcool

** Clearance de creatinina (mL/min) = $(140 - \text{idade em anos}) \times \text{peso (kg)} / 72 \times \text{creatinina sérica (mg/dL)}$ (em mulheres: $\times 0,85$).

ou mais; uso atual ou prévio, no último ano, de medicamentos que alteram o metabolismo ósseo, como glitazonas, fenitoína, carbamazepina, lítio, corticóides, bisfosfonatos, esteróides sexuais, heparina, quimioterápicos e imunossupressores.

3.1 Exames complementares iniciais

Inicialmente, solicitou-se a densitometria óssea para cada paciente que desejasse participar da pesquisa, sendo este exame realizado no aparelho do fabricante Hologic, modelo “*Discovery W*”, que faz a medida pela técnica DXA, método que utiliza a absorção de fótons de raios-X de dupla energia. Os dados fornecidos do coeficiente de variação do serviço de densitometria do INRAD (Instituto de Radiologia) para este aparelho foram de 1,3% para coluna lombar, 1,6% para fêmur total e 2,0% para colo femoral.

As pacientes que tiveram resultado densitométrico compatível com o diagnóstico de osteopenia ou osteoporose pelos critérios da OMS acima especificados foram submetidas à coleta de exames de sangue e de urina de 24 horas. As medidas feitas foram: Glicemia de jejum, hemoglobina glicada, uréia, creatinina, sódio, potássio, ALT (alanina aminotransferase), AST (Aspartato aminotransferase), FSH (Hormônio Folículo-estimulante), LH (Hormônio Luteinizante), Estradiol, TSH (Hormônio Tireotrófico), T4 livre (tiroxina), dosagem de 25hidroxivitamina D, PTH (Paratormônio), cálcio e fósforo, além de urina I e coleta de urina de 24 horas para mensuração de albuminúria, calciúria e fosfatúria. Todos esses exames iniciais foram realizados no Laboratório Central do HCFMUSP. O grupo CO foi submetido

à teste de tolerância com 75 g de glicose para que se excluísse quaisquer alterações glicêmicas (Diabetes Mellitus, Glicemia de jejum alterada ou Intolerância à glicose). Todos esses exames foram realizados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

3.2 Reposição de 25hidroxivitamina D

As pacientes que tiveram medida de 25-hidroxivitamina D inicial abaixo de 30 ng/mL receberam reposição na forma de colecalciferol 2.000 UI/dia oral, inicialmente na forma de solução oleosa manipulada pela Farmácia do HCFMUSP, apresentação de 200 UI/gota, dose de 10 gotas/dia, além de orientações gerais a respeito da importância de aumento da exposição solar diária e do aumento na ingestão de alimentos ricos em vitamina D. A dosagem de 25hidroxivitamina D foi repetida após 90 dias de iniciada a reposição, e nas pacientes que persistiam com níveis abaixo de 30 ng/mL, alterou-se a reposição do colecalciferol para a apresentação de cápsula com 25.000 UI/cápsula, também de fabricação própria da Farmácia do HC-FMUSP, dose de 01 cápsula/semana. Foram feitas dosagens de 25hidroxivitamina D com manutenção da reposição, até que se atingisse um alvo de medida igual ou superior a 20 ng/mL.

3.3 Teste de refeição mista

As pacientes que tiveram dosagem de 25-hidroxivitamina D igual ou superior a 20 ng/mL foram então submetidas ao chamado teste de refeição mista.

Os testes de refeição foram realizados na sala de testes do serviço de endocrinologia do HCFMUSP às 7 horas da manhã após jejum de 12 horas. Medicamentos como inibidores seletivos de recaptação da serotonina e diuréticos tiazídicos foram suspensos 48 horas antes do teste. Os demais medicamentos foram mantidos, inclusive os antidiabéticos orais e insulina.

O teste era iniciado com a coleta de sangue para as medidas basais de glicemia, insulinemia, osteocalcina, CTX, GLP-2 e serotonina, cujos métodos de dosagem estão descritos abaixo. Nas pacientes diabéticas era coletada amostra para glicemia capilar, sendo o teste suspenso se essa medida fosse superior a 250 mg/dL.

Após a coleta basal, as pacientes recebiam uma refeição de desjejum, tipo café-da-manhã preparada na cozinha metabólica do setor de nutrição do HCFMUSP, composta por 1 pão francês, 6 bolachas salgadas, 5 g de margarina, 15 g de geleia *diet*, 70 g de mamão tipo papaia picado, 200 mL de leite desnatado, 50 mL de café em infusão e 2 sachês de adoçante em pó (cada um com 0,8g). A constituição de nutrientes dessa refeição era de 562 kcal, sendo 51,2 % desse total calórico de carboidratos (72,1 g), 33,4% de lipídeos (20,9 g) e 15,4% de proteína (21,2 g), além de 8,2 g de ácidos graxos monoinsaturados e 5,22 g de ácidos graxos

poliinsaturados. As pacientes foram orientadas a ingerir a refeição em um prazo máximo de 15 minutos.

A partir do tempo inicial (contado a partir do início da ingestão dos alimentos) eram coletadas amostras de sangue nos tempos 30, 60, 120 e 180 minutos. A figura abaixo demonstra as etapas da metodologia do estudo.

Figura 2 - 1. Densitometria óssea; 2. Densidade mineral óssea; 3. Grupo das pacientes portadoras de diabetes; 4. Grupo das pacientes controles; 5. Exclusões do grupo DM: 7 pacientes por níveis de 25hidrivitamina D fora do alvo após reposição, 5 por abandono do seguimento, 2 por início de medicamentos contidos nos critérios de exclusão; 6. Exclusões do grupo CO: 24 pacientes por abandono do seguimento, 2 por início de medicamentos contidos nos critérios de exclusão e 1 por TTGO (Teste de tolerância com 75 g de glicose) alterado

3.4 Ensaios para as medidas de osteocalcina, CTX, GLP-2 e serotonina

As dosagens de osteocalcina plasmática, CTX, GLP-2 e serotonina, esses três últimos medidos a partir do soro, foram feitas no LIM 18 da FMUSP (Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaios), para onde foram encaminhados 2 tubos de amostras de sangue por paciente. O primeiro tubo continha gel separador, e o segundo, 7,2 mg de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) adicionado de 0,15 mL de aprotinina obtida de pulmão bovino, um inibidor de proteases, fabricante Sigma Aldrich sendo este último armazenado em gelo até o processamento final no laboratório.

As dosagens de osteocalcina foram realizadas com kit do fabricante Diasource®, método ELISA (*Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay*), cujos valores de referência de normalidade variam de 5 a 25 ng/mL. A variação intra-ensaio é de 3 a 5%, e a entre ensaios é de 3,5 a 5,6%. As medidas de CTX, com kit do fabricante IDS®, método ELISA, com valores de referência de normalidade de 0,142 a 1,351 ng/mL para mulheres pós-menopausadas, variação intra-ensaio de 1,7 a 3%, e a entre ensaios de 3 a 11%. As dosagens de GLP-2, com kit do fabricante Millipore®, método ELISA, curva padrão de 1 a 64 ng/mL, variação intra-ensaio menor do que 10% e entre ensaios menor do que 12%. As medidas de serotonina, com kit do fabricante Diasource®, método ELISA, com valores de referência de normalidade para mulheres variando entre 80 e 450 ng/mL, variação intra-ensaio de 3,9 a 5,4%, e entre ensaios, de 6%.

3.5 Análise estatística

Para o projeto inicial, a estimativa estatística do tamanho da amostra necessário para o cumprimento dos objetivos acima era de 40 mulheres, sendo 20 para cada grupo.

Foram utilizados os *softwares* Excel versão 2011 e SPSS versão 15.0 para a realização dessa análise. Os testes foram realizados com nível de significância de 5%. Além da sua descrição, para as variáveis qualitativas foram aplicados teste exato de Fisher ou teste da razão de verossimilhança, e, quando possível pela sua distribuição, o teste do qui-quadrado. As variáveis quantitativas foram comparadas entre os grupos de pacientes diabéticas e controles utilizando-se o teste t-Student, já que os dados tiveram distribuição normal verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados relativos às dosagens de osteocalcina, CTX, GLP-2 e serotonina nos tempos do teste de refeição mista foram avaliados pela ANOVA (análise de variância) de medidas repetidas e dois fatores, tempo e grupo. Os resultados estatisticamente significantes pela ANOVA foram submetidos a análises de comparações múltiplas de Tukey. As associações entre as variáveis numéricas foram feitas a partir do coeficiente de correlação de Pearson ⁽⁶¹⁾.

4 RESULTADOS

Foram avaliadas 150 mulheres pós-menopausadas, que foram submetidas inicialmente a densitometria óssea, como demonstrado previamente no algoritmo da figura 1. Ao final do recrutamento e após as devidas exclusões, foram selecionadas 23 mulheres portadoras de DM2 (grupo DM) e 20 controles (grupo CO) para a realização dos testes de refeição.

Abaixo descrevemos as variáveis quantitativas como média $\pm$ desvio-padrão. Na tabela 1 estão descritas algumas variáveis clínicas e densitométricas, que também foram comparadas entre os grupos. Os 2 grupos avaliados foram semelhantes em relação à idade e ao tempo de menopausa. O IMC foi de $30 \pm 3,9 \text{ kg/m}^2$ no grupo DM, maior do que no grupo CO. Comparando a DMO média nos diversos sítios estudados entre os grupos, as diabéticas tiveram maior DMO de colo de fêmur ($0,78 \pm 0,09 \text{ g/cm}^2$) e de fêmur total ($0,93 \pm 0,09 \text{ g/cm}^2$) comparadas às controles, achado concordante com as diferenças entre os grupos no que se refere aos valores de T-score de colo de fêmur e fêmur total. Por outro lado, os grupos foram semelhantes quando comparados em relação a DMO de coluna lombar, embora os valores de T-score da coluna lombar tenham sido estatisticamente diferentes.

Tabela 1 - Comparação das variáveis clínicas e densitométricas iniciais das pacientes de acordo com o grupo (portadoras de diabetes ou controles)

Variável	Grupo DM ¹ (n=23) Média (Desvio-padrão)	Grupo CO ² (n=20) Média (Desvio-padrão)	Valor-p ³
Idade (anos)	59,8 (4,2)	57,8 (3,3)	0,087
Tempo de menopausa (anos)	9,8 (4,3)	7,4 (4,5)	0,105
Tempo de Diabetes (anos)	13,7 (9,2)	—	—
IMC ⁴ (kg/m ²)	30 (3,9)	27 (5,3)	0,044
DMO ⁵ colo fêmur (g/cm ²)	0,78 (0,09)	0,69 (0,08)	0,003
T-score colo fêmur	-0,69 (0,72)	-1,58 (0,61)	<0,001
DMO ⁵ fêmur total (g/cm ²)	0,93 (0,09)	0,82 (0,09)	<0,001
T-score fêmur total	-0,15 (0,69)	-1,07 (0,76)	<0,001
DMO ⁵ coluna lombar L1-L4 (g/cm ²)	0,87 (0,09)	0,82 (0,12)	0,17
T-score coluna lombar L1-L4	-1,07 (0,73)	-2,3 (0,96)	0,029

1. Grupo das pacientes portadoras de diabetes 2. Grupo das pacientes controles 3. Valor-p pelo teste t-Student 4. Índice de Massa Corporal 5. Densidade mineral óssea

Outras variáveis clínicas estão representadas na tabela 2. A ocorrência prévia referida de fratura por fragilidade foi muito infrequente (apenas uma paciente no grupo CO). Cerca de 70% das pacientes com diabetes na amostra estudada eram também portadoras de hipertensão arterial, e quase metade de obesidade. Ambas as doenças foram menos prevalentes nas pacientes do grupo CO ($p < 0,05$). O uso de medicamentos ISRS (Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina) foi mais frequente no grupo DM do que no grupo CO (34,8% e 5% respectivamente, $p = 0,024$).

Outro resultado que evidenciou diferenças entre os grupos foi o sítio de baixa DMO. A condição de baixa densidade mineral óssea concomitante em fêmur e coluna lombar ocorreu em 63% das controles, e em 14% das diabéticas ($p = 0,007$).

Tabela 2 - Comparação de outras variáveis clínicas e densitométricas das pacientes de acordo com o grupo (portadoras de diabetes ou controles)

Variável		Grupo DM ¹ no (%)	Grupo CO ² no (%)	Valor-p ³
Histerectomia	Sim	5 (21,7)	3 (15)	0,704
Fratura por fragilidade	Sim	0 (0)	1 (5)	0,465
Uso de álcool	Sim	1 (4,3)	4 (20)	0,167
Tabagismo no passado	Sim	8 (34,8)	7 (35)	0,988
Exercício físico	Sim	7 (30,4)	8 (40)	0,512
Hipertensão arterial	Sim	16 (69,6)	5 (25)	0,004
Dislipidemia	Sim	17 (73,9)	8 (40)	0,025
Obesidade	Sim	11 (47,8)	1 (5)	0,002
Sítio baixa DMO ⁴	Fêmur	3 (13)	2 (10,5)	0,007
	Coluna	16 (69,6)	5 (26,3)	
	Fêmur e coluna	4 (17,4)	12 (63,2)	
Diagnóstico densitométrico	Osteopenia	21 (91,3)	13 (65)	0,059
	Osteoporose	2 (8,7)	7 (35)	
Uso de tiazídicos	Sim	8 (34,8)	4 (20)	0,281
Uso de ISRS ⁵	Sim	8 (34,8)	1 (5)	0,024
TOTAL		n=23 (100%)	n=20 (100%)	

1. Grupo das pacientes portadoras de diabetes 2. Grupo das pacientes controles 3. Valor-p pelo teste do qui-quadrado 4. Densidade mineral óssea 5. Inibidores seletivos de recaptação de serotonina

As pacientes do grupo DM tinham em média $13,7 \pm 9,2$ anos de diagnóstico de diabetes e tiveram média de hemoglobina glicada de $7,8 \pm 1,7\%$. 47,8% dessas pacientes faziam uso de insulina, e 91,3% de antidiabéticos orais. As classes desses antidiabéticos orais utilizadas estão discriminadas na tabela 3. Quanto à presença das complicações crônicas, a mais prevalente foi a doença macrovascular (presente em 4 pacientes diabéticas, portanto em 14,4%, todas na forma de doença coronariana). A frequência das demais complicações diabéticas (retinopatia, microalbuminúria e neuropatia) está disposta também na tabela 3.

Tabela 3 - Descrição de algumas variáveis clínicas nas pacientes diabéticas

Variável		Grupo DM ¹ n° (%)
Uso de antidiabéticos orais	Sim	21 (91,3)
Uso de sulfoniuréias	Sim	13 (56,5)
Uso de metformina	Sim	21 (91,3)
Uso de outros tipos de antidiabéticos orais	Sim	1 (4,3)
Uso de insulina	Sim	11 (47,8)
Retinopatia diabética	Sim	2 (8,7)
Microalbuminúria	Sim	3 (13,0)
Neuropatia diabética	Sim	2 (8,7)
Doença macrovascular diabética	Sim	4 (17,4)
TOTAL		23 (100)

1. Grupo das pacientes portadoras de diabetes

Os resultados dos exames laboratoriais iniciais das pacientes no momento da inclusão estão evidenciados na tabela 4. Os valores que resultaram em valor-p menor do que 0,05 na comparação entre os grupos foram os relativos às dosagens séricas de LH, FSH e CTX e às plasmáticas de osteocalcina. O valor médio de LH no grupo CO foi de $36,2 \pm 11,4$ UI/L, e o do grupo DM de $24,2 \pm 12,4$ UI/L. O valor médio de FSH no grupo CO foi de $78,1 \pm 13,4$ UI/L, e o do grupo DM de $49,7 \pm 16,5$ UI/L. As mulheres diabéticas apresentaram concentrações médias basais dos marcadores de remodelação óssea CTX e osteocalcina menores do que as controles, com $p = 0,04$ e $0,008$, respectivamente.

Tabela 4 - Descrição das variáveis laboratoriais iniciais das pacientes de acordo com o grupo (portadoras de diabetes ou controles)

Variável	VR ¹	Grupo DM ² (n=23) Média (Desvio- padrão)	Grupo CO ³ (n=20) Média (Desvio- padrão)	Valor-p ⁴
HbA1c ⁵ (%)	4,1 a 6,0	7,8 (1,7)	—	—
Hemoglobina (g/dL)	12 a 16	13,1 (1,0)	13,0 (0,9)	0,753
Leucometria (mil/mm ³)	4 a 11	6,8 (2,2)	5,8 (1,8)	0,15
Plaquetometria (mil/mm ³)	140 a 450	283,9 (59,7)	264,2 (38,6)	0,228
AST ⁶ (U/L)	< 31	25,2 (15,0)	25,5 (13,7)	0,95
ALT ⁷ (U/L)	< 31	27,7 (16,1)	23,5 (11,8)	0,39
Uréia (mg/dL)	10 a 50	36,7 (11,3)	31,6 (7,7)	0,15
Creatinina (mg/dL)	0,5 a 0,9	0,75 (0,14)	0,74 (0,1)	0,77
Sódio (mEq/L)	135 a 145	141,4 (4,0)	142,6 (2,4)	0,33
Potássio (mEq/L)	3,5 a 5	4,5 (0,3)	4,3 (0,2)	0,06
Magnésio (mg/dL)	1,6 a 2,6	1,9 (0,2)	2,1 (0,2)	0,13
LH ⁸ (UI/L)	15 a 64	24,2 (12,4)	36,2 (11,4)	0,006
FSH ⁹ (UI/L)	31 a 134	49,7 (16,5)	78,1 (13,4)	<0,001
Estradiol (pg/mL)	< 25	15,7 (2,7)	17,9 (6,0)	0,15
TSH ¹⁰ (mU/mL)	0,3 a 4	2,2 (1,1)	2,3 (1,0)	0,86
T4 livre ¹¹ - (ng/dL)	0,7 a 1,5	1,1 (0,2)	1,0 (0,1)	0,09
Cálcio total (mg/dL)	8,6 a 10,2	9,6 (0,6)	9,3 (0,6)	0,129
Fósforo (mg/dL)	2,7 a 4,5	3,9 (0,5)	3,6 (0,5)	0,164
PTH ¹² (pg/mL)	16 a 87	45,3 (18,8)	51,1 (17,0)	0,237
25hidroxivitamina D (ng/mL)	30 a 100	21,3 (8,5)	20,4 (5,2)	0,685
CTX ¹³ (ng/mL)	0,142 a 1,351	0,49 (0,25)	0,66 (0,22)	0,04
Osteocalcina (ng/mL)	5 a 25	10,2 (5,4)	14,8 (5,3)	0,008
GLP-2 ¹⁴ (ng/mL)	1 a 6415 ¹⁵	4,1 (2,0)	3,8 (1,8)	0,61
Serotonina (ng/mL)	80 a 450	152,9 (106,3)	196,9 (74,2)	0,854
Calciúria de 24 horas (mg/vol de 24h)	100 a 320	174,7 (91,6)	151,9 (63,2)	0,44
Fosfatúria de 24 horas (mg/vol de 24h)	400 a 1300	528,4 (233,1)	544,3 (169,6)	0,84

1. Valores de referência 2. Grupo das pacientes portadoras de diabetes 3. Grupo das pacientes controles 4. Teste t-Student 5. Hemoglobina glicada 6. Aspartato aminotransferase 7. Alanina aminotransferase 8. Hormônio luteinizante 9. Hormônio folículo-estimulante 10. Hormônio tireoestimulante 11. Tiroxina livre 12. Paratormônio 13. Fragmento carboxiterminal do colágeno tipo I 14. "Glucagon-like peptide 2" 15. Valores informados no kit como os detectados na curva-padrão do analito

As concentrações de CTX, osteocalcina, GLP-2 e serotonina ao longo dos tempos do teste de refeição estão descritas na tabela 5 em anexo.

Conforme observado no gráfico 1 e na tabela 5 em anexo, as concentrações séricas de CTX diminuíram ao longo dos tempos do teste de refeição ($p < 0,05$), com exceção apenas do basal para 30 minutos, e de 120 para 180 minutos ($p > 0,05$). Comparando os grupos em relação às suas curvas ao longo do teste de refeição, houve diferença estatística ($p = 0,003^*$), sendo essa diferença atribuída aos seus valores basais diferentes, já que o grupo CO apresentou valores basais maiores do que os do grupo DM, bem como também a uma menor variação do CTX do grupo DM ao longo do teste (-0,21 no grupo DM vs -0,38 ng/mL no grupo CO, $p < 0,05$).

Gráfico 1 - Curvas das concentrações de CTX sérico com seus perfis médios e respectivos erros-padrão dos grupos das diabéticas (cor vermelha) e controles (cor preta) ao longo dos tempos do teste de refeição

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$ pela análise de comparações múltiplas de Tukey no tempo basal do teste de refeição) * Houve variação estatisticamente significativa ao longo do teste de refeição ($p < 0,05$ pela ANOVA)

Gráfico 2 – Comparações do Δ CTX (CTX do tempo 180 minutos do teste de refeição – CTX basal) entre os grupos DM e CO

* Variação estatisticamente significativa na comparação do Δ CTX (Teste T-student)

As concentrações plasmáticas de osteocalcina diminuíram gradativamente nos dois grupos ao longo do teste de refeição conforme demonstrado no gráfico 3 e tabela 5 em anexo ($p < 0,001$), com exceção dos seguintes intervalos do teste: entre 30 e 60 minutos ($p = 0,597$), e entre 120 e 180 minutos ($p = 0,997$) (tabela 8 em anexo). As curvas dos dois grupos foram semelhantes em relação a essa variável ao longo do teste de refeição mista ($p = 0,222$).

Gráfico 3 - Curvas das concentrações de osteocalcina plasmática com seus perfis médios e respectivos erros-padrão dos grupos das diabéticas (cor vermelha) e controles (cor preta) ao longo dos tempos do teste de refeição

Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$ pela análise de comparações múltiplas de Tukey no tempo basal do teste de refeição)

* Houve variação estatisticamente significativa ao longo do teste de refeição ($p < 0,05$ pela ANOVA)

As concentrações de GLP-2 variaram ao longo dos tempos do teste de refeição em ambos os grupos ($p < 0,001$) (tabela 7), com aumento do basal para 30 minutos, e redução a partir de 120 minutos (tabela 9), conforme também demonstrado no gráfico 4 abaixo e na tabela 5 em anexo, sem diferença entre os grupos.

Gráfico 4 - Curvas das concentrações de GLP-2 sérico com seus perfis médios e respectivos erros-padrão dos grupos das diabéticas (cor vermelha) e controles (cor preta) ao longo dos tempos do teste de refeição

* Houve variação estatisticamente significativa ao longo do teste de refeição ($p < 0,05$ pela ANOVA)

As concentrações de serotonina não variaram de maneira estatisticamente significativa ao longo dos tempos do teste de refeição mista nos 2 grupos estudados ($p=0,853$) (tabela 7). No entanto, comparando os 2 grupos estudados, estes tiveram curvas estatisticamente diferentes ($p=0,023$). A análise de múltiplas comparações de Tukey, representada na tabela 10 em anexo, demonstrou que essa diferença entre os grupos ocorreu somente no tempo 120 minutos ($p=0,026$), no qual houve um pico nas concentrações de serotonina sérica no grupo CO, que pode ser visto inclusive abaixo no gráfico 5.

Gráfico 5 - Curvas das concentrações de serotonina sérica com seus perfis médios e respectivos erros-padrão dos grupos das diabéticas (cor vermelha) e controles (cor preta) ao longo dos tempos do teste de refeição

* Houve variação estatisticamente significativa ao longo do teste de refeição ($p < 0,05$ pela ANOVA)

As concentrações séricas de serotonina das mulheres que faziam uso de ISRS foram $71,9 \pm 58,4$ ng/mL, significativamente menores ($p < 0,05$) que as observadas naquelas que não faziam uso dessa classe de medicamentos ($200,2 \pm 83,4$ ng/mL), porém não houve diferença entre a DMO de fêmur e coluna lombar entre elas ($p > 0,05$). A análise comparativa da dinâmica da serotonina ao longo do teste entre as mulheres que faziam uso do ISRS em relação às que não faziam uso também não foi diferente estatisticamente ($p > 0,05$).

Não houve correlação no grupo DM entre HbA1c e DMO nos sítios avaliados. Também não houve correlação estatisticamente significativa entre as variações máximas a partir do tempo basal das concentrações de CTX sérico e osteocalcina plasmática com o GLP-2 ou a serotonina séricos ao longo do teste de refeição nem na amostra total, nem nos grupos DM e CO analisados individualmente.

O IMC apresentou correlação positiva e estatisticamente relevante ($p = 0,004$ e $r = 0,444$) com a DMO do quadril. Observamos também outras correlações estatisticamente importantes (tabela 11 em anexo): as concentrações séricas de osteocalcina, em todos os tempos do teste de refeição, se correlacionaram negativamente com o IMC. Por outro lado, não houve correlação do CTX com o IMC ou com a DMO.

Em se tratando dos hormônios entéricos, também em todos os tempos do teste de refeição, as concentrações séricas de serotonina correlacionaram-se negativamente com a DMO da coluna lombar ($p < 0,05$), e as concentrações séricas de GLP-2 correlacionaram-se positivamente com a DMO do fêmur (tanto colo quanto fêmur total), com p também $< 0,05$. Todas essas correlações estão dispostas na tabela 11 em anexo.

5 DISCUSSÃO

Este estudo é único ao analisar as relações entre marcadores da remodelação óssea em resposta à refeição mista em mulheres pós-menopausadas portadoras de DM2 e sua possível interação com hormônios intestinais com ação no metabolismo ósseo com o objetivo de compreender melhor a fragilidade óssea de indivíduos com diabetes.

Os grupos foram semelhantes em relação à idade e ao tempo de menopausa, fatores relevantes quando se trata de metabolismo ósseo. As pacientes diabéticas tinham um controle glicêmico inadequado com HbA1c média de 7,8%, sendo que quase metade delas fazia uso de insulina. A hipertensão arterial foi bastante prevalente entre as diabéticas, e a complicação crônica mais frequente presente nesse mesmo grupo foi a doença macrovascular, sendo todas essas características clínicas muito comuns no contexto da população de portadores de DM2.

O fato do grupo DM ter apresentado IMC compatível com obesidade constitui um fator negativo, atenuado pela dificuldade de se recrutar pacientes portador de DM2 sem sobrepeso ou obesidade, já que essas doenças frequentemente estão associadas. Algumas alterações no osso do indivíduo obeso são conhecidas, como a densidade mineral óssea aumentada e algumas alterações estruturais, não sendo consensual a repercussão dessa condição no risco de fratura ⁽⁶²⁾. Bem recentemente, Viljakainen *et al.* descreveram, em pacientes obesos graves (IMC médio de

40 kg/m²), a resposta de vários marcadores de remodelação óssea, inclusive osteocalcina e CTX, ao teste de tolerância à glicose oral com duração de 2 horas, relatando concentrações menores dos mesmos nesses indivíduos comparados com controles pareados ^(63, 64).

O uso de ISRS foi mais frequente no grupo das diabéticas ($p = 0,024$) do que no grupo CO, sendo esse fator desfavorável para o estudo, apesar do período instituído de *wash-out* ⁽⁶⁵⁾. Não conseguimos explicar o fato das concentrações de serotonina terem sido menores nas mulheres que faziam uso de ISRS. Não houve interferência do uso da ISRS na resposta da serotonina ao longo do teste de refeição ($p > 0,05$).

O tamanho da amostra, embora tenha sido considerado de antemão como suficiente para o projeto, foi outro ponto negativo do nosso estudo, podendo algumas incertezas terem sido resolvidas se tivéssemos um maior número de sujeitos.

Comparando a DMO das mulheres diabéticas em relação às controles, o grupo DM apresentou maior DMO nos sítios colo de fêmur e fêmur total, dado concordante com a literatura, tendo o estudo Roterdã ⁽⁸⁾ evidenciado ainda aumento de DMO também em coluna vertebral, o que difere da amostra aqui descrita. Não houve correlação entre a HbA1c e a DMO no subgrupo das portadoras de DM, provavelmente pelo tamanho reduzido da nossa amostra, o que diferiu do resultado apresentado por Majima *et al*, tendo esses autores estudado 145 diabéticos ⁽¹³⁾.

As mulheres do grupo CO apresentaram concentrações médias de LH e FSH maiores do que as portadoras de DM2, embora as médias dos 2 grupos tenham sido compatíveis com medidas da menopausa. O perfil de secreção das gonadotrofinas na pós-menopausa não é claramente conhecido. Atualmente existem evidências de que o FSH tem efeitos diretos no osso, causando uma perda óssea independente das baixas concentrações dos estrógenos ⁽⁶⁶⁾. Não foi possível definir se no presente estudo a concentração menor de FSH no grupo DM teria algum papel nos achados.

Em se tratando de resultados laboratoriais iniciais relativos ao metabolismo ósseo, as médias das dosagens iniciais séricas de 25hidroxivitamina D, cálcio e fósforo, bem como as plasmáticas de PTH de ambos os grupos foram semelhantes.

Os valores médios iniciais de osteocalcina e CTX basais das pacientes diabéticas foram menores do que os das mulheres controles, ou seja, as diabéticas da nossa amostra apresentaram *turnover* ósseo diminuído. Existe heterogeneidade nos resultados dos estudos que avaliam os marcadores de remodelação óssea em diabéticos. Recente meta-análise(67) descreve concentrações médias de osteocalcina e CTX menores nos portadores de diabetes comparados com indivíduos saudáveis, e relata ainda que essas alterações não são explicadas pela hiperglicemia por si. Não se pode excluir a influência do peso corporal nos valores menores de osteocalcina e CTX.

Os fatores envolvidos nesse processo de redução dos marcadores de remodelação óssea não são claramente conhecidos, mas alguns podem ser pontuados, como a hiperglicemia, que tem efeito inibitório na diferenciação dos osteoclastos mediada pelo RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B), este último uma peça-chave no sistema de controle da reabsorção óssea ^(67, 68).

O uso da refeição mista como estímulo à produção dos hormônios entéricos GLP-2 e serotonina torna os resultados desse trabalho bastante aplicáveis à prática clínica, enquanto outros autores com interesse de estudar o fenômeno da influência dos nutrientes na remodelação óssea utilizaram teste de tolerância à glicose oral ⁽⁴³⁾, ou mesmo o oferecimento dos nutrientes individualmente ⁽⁴⁰⁾.

Os dados de CTX no presente estudo foram semelhantes aos descritos na literatura: as diabéticas têm valores menores no basal. A menor queda do CTX após estímulo da refeição mista até então não foi descrito, embora Chailurkit *et al* tenham demonstrado a diminuição da resposta do CTX ao teste de tolerância à glicose oral em diabéticos ⁽⁴³⁾.

Em relação à variação da osteocalcina plasmática ao longo do teste de refeição, ambos os grupos apresentaram reduções ao longo do teste, o que difere dos dados de Henriksen D.B *et al.* ⁽⁴⁰⁾, embora esses autores não tenham utilizado o teste de refeição mista.

As variações nas concentrações de GLP-2 ao longo do teste de refeição ocorreram nos dois grupos de maneira semelhante, confirmando

assim a ingestão de nutrientes como um possível fator de estímulo para a produção desse hormônio entérico ^(51, 69). No entanto, como as curvas desse hormônio entre os grupos foram semelhantes ao longo do teste, não podemos atribuir ao GLP-2 a partir desse estudo nenhuma associação com as alterações na remodelação óssea das diabéticas estudadas.

Por outro lado, a serotonina sérica não se apresentou no nosso estudo como uma variável estimulada pelo teste de refeição. A literatura descreve a alimentação como um fator estimulador ⁽⁵⁵⁾, embora não existam estudos com esse modelo de estímulo com refeição mista. Apesar dos cuidados desde as fases pré-analíticas até o ensaio hormonal, aventamos a possibilidade de interferentes no ensaio empregado neste estudo justificarem essa falta de padrão nos grupos avaliados. Outra possibilidade é que essa via de estimulação para a produção da serotonina pelo trato gastrointestinal tenha influentes desconhecidos até o momento. Também não houve diferença entre os grupos quando avaliadas as curvas de serotonina entre si, portanto esse fator hormonal não se mostrou como uma possível via importante associada às alterações ósseas nas portadoras de DM2. Não conseguimos explicar o pico de serotonina sérica no grupo CO no tempo 120 minutos do teste de refeição.

A correlação positiva entre a DMO de quadril e o IMC no presente trabalho pode ser justificada pela associação conhecida entre obesidade e aumento da DMO ⁽⁶²⁾, podendo inclusive ter favorecido o achado da maior DMO de quadril no grupo DM. Já a correlação negativa entre as concentrações plasmáticas de osteocalcina e o IMC dos nossos resultados

também condiz com os achados de supressão do *turnover* ósseo descritos por Viljakainen *et al.* para obesos, embora, como já dito, tenham sido estudados obesos graves.

A correlação positiva entre as concentrações de GLP-2 sérico e a DMO de fêmur, tanto do colo quanto do quadril, não está descrita na literatura. Por outro lado, a correlação negativa das concentrações de serotonina com a DMO de coluna lombar presente nos nossos dados já foi anteriormente descrita.

6 CONCLUSÃO

Concluimos que os diabéticos tipo 2 têm DMO maior, especificadamente em fêmur, tendo ainda o metabolismo ósseo alterado, demonstrado por concentrações menores dos marcadores de formação e reabsorção óssea, além da menor resposta do marcador de reabsorção óssea à alimentação, não se podendo excluir a interferência do fator obesidade nessas alterações. Não evidenciamos a importância do GLP-2 e da serotonina nessas alterações da remodelação óssea em diabéticos tipo 2.

7.1 TABELAS 5 A 11

Tabela 5 - Descrição das variáveis CTX¹, osteocalcina, GLP-2² e serotonina avaliados de acordo com o grupo (portadoras de diabetes ou controle) e com o tempo em minutos ao longo do Teste de Refeição

Variável	Tempos do Teste de Refeição (minutos)	Grupo					
		DM ³			CO ⁴		
		Média	DP ⁵	TOTAL	Média	DP ⁵	TOTAL
CTX ¹ (ng/mL)	0	0,49	0,25	23	0,66	0,22	20
	30	0,46	0,25	23	0,63	0,21	20
	60	0,40	0,19	23	0,48	0,14	20
	120	0,32	0,12	23	0,34	0,10	20
	180	0,28	0,08	23	0,29	0,08	20
Osteocalcina (ng/mL)	0	10,20	5,40	23	14,77	5,31	20
	30	9,88	5,56	23	13,84	5,15	20
	60	9,49	5,21	23	13,74	4,86	20
	120	8,71	4,63	23	13,18	4,36	20
	180	8,45	4,61	23	13,35	4,30	20
GLP-2 ² (ng/mL)	0	4,10	1,95	23	3,80	1,84	20
	30	4,85	2,20	23	4,24	1,71	20
	60	4,77	1,89	23	4,20	1,61	20
	120	4,24	1,70	23	3,67	1,77	20
	180	3,68	1,44	23	3,47	1,66	20
Serotonina (ng/mL)	0	152,86	106,26	23	196,86	74,24	20
	30	150,78	116,23	23	201,58	86,76	20
	60	149,10	101,19	23	209,61	83,35	20
	120	137,14	88,21	23	232,34	87,97	20
	180	147,01	87,23	23	213,32	96,44	20

1. Fragmento carboxiterminal do colágeno tipo I 2. "Glucagon-like peptide 2" 3. Grupo das pacientes portadoras de diabetes 4. Grupo das pacientes controles 5. Desvio-padrão

Tabela 6 - Resultados das comparações múltiplas de Tukey para a as concentrações séricas de CTX¹ segundo os grupos (portadoras de diabetes ou controles) analisados individualmente em intervalos do Teste de Refeição, e depois comparados entre si em cada tempo do Teste de Refeição

Comparação do CTX ¹ sérico			Valor-p ²
Entre intervalos de tempo do Teste de Refeição nos grupos individualmente			
Grupo DM ³	Intervalos	0 - 30 minutos	0,733
		30 - 60 minutos	0,035
		60 - 120 minutos	0,002
		120 - 180 minutos	0,326
Grupo CO ⁴	Intervalos	0 - 30 minutos	0,610
		30 - 60 minutos	<0,001
		60 - 120 minutos	<0,001
		120 - 180 minutos	0,137
Entre os grupos DM ³ e CO ⁴ entre si nos tempos do Teste de Refeição			
Tempos	0 minuto	DM ³ - CO ⁴	0,040
	30 minutos	DM ³ - CO ⁴	0,055
	60 minutos	DM ³ - CO ⁴	0,825
	120 minutos	DM ³ - CO ⁴	>0,999
	180 minutos	DM ³ - CO ⁴	>0,999

1. Fragmento carboxiterminal do colágeno tipo I 2. Valor- p originado das comparações múltiplas de Tukey 3. Grupo das pacientes portadoras de diabetes 4. Grupo das pacientes controles

Tabela 7 - Resultado das análises de variância (ANOVA) para comparação dos marcadores ao longo do Teste de Refeição entre os grupos (portadoras de diabetes e controles) a partir dos fatores grupo e tempo

Variável	Fator	Valor-p ¹
CTX ² (ng/mL)	Grupo	0,06
	Tempo	<0,001
	Grupo x Tempo ³	0,003
Osteocalcina (ng/mL)	Grupo	0,004
	Tempo	<0,001
	Grupo x Tempo ³	0,222
GLP2 ⁴ (ng/mL)	Grupo	0,34
	Tempo	<0,001
	Grupo x Tempo ³	0,636
Serotonina (ng/mL)	Grupo	0,016
	Tempo	0,853
	Grupo x Tempo ³	0,023

1. Valor de p originado da ANOVA com medidas repetidas e dois fatores (grupo e tempo) 2. Fragmento carboxiterminal do colágeno tipo I 3. Análise de variância considerando 2 fatores: grupo e tempo do teste de refeição 4. "Glucagon-like peptide 2"

Tabela 8 - Resultados das comparações múltiplas de Tukey para a as concentrações plasmáticas de osteocalcina segundo os grupos (portadoras de diabetes ou controles) comparados entre si em cada intervalo do Teste de Refeição

Intervalos de comparação entre os grupos DM ¹ e CO ²	Valor-p ³
0 minuto - 180 minutos	0,002
0 minuto - 30 minutos	0,006
30 minutos - 60 minutos	0,597
60 minutos - 120 minutos	0,001
120 minutos - 180 minutos	0,997

1. Grupo das pacientes portadoras de diabetes 2. Grupo das pacientes controles 3. Valor- p originado das comparações múltiplas de Tukey

Tabela 9 - Resultados das comparações múltiplas de Tukey para a as concentrações séricas de GLP-2¹ comparadas entre si em cada intervalo do Teste de Refeição na amostra total (portadoras de diabetes e controles)

Comparação (amostra total)	Diferença média	Erro-padrão	Valor-p ²
Intervalos			
0 minuto - 30 minutos	-0,60	0,14	<0,001
30 minutos - 60 minutos	0,06	0,14	0,992
60 minutos - 120 minutos	0,53	0,14	0,003
120 minutos - 180 minutos	0,39	0,14	0,053

1. "Glucagon-like peptide 2" 1. Valor- p originado das comparações múltiplas de Tukey

Tabela 10 - Resultados das comparações múltiplas de Tukey para a as concentrações séricas de serotonina segundo os grupos (portadoras de diabetes ou controles) analisados individualmente em intervalos do Teste de Refeição, e depois comparados entre si em cada tempo do Teste de Refeição

Comparação da serotonina sérica			Valor-p ¹
Entre intervalos de tempo do Teste de Refeição nos grupos individualmente			
Grupo DM ²	Intervalos	0 minuto - 30 minutos	>0,999
		30 minutos - 60 minutos	>0,999
		60 minutos - 120 minutos	0,950
		120 minutos - 180 minutos	0,986
Grupo CO ³	Intervalos	0 minuto - 30 minutos	>0,999
		30 minutos - 60 minutos	0,998
		60 minutos - 120 minutos	0,380
		120 minutos - 180 minutos	0,640
Entre os grupos DM ² e CO ³ entre si nos tempos do Teste de Refeição			
Tempos	0 minuto	DM ² - CO ³	0,854
	30 minutos	DM ² - CO ³	0,715
	60 minutos	DM ² - CO ³	0,475
	120 minutos	DM ² - CO ³	0,026
	180 minutos	DM ² - CO ³	0,339

1. Valor- p originado das comparações múltiplas de Tukey 2. Grupo das pacientes portadoras de diabetes 3. Grupo das pacientes controles

Tabela 11 - Resultado das correlações entre as variáveis IMC¹, DMO² e os marcadores CTX³, osteocalcina, GLP-2⁴ e serotonina estudados ao longo dos tempos do teste de refeição na amostra avaliada

Correlação ⁵		IMC ¹	DMO ² colo F (g/cm ²)	DMO ² total F (g/cm ²)	DMO ² coluna (g/cm ²)
GLP-2 ⁴ 0 min (ng/mL)	r	0,221	0,506	0,431	0,126
	p	0,164	0,001	0,004	0,432
Serot ⁶ 0 min (ng/mL)	r	-0,004	-0,183	-0,104	-0,346
	p	0,981	0,253	0,51	0,026
Osteoc ⁷ 0 min (ng/mL)	r	-0,352	-0,125	-0,29	-0,165
	p	0,024	0,436	0,063	0,303
CTX ³ 0 min (ng/mL)	r	0,147	0,012	-0,095	-0,152
	p	0,359	0,942	0,549	0,344
GLP-2 ⁴ 30 min (ng/mL)	r	0,221	0,497	0,36	0,16
	p	0,165	0,001	0,019	0,318
Serot ⁶ 30 min (ng/mL)	r	-0,052	-0,138	-0,065	-0,354
	p	0,745	0,39	0,682	0,023
Osteoc ⁷ 30 min (ng/mL)	r	-0,339	-0,092	-0,253	-0,129
	p	0,03	0,568	0,106	0,422
CTX ³ 30 min (ng/mL)	r	0,007	0,012	-0,092	-0,211
	p	0,964	0,94	0,561	0,185
GLP-2 ⁴ 60 min (ng/mL)	r	0,251	0,453	0,374	0,12
	p	0,114	0,003	0,015	0,456
Serot ⁶ 60 min (ng/mL)	r	-0,118	-0,248	-0,142	-0,44
	p	0,464	0,119	0,371	0,004
Osteoc ⁷ 60 min (ng/mL)	r	-0,417	-0,131	-0,307	-0,16
	p	0,007	0,413	0,048	0,319
CTX ³ 60 min (ng/mL)	r	0,007	0,051	-0,073	-0,198
	p	0,965	0,753	0,645	0,214
GLP-2 ⁴ 120 min (ng/mL)	r	0,241	0,442	0,37	0,126
	p	0,129	0,004	0,016	0,432
Serot ⁶ 120 min (ng/mL)	r	-0,008	-0,331	-0,246	-0,376
	p	0,959	0,035	0,116	0,016
Osteoc ⁷ 120 min (ng/mL)	r	-0,397	-0,192	-0,346	-0,189
	p	0,01	0,23	0,025	0,236

continua

Tabela 11 - Resultado das correlações entre as variáveis IMC¹, DMO² e os marcadores CTX³, osteocalcina, GLP-2⁴ e serotonina estudados ao longo dos tempos do teste de refeição na amostra avaliada (conclusão)

Correlação ⁵		IMC ¹	DMO ² colo F (g/cm ²)	DMO ² total F (g/cm ²)	DMO ² coluna (g/cm ²)
CTX ³ 120 min (ng/mL)	r	0,043	0,246	0,05	-0,013
	p	0,79	0,121	0,755	0,933
GLP2- ⁴ 180 min (ng/mL)	r	0,261	0,358	0,349	0,093
	p	0,099	0,021	0,023	0,562
Serot ⁶ 180 min (ng/mL)	r	0,102	-0,25	-0,166	-,332*
	p	0,525	0,114	0,293	0,034
Osteoc ⁷ 180 min (ng/mL)	r	-0,366	-0,238	-0,37	-0,233
	p	0,019	0,133	0,016	0,142
CTX ³ 180 min (ng/mL)	r	0,002	0,191	0,017	0,085
	p	0,988	0,233	0,916	0,596

1. Índice de Massa Corporal 2. Densidade mineral óssea 3. Fragmento carboxiterminal do colágeno tipo I 4. "Glucagon-like peptide 2" 5. Correlação de Pearson 6. Serotonina 7. Osteocalcina

7.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP: TELEFONE: (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD(.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: O papel dos hormônios entéricos GLP-2 e serotonina no metabolismo ósseo de mulheres pós-menopausadas portadoras de diabetes mellitus tipo 2

PESQUISADOR : **LAURA DA SILVA GIRÃO LOPES**

CARGO/FUNÇÃO: **MÉDICA INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 127.222**

UNIDADE DO HCFMUSP: ENDOCRINOLOGIA -PRÉDIO DOS AMBULATÓRIOS

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : Realização de exames para inclusão (tempo variável) + Estudo: 2 horas

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa avaliar os efeitos de uma refeição mista nas dosagens séricas de osteocalcina, CTX, GLP-2 e serotonina, em mulheres com osteoporose ou osteopenia pós-menopáusia, comparando os resultados em 2 grupos distintos: diabéticas e não diabéticas/ ou com qualquer outra alteração no metabolismo dos carboidratos;

2 – Será coletada amostra de sangue em veia periférica para realização de exames importantes para o estudo, sendo depois administrada refeição mista pré-definida, e coletadas novamente outras amostras de sangue para análise;

3 – Além do desconforto habitual da coleta de sangue, não haverá nenhum outro ocasionado pela sua inclusão neste estudo;

5 – Não há benefício direto para o participante. No entanto, o presente estudo pode propiciar, na medida em que estuda alterações ósseas, benefícios futuros no tratamento destas doenças;

6 – Em qualquer etapa do estudo, a senhora terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é a Dra Laura da Silva Girão Lopes, que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 - Cerqueira César - 05403-000 / São Paulo – Brasil. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – A senhora terá direito de ser mantida atualizada sobre os resultados parciais das pesquisas, quando disponíveis, ou totais, no momento do fim do estudo;

11 – Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 – A pesquisadora acima citada se compromete a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa; não havendo a possibilidade do seu uso inadequado;

Acredito ter sido suficientemente informada a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Marcadores de formação e reabsorção ósseos e níveis séricos de GLP-2 e serotonina após refeição mista em mulheres diabéticas com alteração da massa óssea pós-menopáusia”. Eu discuti com a Dra Laura da Silva Girão Lopes sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura da paciente/representante legal Data / /

Assinatura da testemunha

Data / /

(para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável -----

Data:

8 REFERÊNCIAS

1. Thé AC GA, Bandeira L, Bandeira F. Osteoporose Pós-menopausa: Classificação e Diagnóstico. 2a ed. Bandeira F GH, Griz L, Faria M, Lazaretti-Castro M, editor. Rio de Janeiro (RJ): Medbook; 2009.
2. Vanasse A, Dagenais P, Niyonsenga T, Gregoire JP, Courteau J, Hemiri A. Bone mineral density measurement and osteoporosis treatment after a fragility fracture in older adults: regional variation and determinants of use in Quebec. *BMC musculoskeletal disorders*. 2005;6:33.
3. WHO Scientific Group on the assessment of osteoporosis at primary health care level. Bruxelas (Bélgica): Organização Mundial da Saúde, 2004.
4. Cooper C, Cole ZA, Holroyd CR, Earl SC, Harvey NC, Dennison EM, et al. Secular trends in the incidence of hip and other osteoporotic fractures. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2011;22(5):1277-88.
5. Pinheiro MM, Ciconelli RM, Martini LA, Ferraz MB. Clinical risk factors for osteoporotic fractures in Brazilian women and men: the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Osteoporos Int*. 2009;20(3):399-408.
6. Melton LJ, 3rd, Leibson CL, Achenbach SJ, Therneau TM, Khosla S. Fracture risk in type 2 diabetes: update of a population-based study. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2008;23(8):1334-42.
7. Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, Hu FB. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *American journal of epidemiology*. 2007;166(5):495-505.

-
8. de L, II, van der Klift M, de Laet CE, van Daele PL, Hofman A, Pols HA. Bone mineral density and fracture risk in type-2 diabetes mellitus: the Rotterdam Study. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2005;16(12):1713-20.
 9. Leslie WD, Lix LM, Prior HJ, Derksen S, Metge C, O'Neil J. Biphasic fracture risk in diabetes: a population-based study. *Bone*. 2007;40(6):1595-601.
 10. Oei L, Zillikens MC, Dehghan A, Buitendijk GH, Castano-Betancourt MC, Estrada K, et al. High bone mineral density and fracture risk in type 2 diabetes as skeletal complications of inadequate glucose control: the Rotterdam Study. *Diabetes care*. 2013;36(6):1619-28.
 11. Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, Kaji H, Sugimoto T. Diabetic patients have an increased risk of vertebral fractures independent of BMD or diabetic complications. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2009;24(4):702-9.
 12. Ma L, Oei L, Jiang L, Estrada K, Chen H, Wang Z, et al. Association between bone mineral density and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *European journal of epidemiology*. 2012;27(5):319-32.
 13. Majima T, Komatsu Y, Yamada T, Koike Y, Shigemoto M, Takagi C, et al. Decreased bone mineral density at the distal radius, but not at the lumbar spine or the femoral neck, in Japanese type 2 diabetic patients. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2005;16(8):907-13.

14. Viegas M, Costa C, Lopes A, Griz L, Medeiro MA, Bandeira F. Prevalence of osteoporosis and vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus and their relationship with duration of the disease and chronic complications. *Journal of diabetes and its complications*. 2011;25(4):216-21.
15. Arikan S, Tuzcu A, Bahceci M, Ozmen S, Gokalp D. Insulin resistance in type 2 diabetes mellitus may be related to bone mineral density. *J Clin Densitom*. 2012;15(2):186-90.
16. Giangregorio LM, Leslie WD, Lix LM, Johansson H, Oden A, McCloskey E, et al. FRAX underestimates fracture risk in patients with diabetes. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2012;27(2):301-8.
17. Moseley KF. Type 2 diabetes and bone fractures. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2012;19(2):128-35.
18. Kahn SE, Zinman B, Lachin JM, Haffner SM, Herman WH, Holman RR, et al. Rosiglitazone-associated fractures in type 2 diabetes: an Analysis from A Diabetes Outcome Progression Trial (ADOPT). *Diabetes care*. 2008;31(5):845-51.
19. Grey A, Bolland M, Fenwick S, Horne A, Gamble G, Drury PL, et al. The skeletal effects of pioglitazone in type 2 diabetes or impaired glucose tolerance: a randomized controlled trial. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2014;170(2):257-64.
20. Richards JB, Papaioannou A, Adachi JD, Joseph L, Whitson HE, Prior JC, et al. Effect of selective serotonin reuptake inhibitors on the risk of fracture. *Archives of internal medicine*. 2007;167(2):188-94.

-
21. Kapoor D, Aldred H, Clark S, Channer KS, Jones TH. Clinical and biochemical assessment of hypogonadism in men with type 2 diabetes: correlations with bioavailable testosterone and visceral adiposity. *Diabetes care*. 2007;30(4):911-7.
 22. Miazgowski T, Noworyta-Zietara M, Safranow K, Ziemak J, Widecka K. Serum adiponectin, bone mineral density and bone turnover markers in post-menopausal women with newly diagnosed Type 2 diabetes: a 12-month follow-up. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2012;29(1):62-9.
 23. Saito M, Kida Y, Kato S, Marumo K. Diabetes, Collagen, and Bone Quality. *Current osteoporosis reports*. 2014.
 24. Saito M, Marumo K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2010;21(2):195-214.
 25. Cramer C, Freisinger E, Jones RK, Slakey DP, Dupin CL, Newsome ER, et al. Persistent high glucose concentrations alter the regenerative potential of mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*. 2010;19(12):1875-84.
 26. Piarulli F, Sartore G, Lapolla A. Glyco-oxidation and cardiovascular complications in type 2 diabetes: a clinical update. *Acta diabetologica*. 2013;50(2):101-10.
 27. Schwartz AV, Garnero P, Hillier TA, Sellmeyer DE, Strotmeyer ES, Feingold KR, et al. Pentosidine and increased fracture risk in older adults with type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(7):2380-6.

-
28. Shiraki M, Kuroda T, Tanaka S, Saito M, Fukunaga M, Nakamura T. Nonenzymatic collagen cross-links induced by glycoxidation (pentosidine) predicts vertebral fractures. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2008;26(1):93-100.
 29. Shu A, Yin MT, Stein E, Cremers S, Dworakowski E, Ives R, et al. Bone structure and turnover in type 2 diabetes mellitus. *Osteoporos Int*. 2012;23(2):635-41.
 30. Reyes-Garcia R, Rozas-Moreno P, Lopez-Gallardo G, Garcia-Martin A, Varsavsky M, Aviles-Perez MD, et al. Serum levels of bone resorption markers are decreased in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol*. 2011.
 31. Akin O, Gol K, Akturk M, Erkaya S. Evaluation of bone turnover in postmenopausal patients with type 2 diabetes mellitus using biochemical markers and bone mineral density measurements. *Gynecol Endocrinol*. 2003;17(1):19-29.
 32. Okazaki R, Totsuka Y, Hamano K, Ajima M, Miura M, Hirota Y, et al. Metabolic improvement of poorly controlled noninsulin-dependent diabetes mellitus decreases bone turnover. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(9):2915-20.
 33. Wei J, Ducy P. Co-dependence of bone and energy metabolisms. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2010;503(1):35-40.
 34. Ducy P. The role of osteocalcin in the endocrine cross-talk between bone remodelling and energy metabolism. *Diabetologia*. 2011;54(6):1291-7.
 35. Kim YS, Paik IY, Rhie YJ, Suh SH. Integrative physiology: defined novel metabolic roles of osteocalcin. *Journal of Korean medical science*. 2010;25(7):985-91.

-
36. Patti A, Gennari L, Merlotti D, Dotta F, Nuti R. Endocrine actions of osteocalcin. *International journal of endocrinology*. 2013;2013:846480.
37. Bjarnason NH, Henriksen EE, Alexandersen P, Christgau S, Henriksen DB, Christiansen C. Mechanism of circadian variation in bone resorption. *Bone*. 2002;30(1):307-13.
38. Walsh JS, Henriksen DB. Feeding and bone. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2010;503(1):11-9.
39. Clowes JA, Allen HC, Prentis DM, Eastell R, Blumsohn A. Octreotide abolishes the acute decrease in bone turnover in response to oral glucose. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(10):4867-73.
40. Henriksen DB, Alexandersen P, Bjarnason NH, Vilsboll T, Hartmann B, Henriksen EE, et al. Role of gastrointestinal hormones in postprandial reduction of bone resorption. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2003;18(12):2180-9.
41. Pietschmann P, Resch H, Woloszczuk W, Willvonseder R. A circadian rhythm of serum osteocalcin levels in postmenopausal osteoporosis. *European journal of clinical investigation*. 1990;20(3):310-2.
42. Clowes JA, Robinson RT, Heller SR, Eastell R, Blumsohn A. Acute changes of bone turnover and PTH induced by insulin and glucose: euglycemic and hypoglycemic hyperinsulinemic clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(7):3324-9.
43. Chailurkit LO, Chanprasertyothin S, Rajatanavin R, Ongphiphadhanakul B. Reduced attenuation of bone resorption after oral glucose in type 2 diabetes. *Clinical endocrinology*. 2008;68(6):858-62.

-
44. Holst JJ, Gromada J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004;287(2):E199-206.
 45. Nauck MA. Unraveling the science of incretin biology. *Am J Med*. 2009;122(6 Suppl):S3-S10.
 46. Yazbeck R, Howarth GS, Abbott CA. Growth factor based therapies and intestinal disease: is glucagon-like peptide-2 the new way forward? *Cytokine & growth factor reviews*. 2009;20(2):175-84.
 47. Drucker DJ. Glucagon-like peptide 2. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(4):1759-64.
 48. Jeppesen PB, Lund P, Gottschalck IB, Nielsen HB, Holst JJ, Mortensen J, et al. Short bowel patients treated for two years with glucagon-like Peptide 2: effects on intestinal morphology and absorption, renal function, bone and body composition, and muscle function. *Gastroenterology research and practice*. 2009;2009:616054.
 49. Sigalet DL, Martin GR. Hormonal therapy for short bowel syndrome. *Journal of pediatric surgery*. 2000;35(2):360-3; discussion 4.
 50. Holst JJ, Hartmann B, Gottschalck IB, Jeppesen PB, Miholic J, Henriksen DB. Bone resorption is decreased postprandially by intestinal factors and glucagon-like peptide-2 is a possible candidate. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2007;42(7):814-20.
 51. Gottschalck IB, Jeppesen PB, Hartmann B, Holst JJ, Henriksen DB. Effects of treatment with glucagon-like peptide-2 on bone resorption in colectomized patients with distal ileostomy or jejunostomy and short-bowel syndrome. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2008;43(11):1304-10.

-
52. Henriksen DB, Alexandersen P, Hartmann B, Adrian CL, Byrjalsen I, Bone HG, et al. Disassociation of bone resorption and formation by GLP-2: a 14-day study in healthy postmenopausal women. *Bone*. 2007;40(3):723-9.
53. Henriksen DB, Alexandersen P, Hartmann B, Adrian CL, Byrjalsen I, Bone HG, et al. Four-month treatment with GLP-2 significantly increases hip BMD: a randomized, placebo-controlled, dose-ranging study in postmenopausal women with low BMD. *Bone*. 2009;45(5):833-42.
54. Henriksen K, Bollerslev J, Everts V, Karsdal MA. Osteoclast activity and subtypes as a function of physiology and pathology--implications for future treatments of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2011;32(1):31-63.
55. Jonnakuty C, Gragnoli C. What do we know about serotonin? *Journal of cellular physiology*. 2008;217(2):301-6.
56. Ducy P, Karsenty G. The two faces of serotonin in bone biology. *J Cell Biol*. 2010;191(1):7-13.
57. Ducy P. 5-HT and bone biology. *Curr Opin Pharmacol*. 2011;11(1):34-8.
58. Karsenty G, Gershon MD. The importance of the gastrointestinal tract in the control of bone mass accrual. *Gastroenterology*. 2011;141(2):439-42.
59. Bliziotis M. Update in serotonin and bone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(9):4124-32.
60. Modder UI, Achenbach SJ, Amin S, Riggs BL, Melton LJ, 3rd, Khosla S. Relation of serum serotonin levels to bone density and structural parameters in women. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2010;25(2):415-22.

-
61. Kirkwood BR. Essential medical statistics. 2nd ed. Massachusetts, USA: Blackwell science; 2006.
62. Andersen S, Frederiksen KD, Hansen S, Brixen K, Gram J, Stoving RK. Bone Structure and Estimated Bone Strength in Obese Patients Evaluated by High-Resolution Peripheral Quantitative Computed Tomography. *Calcified tissue international*. 2014.
63. Viljakainen H, Ivaska KK, Paldanius P, Lipsanen-Nyman M, Saukkonen T, Pietilainen KH, et al. Suppressed bone turnover in obesity - a link to energy metabolism? A case-control study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;jc20133097.
64. Compston JE, Watts NB, Chapurlat R, Cooper C, Boonen S, Greenspan S, et al. Obesity is not protective against fracture in postmenopausal women: GLOW. *The American journal of medicine*. 2011;124(11):1043-50.
65. Hiemke C, Hartter S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacology & therapeutics*. 2000;85(1):11-28.
66. Iqbal J, Blair HC, Zallone A, Sun L, Zaidi M. Further evidence that FSH causes bone loss independently of low estrogen. *Endocrine*. 2012;41(2):171-5.
67. Starup-Linde J, Eriksen SA, Lykkeboe S, Handberg A, Vestergaard P. Biochemical markers of bone turnover in diabetes patients-a meta-analysis, and a methodological study on the effects of glucose on bone markers. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2014;25(6):1697-708.

-
68. Reyes-Garcia R, Rozas-Moreno P, Lopez-Gallardo G, Garcia-Martin A, Varsavsky M, Aviles-Perez MD, et al. Serum levels of bone resorption markers are decreased in patients with type 2 diabetes. *Acta diabetologica*. 2013;50(1):47-52.
69. Gottschalck IB, Jeppesen PB, Holst JJ, Henriksen DB. Reduction in bone resorption by exogenous glucagon-like peptide-2 administration requires an intact gastrointestinal tract. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2008;43(8):929-37.