UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Avaliação da atividade osteoblástica e osteoclástica em
diabéticos tipo 2 em tratamento com pioglitazonas**

Silvia Tchernin Himelfarb

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Titular Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo
2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Avaliação da atividade osteoblástica e osteoclástica em
diabéticos tipo 2 em tratamento com pioglitazonas**

Silvia Tchernin Himelfarb

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Titular Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo
2008
19207

DEDALUS - Acervo - CQ

30100014836

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

H657a Himelfarb, Silvia Tchernin
Avaliação da atividade osteoblástica e osteoclástica em
diabéticos tipo 2 em tratamento com pioglitazonas / Silvia
Tchernin Himelfarb. -- São Paulo, 2008.
91p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki

1. Diagnóstico molecular : Medicina 2. Expressão gênica
3. Diabete 4. Osteoporose I. T. II. Hirata, Mario Hiroyuki,
orientador.

616.0756 CDD

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Silvia Tchernin Himelfarb

Avaliação da atividade osteoblástica e osteoclástica em diabéticos tipo 2
em tratamento com pioglitazonas

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata
orientador/presidente

Marcelo Ferraz Sampaio
1º. examinador

Márcia Martins Silveira Bernik
2º. examinador

São Paulo, 15 de 08 de 2008.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Luiz, por sempre estar presente em minha vida mesmo nos anos em que vivi longe, por ser um paizão em que eu me orgulho muito, por sempre ter me orientado nas minhas escolhas profissionais, por ter me inspirado na escolha da minha profissão e por garantir que nunca faltasse nada para eu conquistar meus objetivos.

A minha mãe Frida, por ter me ensinado a ser uma pessoa forte e determinada, por ter sido carinhosa e protetora nos momentos em que mais precisei e pelo amor incondicional.

A minha segunda mãe Nícia, por cuidar com muito carinho de meu pai, por se preocupar comigo, por sua atenção, dedicação e doação.

Ao meu esposo Miler, por toda dedicação, amor, compreensão, por me ensinar a ser uma pessoa melhor, por estar sempre ao meu lado, por ser companheiro, por me fazer rir e chorar e por ter muita paciência comigo.

Sem vocês eu nunca teria conseguido, obrigado por tudo, amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Tit. Mario H. Hirata, meu orientador, por sempre estar disponível, pelos ensinamentos fornecidos, pela confiança e dedicação.

À prof^a. Assoc. Rosario D. C. Hirata, que sempre me ajudou em tudo que foi necessário me ensinando a ser organizada e disciplinada.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo, em nome da sua Diretora, Prof^a. Tit. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu chefe, Prof^a.
Dulcinéia Saes Parra Abdalla.

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – CAPES, pela bolsa de mestrado concedida no período de março de 2006 a fevereiro de 2008.

Aos professores e aos funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Aos médicos e funcionários do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia de São Paulo, em especial a Dra. Maria Isabel Del Mônico.

Aos pacientes, que contribuíram de maneira anônima para este estudo.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP), em especial ao Milano que sempre esteve ao meu lado me ajudando a vencer essa batalha que é a pós-graduação.

RESUMO

O diabetes melito é uma doença metabólica com alta prevalência na população e quando no estado descompensado pode causar diversas complicações metabólicas e clínicas, entre elas a osteoporose. Entretanto, ainda não foram completamente esclarecidos os mecanismos pelos quais o diabetes diminui a densidade mineral óssea e aumenta o risco a fraturas. Recentemente foram descritos alguns genes que estão envolvidos no turnover ósseo: *OPG*, *RANK* e *RANKL*. Além disso, o uso de hipoglicemiantes orais como as tiazolidinedionas (TZD), pode influenciar negativamente o metabolismo ósseo. Com a finalidade de identificar marcadores sensíveis de alteração do metabolismo ósseo foram investigadas as relações entre a expressão dos genes *OPG*, *RANK* e *RANKL* em células do sangue periférico e a resposta a TZDs em pacientes com DM2. Foram selecionados 52 indivíduos (36 diabéticos e 16 normoglicêmicos), no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. Os indivíduos diabéticos foram tratados com pioglitazona (15, 30 e 45 mg/ dia/ via oral) por 16 semanas. Foram colhidas amostras de sangue, antes e após o tratamento para determinação de exames laboratoriais e extração de RNA total. A expressão de mRNA dos genes *OPG*, *RANK* e *RANKL* foi quantificada e avaliada por RT-PCR em tempo real, empregando-se o *GAPD* como controle endógeno. Observou-se que nos pacientes DM2 após o tratamento com pioglitazona, houve diminuição da glicemia de jejum, glicemia pós-prandial, insulina, Hb1Ac, índices HOMA-IR e HOMA- β e aumento nas concentrações séricas de HDL, demonstrando a eficácia do tratamento. Ao comparar a expressão dos genes entre o grupo DM2 (sem tratamento) e o grupo normoglicêmico (NG), foi evidenciado um aumento da expressão de *OPG* no grupo NG em relação ao grupo DM2, e ao analisar a expressão entre as mulheres, constatou-se aumento da expressão de *RANK* no grupo DM2 em relação ao grupo NG. Além disso, ao correlacionar a expressão dos genes com as dosagens dos parâmetros bioquímicos, constatou-se que o aumento da expressão de *RANK* e *RANKL* está relacionado com o aumento das concentrações de cálcio ionizado e diminuição da expressão de *OPG*. Esses dados sugerem que a atividade osteoclástica está aumentada nos pacientes DM2 e com o tratamento o quadro osteoporótico pode ser agravado.

Palavras Chaves: diabetes tipo 2, osteoporose, pioglitazona, expressão gênica, *RANK*, *RANKL*, *OPG*.

ABSTRACT

The diabetes mellitus is a metabolic disease with high prevalence in the population and can cause various metabolic and clinic complications, including osteoporosis, when it is decompensated. However, the mechanisms by which diabetes decreases bone mineral density and increases the risk of fractures are not completely clarified. Recently some genes which are involved in bone turnover were described: *OPG*, *RANK* and *RANKL*. Moreover, the treatment using oral hypoglycemic drugs such as thiazolidinediones (TZD), may negatively affect the bone metabolism. In order to identify sensitive markers related to the bone metabolism, we investigated the relationship between the expression of genes *OPG*, *RANK* and *RANKL* in peripheral blood leukocytes and the response to TZDs treatment in patients with DM2. Fifty-two individuals were selected (36 diabetics and 16 normoglycemics) at Dante Pazzanese Institute of Cardiology. Diabetic patients were treated with pioglitazone (15, 30 and 45 mg / day / oral) during 16 weeks. Blood samples were collected for biochemical analyses and total RNA extraction, before and after treatment. Gene expression of the genes *OPG*, *RANK* and *RANKL* in peripheral blood mononuclear cells was evaluated by Real Time PCR, using the *GAPD* housekeeping gene as the endogenous reference. In DM2 patients after treatment with pioglitazone there was reduction in their fasting glycemia, postprandial glycemia, insulin, Hb1Ac, HOMA-IR and HOMA- β indices, and their serum concentrations of HDL increased, which demonstrates the effectiveness of the treatment. The bone profile markers have not altered after treatment, suggesting an anabolic action of the insulin in bone metabolism of these patients. Normoglycemics (NG) group gene expression, when compared with DM2 group (with no treatment), had increased *OPG* expression. Besides, *RANK* expression in group DM2 was higher than NG group when it was analyzed among women. Furthermore, having correlated the expression of the genes with the biochemical parameters data, the increase on *RANK* and *RANKL* gene expression is related to increased concentrations of ionized calcium and to decreased expression of *OPG* gene. These results are suggestive that osteoclastic activity is higher in DM2 patients, the treatment can exacerbate osteoporosis severity and the bone markers does not have enough sensibility to differentiate changes in individuals with type 2 diabetes mellitus.

Keywords: diabetes type 2, osteoporosis, pioglitazone, gene expression, *RANK*, *RANKL*, *OPG*.

LISTA DE ABREVIATURAS

(NFAT)-c1	Fator nuclear ativado de células T
AGEs	<i>Advanced glycation end products</i>
cDNA	Ácido Desoxi-ribonucleico complementar
c-fos	proto oncogene celular que codifica a proteína fos
CT	Colesterol Total
Ct	<i>Cycle treshold</i>
CTX	<i>Serum C - terminal telopeptide</i>
DM1	Diabete melito tipo 1
DM2	Diabete melito tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densitometria Óssea
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FDA	<i>Food and drug administration</i>
GAPD	Gliceraldeído desidrogenase
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HDL-c	Colesterol da HDL
HOMA-beta	<i>Homeostasis model assessment</i> – função secretora da célula beta
HOMA-IR	<i>Homeostasis model assesement</i> – resistência à insulina
IGF-I	<i>Insulin-like growth factor-I</i>
IMC	Índice de Massa Corpórea
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LDL-c	Colesterol de LDL
LTSP	Leucócitos totais do sangue periférico
mRNA	RNA Mensageiro
NF-κB	Fator nuclear-κB
NG	Normoglicêmico
OPG	Osteoprotegerina
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator – activated receptor γ</i>
PTH	Hormônio paratireóideo
RANK	Receptor para o fator nuclear Kappa B ativado
RANKL	Ligante do receptor para o fator nuclear Kappa B ativado

RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de PCR
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
T4L	Tetraiodotironina livre
TBE	Tampão tris borato EDTA
TNFRSF11A	Super família dos receptores dos fatores de necrose tumoral 11A
TNFRSF11B	Super família dos receptores dos fatores de necrose tumoral 11B
TNFSF11	Super família dos ligantes dos fatores de necrose tumoral 11
TRAF6	Receptor de TNF associado ao fator 6
TRAP	Fosfatase ácida tartarato-resistente
TSH	Hormônio tireoestimulante
TZDs	Tiazolidinedionas
UNG	Uracil - N – glicosilase
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
VLDL-c	Colesterol da VLDL
Δ Ct	Delta Ct
$\Delta\Delta$ Ct	Delta delta Ct

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	24
2.1 Geral	24
2.2 Específicos	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Casuística e Protocolo Terapêutico	25
3.2 Amostras Biológicas	26
3.3 Determinação dos Parâmetros Bioquímicos	27
3.3.1 Cálculo dos Índices Homa-IR e Homa-beta	28
3.4 Extração e Análise do RNA total	28
3.5 Análise da expressão de mRNA pela RT-PCR em Tempo Real	30
3.6 Análises Estatísticas	35
4 RESULTADOS	36
4.1 Características dos Pacientes.....	36
4.2 Resultados de Expressão Gênica em Leucócitos Totais do Sangue Periférico (LTSP)	40
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÕES	68
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
8 ANEXOS	75

1 INTRODUÇÃO

O diabetes melito é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas pela hiperglicemia resultantes do defeito de secreção e ou ação da insulina. Por isso essa enfermidade vem se tornando um dos maiores problemas de saúde pública do século 21. Estima-se que esta doença acomete mais de 200 milhões de indivíduos no mundo (MALECKI & KLUPA, 2005). Projeções indicam que o número de indivíduos que serão afetados pela doença em 2025 duplicará (RITCHIE *et al*, 2003). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006), o crescimento dos casos de diabetes está relacionado com alterações no estilo de vida e no perfil sócio-econômico destes indivíduos, diminuindo a expectativa de vida desses pacientes em 15 anos.

Na população brasileira entre 30 e 69 anos, a prevalência de diabetes melito é de cerca de 7% e chega a atingir cifras próximas a 20% na população acima dos 70 anos. Estima-se que 50% dessas pessoas ainda não foram diagnosticadas e 25% da população diabética não faz nenhum tipo de tratamento (PAIVA *et al*, 2006).

Existem três classes principais de diabetes: tipo 1, tipo 2 e gestacional. O diabetes melito tipo 2 (DM2) é a forma mais prevalente, responsável por 90% dos casos. O DM2 é caracterizado principalmente pela presença de distúrbios na secreção de insulina e ou incapacidade dos tecidos periféricos em responder à insulina (resistência à insulina) (ADA, 2008).

O diabetes é caracterizado pelo aumento da concentração plasmática de glicose basal e quando não controlado ou não diagnosticado em tempo hábil é responsável por complicações como aterosclerose, insuficiência renal, retinopatia,

osteoporose e isquemia periférica que pode resultar na amputação de membros inferiores (ADA, 2008).

A osteoporose é uma doença caracterizada pela diminuição da massa óssea e aumento da fragilidade óssea, determinada pelo balanço inadequado entre a reabsorção e a formação óssea, resultando no aumento do risco a fratura. A reconstrução óssea permite a adaptação a obstáculos mecânicos e mantém a homeostase entre cálcio e fósforo através de fases coordenadas de formação e reabsorção (THEOLEYRE *et al*, 2004; WADA *et al*, 2006).

A matriz óssea é formada por material orgânico e inorgânico. A matriz orgânica inclui uma camada de proteoglicano e colágeno tipo I, enquanto que a matriz inorgânica apresenta uma camada de hidroxiapatita (cristais de fosfato de cálcio) sendo o principal reservatório de cálcio. Nos adultos, 10% da massa óssea é reconstruída todo ano através da ação das células ósseas de formação e reabsorção (RHO *et al*, 2004; LI *et al*, 2006).

Os osteoblastos são células de origem mesenquimal (**Figura 1**), responsáveis por secretar a matriz orgânica e induzir a calcificação através do processo de formação óssea. Os osteoblastos são células cubóides que formam uma camada continua localizada na superfície externa do tecido ósseo onde o novo osso é criado. A atividade de formação óssea pelos osteoblastos é lenta e ocorre continuamente em todos os ossos, dessa maneira o novo osso é constantemente formado. A diferenciação e função destas células são reguladas por fatores de crescimento e citocinas (WALSH *et al*, 2006).

Os osteoclastos são derivados das células hematopoiéticas da linhagem monócito/macrófago (**Figura 1**). A sua principal função é destruir a superfície do osso velho ou fraturado durante o processo de reconstrução. Estas células estão

localizadas na superfície do osso, apresentam um formato discóide que compreende a borda ondulada (*ruffled zone*) e zona fechada (*sealing zone*). A borda ondulada contém elementos que reabsorvem os componentes orgânicos e inorgânicos do osso. Os osteoclastos através da borda ondulada secretam enzimas como a fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP) que ocasionam a descalcificação óssea e a cathepsina K que digere a matriz protéica óssea (WALSH *et al*, 2006). A ativação dos osteoclastos dissolve a matriz óssea, liberando cálcio ionizado no fluido extracelular alterando a homeostase do cálcio (LI *et al*, 2006).

Figura 1. Resumo esquemático da diferenciação celular óssea. As células mesenquimais que originam mioblastos, adipócitos, condrócitos e células estromais, diferenciam-se em preosteoblastos e depois se tornam osteoblastos na superfície óssea. Os osteoblastos também podem se incorporar ao osso como osteócitos. Os precursores da linhagem mielóide que originam macrófagos e células dendríticas, se transformam em preosteoclastos, fundem-se e originam osteoclastos multinucleados. Adaptado de: WALSH *et al*, 2006.

O equilíbrio entre a atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos é fortemente regulada por parâmetros físicos e por numerosos polipeptídeos. Qualquer desequilíbrio entre essas células pode ocasionar o desenvolvimento de anormalidades ósseas, caracterizadas pela diminuição (osteoporose) ou pelo aumento (osteopetrose) da massa óssea (THEOLEYRE *et al*, 2004; WADA *et al*, 2006).

A osteoporose é a mais comum das doenças que envolvem o metabolismo ósseo, afetando 200 milhões de pessoas no mundo, sendo a grande causa da diminuição da qualidade de vida, morbidade e mortalidade entre as mulheres pós-menopausa. A deficiência de estrógeno é responsável por 30 a 50% de perda óssea durante a vida das mulheres. No Brasil, estima-se que 10 milhões de indivíduos estão afetados pela osteoporose e devido ao aumento da expectativa de vida o número de fraturas no quadril entre homens e mulheres entre 50 e 60 anos irá aumentar 400% em 2050 em comparação a 1950 (STEINER *et al*, 2008).

A relação entre a densidade mineral óssea diminuída e o aumento do risco de fraturas em pacientes diabéticos foi descrito primeiramente por Albright e Reifenstein, em 1948. Posteriormente vários autores descreveram alterações no metabolismo ósseo dos pacientes diabéticos, utilizando diferentes técnicas de medida, para a avaliação da densidade mineral óssea (VESTERGAARD *et al*, 2005; ANAFOROGLU *et al*, 2008; HOSODA *et al*, 2008; HOLMBERG *et al*, 2008).

Estudos demonstraram que alterações no metabolismo ósseo estão associadas com diabetes melito tipo 1 (DM1) resultando em perda óssea, responsável por uma das complicações crônicas destes pacientes (SUZUKI *et al*, 2005). Entretanto, a possível associação entre densidade mineral óssea diminuída e o risco de osteoporose em pacientes com DM2 ainda é motivo de controvérsia

(SCHWARTZ *et al*, 2006 a e b; ANAFOROGLU *et al*, 2008; HOSODA *et al*, 2008; HOLMBERG *et al*, 2008).

Segundo Schwartz (2003), o diabetes pode influenciar o metabolismo ósseo por diversos mecanismos. A hiperglicemia gera altas concentrações de AGEs (*advanced glycation end products*) no colágeno podendo causar redução no crescimento ósseo, além disso, estudos demonstram que IGF-I (*Insulin-like growth factor-I*) possui efeito anabólico no osso. Segundo Okazaki e colaboradores (2006), o metabolismo ósseo altera-se quando a glicemia não está controlada, a hiperglicemia leva a diurese osmótica e conseqüentemente a hipercalcúria relativa, ocasionando um balanço negativo de cálcio e hiperparatiroidismo secundário, que pode resultar na reabsorção óssea acelerada, diminuindo a massa óssea (OKAZAKI *et al*, 2006).

Além disso, vários estudos demonstram uma correlação positiva entre densidade mineral óssea e a dose de insulina nos pacientes com diabetes tipo 2, sugerindo que a hiperinsulinemia pode prevenir a diminuição da densidade mineral óssea (DENNISON *et al*, 2004; LIEFDE *et al*, 2005; THRAILKILL *et al*, 2005). Em pacientes com diagnóstico recente de DM2, foi encontrado aumento da densidade mineral óssea em comparação com os indivíduos normoglicêmicos, indicando uma associação positiva entre resistência insulínica e hiperinsulinemia, sugerindo um efeito anabólico da insulina no metabolismo ósseo (DENNISON *et al*, 2004; LIEFDE *et al*, 2005; THRAILKILL *et al*, 2005). Alguns autores evidenciaram também que a função dos osteoblastos está diminuída, enquanto que a função dos osteoclastos está aumentada nos pacientes com DM2 (SUZUKI *et al*, 2005).

Foram descritos alguns fatores envolvidos na indução da osteoclastogênese, como o receptor para o fator nuclear kappa B (NF-kB) ativado (RANK), seu ligante

RANKL e a osteoprotegerina (OPG) que inibe a ligação entre RANKL e seu receptor (THEOLEYRE *et al*, 2004; WADA *et al*, 2006; BOYCE & XING, 2008; KEARNS *et al*, 2008).

A OPG é uma glicoproteína que pertence à superfamília de receptores dos fatores de necrose tumoral (TNFRSF11B) (MORINGA *et al*, 1998). O gene humano *OPG* está localizado no cromossomo 8 (8q24.1), tem 29 kb de tamanho e contém 5 exons que codificam uma proteína com 401 aminoácidos. É expresso em vários tecidos, incluindo o sistema cardiovascular, pulmão, rins, intestino, osso (osteoblastos), células hematopoiéticas e imunológicas (SCHOPPET *et al*, 2002; WADA *et al*, 2006; KEARNS *et al*, 2008). A sua principal função no metabolismo ósseo é inibir a atividade e a diferenciação dos osteoclastos. Estudos *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que a expressão aumentada de OPG estava relacionada com o aumento da massa óssea em associação com o número diminuído de osteoclastos (KEARNS *et al*, 2008).

O RANKL pertence à família dos ligantes dos fatores de necrose tumoral (TNFSF11) (LACEY *et al*, 1998). O gene *RANKL* está localizado no cromossomo 13 (13q14), tem 58 kb de tamanho e contém 8 exons que codificam para uma proteína com 316 aminoácidos. É expresso em células de linfonodos, timo, pulmão, baço, medula óssea, sangue periférico e osteoblastos (SCHOPPET *et al*, 2002; WADA *et al*, 2005; KEARNS *et al*, 2008). A sua principal função no metabolismo ósseo é a estimulação da diferenciação e da atividade dos osteoclastos e inibição da apoptose dos osteoclastos (KEARNS *et al*, 2008).

O RANK pertencente á família dos receptores dos fatores de necrose tumoral (TNFRSF11A). O gene *RANK* tem 61 kb de tamanho está localizado no cromossomo 18 (18q22.1), contém 12 exons que codificam uma proteína de 616 aminoácidos

(ANDERSON *et al*, 1997). Este gene é expresso nas células dendríticas, endoteliais, fibroblastos, linfócitos T e B e nos osteoclastos (SCHOPPET *et al*, 2002; WADA *et al*, 2005; KEARNS *et al*, 2008).

A taxa de reconstrução óssea e o número de sítios de reconstrução aumentam em várias condições patológicas afetando o metabolismo ósseo, como osteoporose pós-menopausa, hiperparatireoidismo, artrite reumatóide, diabetes melito entre outras, na qual alterações locais e sistêmicas em nível de hormônios ou citocinas pró-inflamatórias estimulam a reabsorção óssea. Muito dos fatores que induzem a reabsorção óssea atuam predominantemente por mecanismos indiretos que envolvem a regulação positiva da expressão de *RANKL* pelos osteoblastos, células T e outras células (BOYCE & XING, 2008).

A ligação entre RANK e RANKL fornece sinais que direcionam o desenvolvimento dos osteoclastos nas células hematopoiéticas progenitoras e ativação dos osteoclastos maduros (THEOLEYRE *et al*, 2004; KEARNS *et al*, 2008). Essa ligação entre RANKL e RANK (**Figura 2**) resulta no recrutamento de uma proteína denominada de TRAF6 (receptor de TNF associado ao fator 6) aos sítios específicos no domínio intracelular de RANK. O TRAF6 atua como um segundo mensageiro ativando várias proteínas kinases assim como fatores de transcrição como fator nuclear- κ B (NF- κ B). O NF- κ B ativado transloca-se para o núcleo ocasionando a regulação positiva de c-fos, o qual interage com o fator nuclear ativado de células T (NFAT)-c1 que induz a transcrição dos genes osteoclastogênicos (KEARNS *et al*, 2008).

Figura 2. Mecanismos de sinalização ativados pela ligação entre RANKL e RANK. Adaptado de: KEARNS *et al*, 2008.

Com a descoberta do sistema OPG/RANKL/RANK (**Figura 3**) foi possível o melhor entendimento da regulação dos osteoblastos e dos osteoclastos na osteoclastogênese, favorecendo a compreensão de mecanismos fundamentais na fisiologia óssea, identificando um novo grupo de fatores candidatos que podem estar envolvidos na patogênese de várias doenças ósseas (KEARNS *et al*, 2008).

Figura 3. Mecanismos de ação do OPG, RANK e RANKL. O RANKL é produzido pelos osteoblastos sob controle de fatores de crescimento, hormônios e citocinas. Os osteoblastos produzem OPG, o qual se liga e inativa o RANKL. Na ausência de OPG, o RANKL ativa seu receptor RANK que se encontra nos osteoclastos e precursores de osteoclastos. A interação de RANK-RANKL ocasiona o recrutamento de pré-osteoclastos, fusão em osteoclastos multinucleados e ativação de osteoclastos. Cada uma dessas respostas mediadas por RANK pode ser inibida por OPG. Adaptado de: KEARNS *et al*, 2008.

Vanderborght e colaboradores (2004) constataram em células mononucleares de pacientes com artrite reumatóide a expressão aumentada de *RANKL* e *OPG* quando comparado a indivíduos saudáveis, demonstrando que as células mononucleares estão envolvidas na regulação do metabolismo ósseo.

Bashir e colaboradores (2005) demonstraram relação entre a diminuição da expressão dos genes *OPG*, *RANK* e *RANKL* em sangue periférico em mulheres em

tratamento com estrógeno e a diminuição das concentrações séricas de CTX (*serum c-terminal telopeptide*) e de OPG e o aumento da densidade mineral óssea. Sugerindo que a expressão desses genes está respondendo ao remodelamento ósseo associado ao tratamento.

Poubelle e colaboradores (2007) evidenciaram a expressão de *OPG*, *RANK* e *RANKL* nos neutrófilos do fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide, entretanto nos neutrófilos sanguíneos houve somente a expressão de *RANKL*. Sugerindo que os neutrófilos podem contribuir para a reconstrução óssea nos sítios inflamatórios.

O tratamento do DM2 tem como objetivo principal à obtenção da normoglicemia reduzindo a incidência de complicações incluindo as seguintes estratégias: educação, modificações do estilo de vida, (suspensão do fumo, aumento da atividade física e reorganização dos hábitos alimentares) e, quando necessário, uso de medicamentos. Dentre os medicamentos orais disponíveis estão a metformina, as tiazolidinedionas, sulfoniluréias, acarbose e derivados do ácido benzóico (ZAGURY & TAMBASCIA, 2006b).

As tiazolidinedionas (TZDs) são uma classe de agentes hipoglicemiantes orais, que está sendo amplamente utilizada (SCHWARTZ *et al*, 2006b). Os medicamentos mais usados são rosiglitazona e pioglitazona. As TZDs aumentam a sensibilidade das células à insulina, melhorando o controle glicêmico através da ativação do *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ) (SCHWARTZ *et al*, 2006a). A ativação do PPAR γ pelas TZDs também afeta o metabolismo ósseo através do aumento da adiposidade na medula óssea inibindo a mineralização da matriz extracelular pelos osteoblastos e também suprimindo a expressão de alguns genes que atuam nessas células, por consequência diminuindo a formação óssea

(RZONCA *et al*, 2004; SOROCÉANU *et al*, 2004; SCHWARTZ *et al*, 2006a; GREY, 2008; MEIER *et al*, 2008).

Estudos em camundongos (**Figura 4**) demonstraram que a deficiência de PPAR γ bloqueia seletivamente c-fos na via de sinalização de RANKL, sugerindo que PPAR γ atua na maturação e formação da linhagem dos osteoclastos através desta via de sinalização (WAN *et al*, 2007).

Figura 4. Diagrama esquemático das vias de sinalização de RANKL, mostrando que PPAR γ e seus ligantes promovem a diferenciação dos osteoclastos através da regulação de c-fos. Adaptado de: WAN *et al*, 2007.

Com base nessas informações, o diabetes melito e o uso de hipoglicemiantes orais influenciam de maneira significativa o metabolismo ósseo. Entretanto os dados que demonstram como isso ocorre no DM2 ainda são inconsistentes. Alguns estudos reportaram a redução da densidade mineral óssea em decorrência do tratamento com TZDs em modelos animais (RZONCA *et al*, 2004, SCHWARTZ *et al*, 2006a), contudo, estudos em humanos ainda há poucas informações.

É importante comentar que os estudos que envolvem pacientes com DM2 freqüentemente não avaliam o efeito do tratamento com hipoglicemiantes, o que pode tornar os achados sobre o metabolismo ósseo em DM2 inconsistentes (THRAILKILL *et al*, 2005).

Com o objetivo de contribuir com o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na patogênese da osteoporose induzida pelo DM2 e sobre os efeitos de TZDs sobre o metabolismo ósseo, propomo-nos a avaliar a expressão dos genes *OPG*, *RANK* e *RANKL* em células do sangue periférico e os marcadores ósseos no plasma de pacientes com DM2 em resposta ao tratamento com TZDs.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar a expressão gênica de *RANK*, *RANKL* e *OPG* em leucócitos totais do sangue periférico antes e após o tratamento com TZDs investigando os mecanismos de atuação dessa medicação, na procura de marcadores sensíveis de alteração do metabolismo ósseo em pacientes com diabetes tipo 2.

2.2 Específicos

2.2.1 Comparar a expressão gênica de *RANK*, *RANKL* e *OPG* em leucócitos totais antes e após o tratamento com TZDs em pacientes DM2;

2.2.2 Avaliar a expressão gênica de *RANK*, *RANKL* e *OPG* em leucócitos totais em pacientes controles e comparar com pacientes DM2;

2.2.3 Avaliar os parâmetros bioquímicos antes e após o tratamento com TZDs e comparar com a variação da expressão de *RANK*, *RANKL* e *OPG* em leucócitos totais em pacientes DM2 e controles.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística e Protocolo Terapêutico

Foram selecionados 52 pacientes na seção de Coronárias do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC). Desses indivíduos, 36 são diabéticos e 16 são normoglicêmicos, diagnosticados de acordo com os critérios do Consenso Brasileiro sobre Diabetes do tipo 2 (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2002).

Os pacientes selecionados foram informados sobre o protocolo do estudo que foi previamente aprovado pelos comitês de ética das instituições envolvidas (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia) (Anexo A) e somente participaram os que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B). Os critérios de inclusão foram: indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 30 e 70 anos; duas glicemias em jejum com valores entre 126 mg/dL e 270 mg/dL, ou superiores 200 mg/dL em medida casual (com sintomas clínicos) ou 2h após 75 g de glicose.

Foram excluídos pacientes em uso de bloqueadores β -adrenérgicos, inibidores da enzima conversora de angiotensina, diuréticos tiazídicos, corticosteróides, fibratos e agentes hipoglicemiantes orais tais como: metformina, repaglinida, acarbose; pacientes com glicemia demasiadamente alta, que necessitem de terapia insulínica, logo após o diagnóstico ou durante o tratamento; pacientes que necessitem de terapia combinada com hipoglicemiantes orais e mulheres grávidas.

Os pacientes DM2 selecionados no estudo foram orientados a seguir uma dieta hipocalórica, sem o uso de hipoglicemiante oral, por 30 dias, conforme indicação médica. Após esse período, os pacientes que apresentaram valores de glicemia

dentro dos critérios de inclusão, receberam como medicação pioglitazona 15, 30, 45 e 45 mg /dia/ via oral, titulada de acordo com critério clínico, por 16 semanas. No primeiro mês foi administrado no paciente 15 mg, no segundo mês 30 mg, no terceiro mês 45 mg e no último mês 45 mg novamente. Durante as 16 semanas do tratamento com pioglitazona, a cada 4 semanas foram avaliados a glicemia através do método capilar com do glicosímetro digital (Accu-Check Advantage; Roche Diagnostics) para acompanhamento do tratamento, também foram avaliados pressão arterial, peso e medida da cintura e do quadril.

3.2 Amostras Biológicas

Antes e após o tratamento com pioglitazona, foram coletadas amostras de sangue periférico (40 mL), após jejum de no mínimo 12 horas, utilizando o sistema de coleta a vácuo.

Para a extração de RNA total, dosagem da hemoglobina glicada (Hb1Ac) e hemograma foram utilizados tubos com o anticoagulante EDTA. As amostras colhidas sem anticoagulante foram utilizadas para a obtenção do soro, no qual foram determinados a glicose, insulina, perfil ósseo (fósforo, magnésio, cálcio total, cálcio ionizado, fosfatase alcalina e fosfatase ácida total), renal (uréia e creatinina) lipídico (colesterol total, triglicérides, HDL, LDL e VLDL), TSH e T4L. Os exames de hemograma, TSH e T4L foram utilizados apenas como critérios de inclusão no estudo.

3.3 Determinações dos Parâmetros Bioquímicos

A glicemia foi determinada através de método enzimático colorimétrico (TRINDER, 1969) e a Hb1Ac, por imunoturbidimetria. As concentrações séricas de colesterol total, HDL-C e triacilgliceróis foram determinadas por método enzimático-colorimétrico (SIEDEL *et al*, 1983; SIEDEL *et al*, 1993; SUGIUCHI, *et al*, 1995) e as de VLDL-C e LDL-C foram calculadas segundo a fórmula de Friedwald (FRIEDWALD, 1972). As concentrações séricas de uréia foram determinadas através do método enzimático (TALKE & SCHUBERT, 1965) e as de creatinina foram determinadas pelo método colorimétrico (JAFFE, 1866). As concentrações séricas de fosfatase alcalina (BOWERS & MC COMB, 1966) e de fosfatase ácida total (COLEMAN & STROJE, 1966) foram determinadas pelo método cinético e colorimétrico respectivamente. As concentrações séricas de cálcio total (CONNERTY & BRIGGS, 1966), de fósforo (DAILY & ERTINGSHAUSEN, 1972) e de magnésio foram determinadas pelo método colorimétrico (BOHUON, 1962). As concentrações séricas do cálcio iônico foram determinadas pelo método de eletrodo seletivo (KAPLAN & PESCE, 1988).

As determinações bioquímicas foram realizadas utilizando kits comerciais em um analisador automático (Dimension RXL, Dade Behring, Alemanha). A monitorização da precisão, exatidão e controle de qualidade das determinações séricas foi realizada pela determinação concomitante de soros controle normal e patológico comerciais (Dade Behring, Alemanha).

As concentrações séricas de T4L, foram determinadas pelo método de imunoensaio competitivo (WENZEL, 1981) e as concentrações séricas de TSH (WENZEL, 1981) e insulina (BABSON, 1991) pelo método imunométrico, utilizando

analisador automático Immulite com sistema de detecção por quimioluminescência (DPC Medlab, Los Angeles, EUA).

O hemograma completo foi realizado por métodos de impedânciometria e citometria de fluxo, automatizado (Pentra 80, ABX, Horiba, Japão). Os exames foram realizados no laboratório de análises clínicas do Instituto de Cardiologia Dante Pazzanese.

3.3.1 Cálculo dos Índices Homa-IR e Homa-Beta

O índice Homa-IR, que avalia a resistência insulínica, foi calculado utilizando a fórmula: $\text{Insulina (mU/mL)} \times (\text{glicemia mg/dL} \times 0.05551) / 22,5$. Para o cálculo do índice beta, que avalia a função secretora da célula beta, foi utilizada a fórmula: $20 \times \text{insulinemia (mU/mL)} / (\text{glicemia mg/mL} \times 0.05551) - 3,5$ (MATTHEWS *et al*, 1985).

3.4 Extração e Análise do RNA Total

O RNA total foi obtido a partir de sangue total periférico, colhido com EDTA utilizando o kit de extração *QiAamp RNA Blood Mini®* (Qiagen, Alemanha) imediatamente após a colheita do sangue. Este método que utiliza o sistema de colunas associa as propriedades de ligação seletiva da membrana sílica gel com propriedades de centrifugação. Esse sistema utiliza tampões concentrados, permitindo que RNAs maiores que 200 bases se liguem a membrana. Durante o procedimento de purificação do RNA no sangue, os eritrócitos foram seletivamente lisados e os leucócitos foram recuperados pela centrifugação. Posteriormente os leucócitos foram lisados através de condições altamente desnaturantes, que

imediatamente inativam RNases, permitindo o isolamento do RNA intacto. Após a homogenização do lisado, através de uma breve centrifugação, adicionou-se etanol na coluna para ajustar as condições de ligação. Logo após, a amostra foi aplicada em outra coluna. O RNA ligou-se na membrana sílica durante o passo de centrifugação. Os contaminantes foram eliminados na lavagem e o RNA total foi eluído em 30uL em água livre de RNases (*QIAamp RNA Blood Mini Handbook*). O material obtido foi armazenado no freezer - 80°C até a sua análise.

O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria (260/280 nm) no ultravioleta (UV) (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). O grau de pureza do RNA foi determinado pela relação A_{260nm}/A_{280nm} (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão MOPS [MOPS 20 mM (pH 7,0), acetato de sódio 8 mM e EDTA 1mM (pH 8,0)] contendo formaldeído a 2,2 M (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Como referência foi utilizado um marcador de RNA (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP). A eletroforese foi realizada a 32 V por 40 min utilizando cuba horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA) e fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP). Os fragmentos de separação eletroforéticas foram visualizadas sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/mL) (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem Chemilmager™ 4400 (v5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA).

3.5 Análise da Expressão de mRNA pela RT-PCR em Tempo Real

A medida quantitativa da expressão do mRNA em sangue total periférico foi realizada pela RT-PCR em tempo real utilizando o sistema de amplificação *TaqMan*® RT-PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O sinal de fluorescência emitido pelo fluoróforo da sonda *TaqMan*® foi detectado em tempo real no equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A análise da expressão gênica foi realizada por método de quantificação relativa utilizando o gene *GAPD* como controle endógeno.

Para a amplificação pela PCR em tempo real foram selecionados iniciadores e sondas marcadas com fluoróforo para os genes *RANK*, *RANKL*, *OPG* e *GAPD*. A escolha foi possível com o auxílio do programa *Primer Express*® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com base nas seqüências gênicas disponíveis no banco de dados do NIH (www.ncbi.nlm.nih.gov) e estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Iniciadores e sondas marcadas utilizadas nas PCRs em Tempo Real

Genes	RT-PCR	Inciadores	Fragmento
<i>RANK</i>	Tempo Real	5'CACTGGATCAATGAGGCTTGTG3' 5'GTTTGCCGTGTGTG ACTGACA3' 5'FAM TAAGTGGAGATAAGGAGTCC MGB3'	81 bp
<i>RANKL</i>	Tempo Real	5'CGTTGGATCACAGCACATCAG3' 5'TGCTCCTCTTGGCCAGATCT3' 5'FAM CAGAGAAAGCGATGGTGG MGB3'	74 bp
<i>OPG</i>	Tempo Real	5'TGCAGCGGCACATTGG3' 5'TTACCGGGAAGAAAGTGGGA3' 5'FAM ACCTCCCTTCGAGCAG MGB3'	82 bp
<i>GAPD</i>	Tempo Real	5'GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA3' 5'CTGGAAGATGGTGATGGGATTTC3' 5'VIC TCAGCCTTGAGGGTGC NFQ3'	229 bp

Para os ensaios da RT-PCR em tempo real, o cDNA foi obtido a partir de 200 ng de RNA, na presença de 200 ng de iniciadores aleatórios (random primers) (Invitrogen, MD, EUA), DTT 20 mM (Invitrogen, MD, EUA), 200 dNTP 10 mM (Amersham-Pharmacia Biotech do Brasil, Brasil), 200 U de transcriptase reversa (SuperScript™II RT RNase H⁻) e tampão de RT (Tris-HCl 250 mM pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM) (Invitrogen, MD, EUA). O ensaio de RT foi realizado em termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., Waltham, MA, EUA), com as seguintes etapas: 25°C por 10 min, 42°C por 50 min e 70°C por 15 min. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a realização da PCR.

Na etapa seguinte o cDNA foi amplificado pela PCR em tempo real, utilizando-se iniciadores a 10 uM e sonda de detecção marcadas com FAM a 5 uM para *RANK*, *RANKL* e *OPG*. Para o *GAPD*, utilizou-se a sonda de detecção marcada com VIC a 5 uM e os iniciadores a 10 uM. Os demais reagentes foram fornecidos em solução 2x concentrada denominada *Master Mix* contendo dNTPs com dUTP, *AmpErase®* UNG, enzima *AmpliTaQ Gold®* DNA Polimerase, uma referência passiva e tampão de

reação *Gold PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Foi utilizado volume final de 25 μ L por reação em duplicata.

O programa da PCR em tempo real utilizado foi constituído de: (1) um ciclo 2min a 50°C, (ativação da Uracil N-glicosilase - UNG); (2) um ciclo de 10min a 95°C, (inativação da UNG); (3) 40 ciclos de 15s a 95°C (desnaturação) e 1min a 60°C (hibridização e extensão). Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos das sondas *TaqMan*® foram detectados pelo equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os dados foram analisados utilizando-se o programa *Sequence Detection Software* v1.2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que gera curvas semi-logarítmicas dos sinais de amplificação.

Esse programa fornece o parâmetro ciclo em que o sinal de fluorescência é significativo, denominado *cycle threshold* (Ct) (BUSTIN, 2000; LIVAK & SCHMITTGEN 2001). Para cada amostra, o Ct de cada gene é registrado e comparado com o gene *GAPD* que é utilizado com controle endógeno.

A quantidade de cDNA utilizada nos ensaios foi otimizada a partir de uma curva-padrão, realizada com diferentes concentrações de amostra. A curva-padrão permite avaliar a linearidade da amplificação bem como a eficiência da mesma. Para essa finalidade foram utilizadas diluições seriadas de cDNA de amostras usadas somente para a avaliação da PCR em tempo real. Com as diluições de cDNA e os respectivos valores de Ct construiu-se um gráfico que permitiu verificar a relação entre essas duas variáveis (Ct x log da diluição de cDNA).

A eficiência da reação foi calculada de acordo com a inclinação da curva gerada pela seguinte fórmula: $E = 10^{-1/\alpha} - 1 \times 100$, onde α é a inclinação da curva (PFAFFL, 2001). Segundo Livak & Schmittgen (2001), para a PCR em tempo real ter alta eficiência, a inclinação da curva-padrão deve ser próximo de -3,3.

Na **Tabela 2**, são apresentados os resultados de inclinações (slopes) das curvas e as respectivas eficiências dos ensaios. Para os genes *RANK*, *RANKL*, *OPG* e *GAPD* os valores de eficiência mostraram-se adequados.

Tabela 2. Valores de inclinação da curva e eficiência da RT-PCR em tempo real.

Gene	Inclinação da curva	Eficiência
<i>RANK</i>	-3,6	89 %
<i>RANKL</i>	-3,01	114 %
<i>OPG</i>	- 3,41	96 %
<i>GAPD</i>	- 3,43	96%

Os valores de Ct obtidos nesses ensaios foram utilizados para o cálculo da expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação à do *GAPD* (controle endógeno). Essa relação é denominada Delta Ct (ΔCt) e é calculada pela fórmula:

$$\Delta Ct = (Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{controle endógeno}})$$

Com objetivo de avaliar a variação de expressão após o tratamento com pioglitazona, foi utilizado o parâmetro Delta Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) que é calculado pela fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{basal}} - \Delta Ct_{\text{pioglitazona}})$$

Os dados de $\Delta\Delta Ct$ foram transformados em escala logarítmica ($2^{\Delta\Delta Ct}$) para comparar dados de expressão entre as fases de tratamento farmacológico. A expressão é interpretada pelo seu aumento ou diminuição após o tratamento.

3.6 Análises Estatísticas

Os resultados foram analisados através do software Sigma Stat versão 2.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA). O nível de significância considerado foi $p < 0,05$. Para avaliar as diferenças de frequências das variáveis qualitativas como obesidade e sexo foram realizados os testes de qui-quadrado e teste exato de Fischer.

Para comparar os valores de parâmetros bioquímicos entre os grupos estudados foram utilizados o teste-t de Student e Mann-Whitney Sun Test. A diferença dos parâmetros bioquímicos antes e após o tratamento com pioglitazona no grupo diabético foi verificada com os teste-t de Student para a distribuição normal e Mann-Whitney Sun Test para a distribuição não normal.

Os valores de expressão foram transformados em log para fazer os testes paramétricos. Para comparar os valores de expressão gênica nas diferentes fases de medicação foram utilizados Wilcoxon Signed Rank Test e Mann-Whitney Rank Sun Test. Para comparar os valores de expressão gênica entre os grupos estudados foi utilizado teste-t de Student e Mann-Whitney Rank Sun Test. Para comparar os valores de expressão entre os genes estudados foi utilizado o teste Kruscal-Wallis. Para a análise de correlação entre a variação de expressão dos genes e a variação dos parâmetros bioquímicos antes e após o tratamento foi utilizado teste de coeficiente de correlação de Pearson para valores com distribuição normal e Spearman para valores com distribuição não normal.

4 RESULTADOS

4.1 Características dos Pacientes

As características clínicas e os valores médios dos parâmetros bioquímicos (pré-tratamento) dos indivíduos DM2 (n=36) e NG (n=16) incluídos no estudo estão apresentados na **Tabela 3**. Observou-se maior frequência de homens no grupo DM2 (66,7%), entretanto, no grupo NG houve maior frequência de mulheres (81,3%). Demonstrando que a distribuição entre homens e mulheres entre os grupos é desigual ($p=0,004$). Entre as mulheres observou-se que no grupo DM2, todas estavam no período de pós-menopausa, enquanto que no grupo NG 61,5% estavam no período pós-menopausa ($p=0,039$).

Os indivíduos do grupo DM2 apresentaram aumento nas concentrações séricas basais de glicemia, glicemia 120 min após 75g de sobrecarga de glicose, Hb1Ac e índice HOMA-IR em relação ao grupo NG ($p<0,05$). Não houve diferenças estatisticamente significativas para os valores de insulina e o índice HOMA-beta entre os grupos ($p>0,05$). As concentrações séricas de fósforo, magnésio e HDL-C foram maiores no grupo NG em relação ao grupo DM2 ($p<0,05$). Os demais parâmetros não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$).

Tabela 3. Características biodemográficas e valores de exames bioquímicos basais dos indivíduos diabéticos tipo 2 (DM2) e normoglicêmicos (NG).

Parâmetros	DM2 (36)	NG (16)	p
Sexo Masculino (%)	66,7% (24)	18,7 % (3)	p=0,004 ^a
Sexo Feminino (%)	33,3% (12)	81,3% (13)	
Menopausa (%)	100% (12)	61,5%(8)	p=0,039 ^a
Obesidade (%)*	44,4% (16)	43,7%(7)	p=0,798 ^a
IMC (kg/m ²)	31 ± 5	31 ± 7	p=0,932 ^b
Idade (anos)	60,2 ± 7,9	52,2 ± 10,4	p=0,062 ^b
Hipertensão (%)	19,4% (7)	3,2% (5)	p=0,478 ^d
Glicemia (mg/dL)	121 ± 19,5	98 ± 14,5	p<0,001 ^b
Glicemia, 120 min após 75g de glicose (mg/dL)	185 ± 60	106 ± 30	p<0,001 ^b
Hb1Ac (%)	6,6 ± 1,1	5,7 ± 0,6	p=0,011 ^c
Insulina (uUI/mL)	13,9 ± 10,3	9,9 ± 6,8	p=0,174 ^c
Índice HOMA-IR (%)	4,1 ± 3,0	2,5 ± 1,8	p=0,015 ^c
Índice HOMA-beta (%)	39 ± 33	37 ± 23,5	p=0,945 ^c
Cálcio Ionizado (mmol/L)	1,10 ± 0,08	1,15 ± 0,10	p=0,080 ^b
Cálcio Total (mg/dL)	9,3 ± 0,4	9,2 ± 0,9	p=0,552 ^b
Fosfatase Ácida Total (U/L)	3,6 ± 0,8	3,4 ± 0,9	p=0,497 ^b
Fosfatase Alcalina (U/L)	68 ± 24	61 ± 13	p=0,284 ^b
Fósforo (mg/dL)	3,4 ± 0,6	3,8 ± 0,7	p=0,045 ^b
Magnésio (mg/dL)	2,0 ± 0,2	3,8 ± 0,7	p<0,001 ^c
Perfil lipídico (mg/dL)			
Colesterol total	193 ± 35	199 ± 32	p=0,548 ^b
Triglicérides	143 ± 64	125 ± 46	p=0,399 ^c
HDL-C	36 ± 6,5	50 ± 12,5	p<0,001 ^c
LDL-C	123 ± 36	116 ± 27	p=0,513 ^b
VLDL-C	29 ± 13	24 ± 9,8	p=0,226 ^c

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. DM2: diabéticos tipo 2; NG: normoglicêmicos; IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment* (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por: Qui quadrado ^(a), Teste-t de student ^(b), Mann-Whitney ^(c), teste exato de Fischer ^(d), *Obesidade considerada quando IMC>30 kg/m²

Os resultados dos exames bioquímicos foram analisados em 36 indivíduos que concluíram o tratamento durante as 16 semanas de estudo, os valores dos exames bioquímicos estão apresentados na **Tabela 4**.

Os valores séricos de glicemia de jejum, glicemia de 120 min após 75g de glicose, HbA1c e insulina foram significativamente menores nos indivíduos tratados com pioglitazona ($p < 0,05$) comparados com os normoglicêmicos não tratados. Também se observou uma diminuição significativa nos índices Homa-IR e HOMA-beta após o tratamento ($p < 0,05$).

Houve um aumento significativo nos valores séricos de uréia e HDL-C após o tratamento com pioglitazona ($p < 0,05$). Nos demais parâmetros não houveram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) após o tratamento.

Tabela 4. Valores dos parâmetros bioquímicos dos indivíduos diabéticos tipo 2 (DM2) antes a após o tratamento com pioglitazona.

Parâmetros	Basal (36)	Pioglitazona (36)	p
IMC (kg/m ²)	31 ± 5	30 ± 7	p=0,171 ^b
Glicemia (mg/dL)	121 ± 19,5	109 ± 17	p=0,003 ^a
Glicemia, 120 min após 75g de glicose	185 ± 60	157 ± 49	p=0,009 ^a
Hb1Ac (%)	6,6 ± 1,1	6,1 ± 0,4	p=0,013 ^b
Insulina (uU/L)	13,9 ± 10,3	10,4 ± 7,3	p<0,001 ^b
Índice HOMA-IR (%)	4,1 ± 3,0	2,8 ± 2,0	p<0,001 ^b
Índice HOMA-beta (%)	39 ± 33	32 ± 25	p=0,011 ^b
Cálcio Ionizado (mmol/L)	1,095 ± 0,082	1,120 ± 0,092	p=0,102 ^b
Cálcio Total (mg/dL)	9,3 ± 0,4	9,3 ± 0,4	p=0,819 ^a
Fosfatase Ácida Total (U/L)	3,6 ± 0,8	3,3 ± 0,7	p=0,163 ^a
Fosfatase Alcalina (U/L)	68 ± 24	69 ± 22	p=0,663 ^a
Fósforo (mg/dL)	3,4 ± 0,6	3,4 ± 0,6	p=0,537 ^a
Magnésio (mg/dL)	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2	p=0,245 ^a
Perfil lipídico (mg/dL)			
Colesterol total	193 ± 35	201 ± 36	p=0,136 ^a
Triglicérides	143 ± 64	133 ± 89	p=0,058 ^b
HDL-C	36 ± 6,5	43 ± 9,5	p<0,001 ^a
LDL-C	123 ± 36	132 ± 30	p=0,132 ^a
VLDL-C	29 ± 13	27 ± 18	p=0,274 ^b

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. DM2: diabéticos tipo 2; NG: normoglicêmicos; IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment* (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por: Teste-t de student ^(a) e Wilcoxon Signed Rank Test ^(b).

4.2 Resultados da Expressão Gênica de *RANK*, *RANKL* e *OPG* em Leucócitos Totais do Sangue Periférico (LTSP)

As expressões dos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* em leucócitos totais do sangue periférico (LTSP) foram analisadas em 36 indivíduos do grupo DM2 que concluíram o tratamento de 4 meses e 16 indivíduos para o grupo NG.

Os valores de Ct obtidos nesses ensaios foram utilizados para o cálculo da expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação à do *GAPD* (controle endógeno). Essa relação é denominada Delta Ct (ΔCt). Os dados de ΔCt foram transformados em escala logarítmica ($2^{\Delta Ct}$) para comparar dados de expressão entre as fases de tratamento farmacológico. A expressão é interpretada pelo seu aumento ou diminuição após o tratamento.

Na **Tabela 5** estão apresentados os valores medianos e os intervalos (25 – 75%) de expressão do mRNA dos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* em LTSP no grupo DM2 no basal (pré-tratamento) e NG. Observou-se que a expressão de *OPG* no grupo normoglicêmico está aumentada em comparação ao grupo DM2 ($p < 0,05$).

Tabela 5. Valor de expressão basal de *RANK*, *RANKL* e *OPG*, comparados aos valores do grupo normoglicêmico em leucócitos totais do sangue periférico (LTSP).

Genes	DM2 ($2^{-\Delta Ct}$) (36)	NG ($2^{-\Delta Ct}$) (16)	P
<i>RANK</i>	0,00181(0,000660-0,00379)	0,000788(0,000445-0,00303)	0,250 ^a
<i>RANKL</i>	0,00106(0,000660-0,00471)	0,00117(0,000794-0,00223)	0,411 ^a
<i>OPG</i>	0,00919(0,00235-0,0236)	0,0142(0,00765-0,0606)	0,024 ^a
P	p=0,007^b	p=0,001^b	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt : CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. Valores de expressão apresentados como mediana (25%-75%). Os resultados foram comparados por Mann Whitney (a) e Kruskal-Wallis Test (b).

Na **Tabela 6** são apresentados os valores medianos e os intervalos (25 – 75%) de expressão do mRNA dos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* em LTSP no grupo DM2 no basal (pré-tratamento) e NG. Os dados foram analisados em homens e mulheres separadamente. Observou-se que entre os homens a expressão de *OPG* está maior no grupo NG em relação ao grupo DM2 ($p<0,05$). Entre as mulheres, constatou-se que a expressão de *RANK* está menor no grupo NG em relação ao grupo DM2 ($p<0,05$).

Tabela 6. Valor de expressão basal de *RANK*, *RANKL* e *OPG*, comparados aos valores do grupo normoglicêmico em LTSP, subdivididos em gênero masculino e feminino.

Genes	DM2 ($2^{-\Delta Ct}$)	NG ($2^{-\Delta Ct}$)	
Gênero Masculino	(24)	(3)	P
<i>RANK</i>	0,00103 (0,00522-0,00230)	0,00281 (0,00135-0,00762)	0,232 ^a
<i>RANKL</i>	0,00106 (0,000601-0,00372)	0,00133 (0,000975-0,00198)	0,847 ^a
<i>OPG</i>	0,00599 (0,000889-0,0230)	0,0654 (0,0250-0,373)	0,054 ^a
P	0,037	0,025	
Gênero Feminino	(12)	(13)	P
<i>RANK</i>	0,00379 (0,0015-0,00931)	0,000691 (0,000420-0,00198)	0,008 ^a
<i>RANKL</i>	0,00161 (0,000925-0,0106)	0,00102 (0,000667-0,00235)	0,132 ^a
<i>OPG</i>	0,0135 (0,00240-0,0226)	0,0141 (0,00711-0,0530)	0,487 ^a
p	0,194 ^b	<0,001 ^b	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt : CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. Valores de expressão apresentados como mediana (25%-75%). Os resultados foram comparados por Mann Whitney (a) e Kruskal-Wallis Test (b).

Na **Tabela 7** são apresentados os valores medianos e os intervalos (25 – 75%) de expressão do mRNA dos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* em LTSP do grupo DM2. Observou-se que o tratamento com pioglitazona não modificou a expressão de mRNA dos genes ($p > 0,05$), no entanto constatou-se que a expressão de *OPG* foi maior em relação aos genes *RANK* e *RANKL* tanto na fase de pré-tratamento como pós-tratamento ($p < 0,05$).

Tabela 7. Variação da expressão de mRNA dos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* em LTSP em diabéticos tipo 2 (DM2) tratados com pioglitazona (15, 30, 45, 45 mg/dia/16 semanas).

Genes	Basal ($2^{-\Delta Ct}$)	Pioglitazona ($2^{-\Delta Ct}$)	P
<i>RANK</i>	0,00181(0,000660-0,00379)	0,00146(0,000606-0,00335)	0,456 ^a
<i>RANKL</i>	0,00106(0,000660-0,00471)	0,00123(0,000680-0,00559)	0,399 ^a
<i>OPG</i>	0,00919(0,00235-0,0236)	0,00972(0,00280-0,0250)	0,720 ^a
P	p=0,007 ^b	p=0,001 ^b	

Nota: ΔCt : CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. Valores de expressão apresentados como mediana (25%-75%). Os resultados foram comparados por Wilcoxon Signed Rank Test (a) e Kruskal-Wallis Test (b).

Na **Tabela 8** estão apresentados os valores medianos e os intervalos (25 – 75%) de expressão do mRNA dos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* em LTSP do grupo DM2, separados entre gênero masculino e feminino. Observou-se que o tratamento com pioglitazona não modificou a expressão de mRNA dos genes ($p > 0,05$), tanto nos indivíduos do gênero masculino como nos indivíduos do gênero feminino, no entanto constatou-se que a expressão de *OPG* foi maior em relação aos genes *RANK* e *RANKL* no basal tanto em indivíduos do gênero masculino como do feminino ($p < 0,05$).

Tabela 8. Variação da expressão de mRNA dos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* em LTSP em diabéticos tipo 2 (DM2) tratados com pioglitazona (15, 30, 45, 45 mg/dia/16 semanas) separados por gênero.

Genes	Basal ($2^{-\Delta Ct}$)	Pioglitazona ($2^{-\Delta Ct}$)	
Gênero Masculino	(24)	(24)	P
<i>RANK</i>	0,00103 (0,00522-0,00230)	0,00096 (0,00504-0,00305)	0,898 ^a
<i>RANKL</i>	0,00106 (0,00601-0,00372)	0,00110 (0,000737-0,00357)	0,742 ^a
<i>OPG</i>	0,00599 (0,000889- 0,0230)	0,00485 (0,000379-0,0230)	0,939 ^a
P	0,037 ^b	0,104 ^b	
Gênero Feminino	(12)	(12)	P
<i>RANK</i>	0,00379 (0,00115-0,00931)	0,00277 (0,00116-0,00538)	0,168 ^a
<i>RANKL</i>	0,00161 (0,000925-0,0106)	0,00150 (0,000548-0,00730)	0,067 ^a
<i>OPG</i>	0,0135 (0,00240-0,0226)	0,0159 (0,0067-0,0396)	0,966 ^a
p	0,019 ^b	0,966 ^b	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt : CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. Valores de expressão apresentados como mediana (25%-75%). Os resultados foram comparados por Wilcoxon Signed Rank Test (a) e Kruskal-Wallis Test (b).

A análise de correlação entre os valores de expressão de mRNA dos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* normalizados com o controle endógeno *GAPDH* do grupo DM2, após o tratamento com pioglitazona ($\Delta Ct_{\text{pioglitazona}} (\Delta Ct_{\text{gene}} - \Delta Ct_{\text{GAPDH}}) - \Delta Ct_{\text{basal}} (\Delta Ct_{\text{gene}} - \Delta Ct_{\text{GAPDH}})$) está representada na **Figura 5**.

Houve correlação positiva significativa na expressão de mRNA entre os genes *RANK* e *RANKL* ($rs=0,524$, $p=0,001$) nos indivíduos DM2. Para os genes *RANK* e *OPG* ($rs=0,169$, $p=0,336$); *RANKL* e *OPG* ($rs=0,015$, $p=0,930$) não foram encontradas correlações significativas.

Figura 5. Análise de correlação entre a variação da expressão de mRNA entre os genes *RANK* e *RANKL* ($\Delta Ct_{\text{pioglitazona}} - \Delta Ct_{\text{basal}}$) em LTSP após o tratamento com pioglitazona. A significância da correlação foi calculada por coeficiente de correlação de Spearman (rs).

Verificou-se no grupo DM2, que alguns pacientes apresentaram aumento de expressão gênica de *RANK*, *RANKL* e *OPG* em LTSP, enquanto outros tiveram diminuição após o tratamento com pioglitazona. Em virtude dessa variabilidade na expressão gênica, os dados foram separados em dois grupos, A e D para cada gene, onde A corresponde ao grupo com a expressão aumentada e D com a expressão diminuída após o tratamento.

Nas **Tabelas** a seguir (**9**, **10** e **11**), foram avaliadas as diferenças nos parâmetros bioquímicos, antes e após o tratamento com pioglitazona entre os grupos que aumentaram e diminuíram a expressão para cada gene. Em relação ao gene *RANK* não foi observada nenhuma diferença de expressão basal ou após o tratamento com pioglitazona entre os grupos A e D ($p>0,05$) (**Tabela 9**).

Para o gene *RANKL* (**Tabela 10**), os indivíduos do grupo A apresentaram concentrações basais maiores de insulina, índice Homa-IR e Homa-beta, em relação aos do grupo D ($p<0,05$). Porém, não houve diferenças significativas na variação desses parâmetros após o tratamento com pioglitazona entre o grupo A e D ($p>0,05$). Os indivíduos do grupo D apresentaram concentrações de HDL após o tratamento maiores em relação ao grupo A. Entretanto, não houve diferenças significativas na variação desse parâmetro após o tratamento com pioglitazona entre o grupo A e D ($p>0,05$). Para os indivíduos do grupo A, o IMC foi maior em relação ao grupo D basal e após o tratamento e essa variação foi significativa ($p<0,05$).

Para o gene *OPG* (**Tabela 11**), os indivíduos do grupo D apresentaram concentrações maiores de CT e cálcio ionizado após o tratamento com pioglitazona, em relação ao grupo A, e essa variação foi significativa ($p<0,05$).

Tabela 9. Valores de concentrações médias dos parâmetros bioquímicos antes e após tratamento com pioglitazona em pacientes do grupo DM2, de acordo com a variação da expressão gênica de *RANK*.

Parâmetros		A (18)	D (18)	P
CT (mg/dL)	Basal	198 ± 33	190 ± 36	0,508 ^a
	Pioglitazona	200 ± 37	202 ± 36	0,923 ^a
	Variação (%)	1 ± 11	8 ± 16	0,234 ^a
TG (mg/dL)	Basal	144 ± 58	142 ± 71	0,927 ^a
	Pioglitazona	140 ± 104	127 ± 71	0,950 ^b
	Variação (%)	-5,1 ± 41,6	-4,3 ± 46	0,960 ^a
HDL-C (mg/dL)	Basal	36 ± 7,5	45 ± 8	0,801 ^a
	Pioglitazona	40 ± 10	42 ± 10	0,130 ^a
	Variação (%)	13 ± 29	24 ± 24	0,256 ^a
LDL-C (mg/dL)	Basal	138 ± 56	148 ± 40	0,977 ^a
	Pioglitazona	132 ± 30	132 ± 31	0,788 ^a
	Variação (%)	22 ± 106	-7 ± 26	0,632 ^b
VLDL-C (mg/dL)	Basal	29 ± 12	28 ± 14	0,734 ^a
	Pioglitazona	28 ± 21	25 ± 14	0,937 ^b
	Variação (%)	-7 ± 41	-7 ± 42	0,962 ^a
Glicemia (mg/dL)	Basal	119 ± 21	123 ± 18	0,586 ^a
	Pioglitazona	108 ± 16	110 ± 19	0,857 ^a
	Variação (%)	-7 ± 17	-9 ± 17	0,680 ^a
Glicemia 120 min. (mg/dL)	Basal	188 ± 59	183 ± 64	0,817 ^a
	Pioglitazona	167 ± 57	149 ± 41	0,313 ^a
	Variação (%)	-4,6 ± 34	-10 ± 35	0,672 ^a
Insulina (uUI/mL)	Basal	18 ± 13	14 ± 7	0,436 ^a
	Pioglitazona	11 ± 9	10 ± 7,0	0,931 ^b
	Variação (%)	-34 ± 33	-26 ± 33	0,657 ^a
Hb1Ac (%)	Basal	6,5 ± 1,1	6,7 ± 1,3	0,621 ^b
	Pioglitazona	6,2 ± 0,3	6,0 ± 0,5	0,124 ^a
	Variação (%)	-3,4 ± 13	-8,2 ± 9,8	0,921 ^a
HOMA-IR (%)	Basal	5,3 ± 3,6	4,4 ± 2,5	0,555 ^a
	Pioglitazona	2,8 ± 2,3	2,7 ± 2	0,867 ^a
	Variação (%)	-45,6 ± 30	-32 ± 36	0,371 ^a

Parâmetros		A (18)	D (18)	P
HOMA-BETA (%)	Basal	56 ± 43	35 ± 19	0,217 ^a
	Pioglitazona	34 ± 29	31 ± 22	0,817 ^b
	Variação (%)	-37 ± 27	-14 ± 38	0,282 ^a
IMC (Kg/m ²)	Basal	31 ± 6	31 ± 4	0,791 ^a
	Pioglitazona	30 ± 10	31 ± 4	0,937 ^b
	Variação (%)	-4 ± 24	-0,02 ± 3	0,223 ^b
Cálcio Ionizado (mmo/L)	Basal	1,09 ± 0,08	1,1 ± 0,09	0,748 ^b
	Pioglitazona	1,12 ± 0,08	1,12 ± 0,1	0,623 ^b
	Variação (%)	3,3 ± 11,2	2,5 ± 10	0,656 ^a
Cálcio Total (mg/dL)	Basal	9,2 ± 0,4	9,3 ± 0,4	0,712 ^a
	Pioglitazona	9,2 ± 0,4	9,4 ± 0,4	0,200 ^a
	Variação (%)	0,2 ± 6,4	0,6 ± 6,5	0,523 ^a
Fosfatase Ácida Total (U/L)	Basal	3,6 ± 0,9	3,5 ± 0,8	0,651 ^a
	Pioglitazona	3,4 ± 0,7	3,2 ± 0,8	0,822 ^a
	Variação (%)	4,4 ± 45	-8 ± 25	0,611 ^b
Fosfatase Alcalina (U/L)	Basal	66 ± 19	69 ± 30	0,734 ^a
	Pioglitazona	67 ± 19	70 ± 26	0,933 ^a
	Variação (%)	4 ± 21	8,6 ± 29	0,873 ^a
Fósforo (mg/dL)	Basal	3,4 ± 0,4	3,4 ± 0,7	0,843 ^a
	Pioglitazona	3,4 ± 0,5	3,5 ± 0,7	0,651 ^a
	Variação (%)	0,3 ± 15	4,4 ± 17	0,423 ^a
Magnésio (mg/dL)	Basal	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,1	0,863 ^a
	Pioglitazona	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,2	0,739 ^a
	Variação (%)	4,4 ± 12	2,3 ± 15	0,644 ^a

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Basal: sem tratamento; Pioglitazona: após tratamento com pioglitazona; %: % redução; A: aumento da expressão gênica após o tratamento; D: diminuição da expressão gênica após o tratamento; IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment* (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta-pancreática); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por teste t de Student ^(a) e Mann Whitney ^(b).

Tabela 10. Valores de concentrações médias dos parâmetros bioquímicos antes e após tratamento com pioglitazona em pacientes do grupo DM2, de acordo com a variação da expressão gênica de *RANKL*.

Parâmetros		A (16)	D (20)	P
CT (mg/dL)	Basal	184 ± 36	202 ± 32	0,131 ^a
	Pioglitazona	191 ± 35	206 ± 31	0,181 ^a
	Variação (%)	4 ± 11	3 ± 16	0,807 ^a
TG (mg/dL)	Basal	152 ± 64	135 ± 66	0,441 ^a
	Pioglitazona	152 ± 105	115 ± 72	0,159 ^b
	Variação (%)	3 ± 53	-14 ± 31	0,228 ^a
HDL-C (mg/dL)	Basal	35 ± 6	38 ± 7	0,104 ^a
	Pioglitazona	38 ± 7	46 ± 10	0,005 ^a
	Variação (%)	10 ± 22	24 ± 27	0,119 ^a
LDL-C (mg/dL)	Basal	125 ± 53	154 ± 37	0,071 ^a
	Pioglitazona	123 ± 28	137 ± 28	0,178 ^a
	Variação (%)	29 ± 112	-8,0 ± 23	0,593 ^b
VLDL-C (mg/dL)	Basal	31 ± 13	27 ± 13	0,413 ^a
	Pioglitazona	30 ± 21	23 ± 14	0,154 ^b
	Variação (%)	2 ± 51	-15 ± 30	0,219 ^a
Glicemia (mg/dL)	Basal	122 ± 22	121 ± 18	0,895 ^a
	Pioglitazona	107 ± 22	111 ± 12	0,577 ^a
	Variação (%)	-9,7 ± 21	-7,0 ± 12	0,656 ^a
Glicemia 120 min. (mg/dL)	Basal	173 ± 62	197 ± 62	0,294 ^a
	Pioglitazona	164 ± 60	151 ± 39	0,479 ^a
	Variação (%)	3 ± 39	-16 ± 29	0,152 ^b
Insulina (uUI/mL)	Basal	21 ± 13	12 ± 6	0,033 ^a
	Pioglitazona	11 ± 8	10 ± 7	0,531 ^a
	Variação (%)	-36 ± 34	-24 ± 33	0,389 ^a
Hb1Ac (%)	Basal	7,0 ± 1,0	6,6 ± 1,0	0,843 ^b
	Pioglitazona	6,0 ± 0,4	6,0 ± 0,5	0,173 ^a
	Variação (%)	-5 ± 13	-7,7 ± 9	0,505 ^a
HOMA-IR (%)	Basal	6,1 ± 3,8	3,8 ± 1,9	0,044 ^a
	Pioglitazona	3,0 ± 2,2	2,6 ± 1,9	0,678 ^a
	Variação (%)	-42 ± 36	-32 ± 34	0,443 ^a

Parâmetros		A (16)	D (20)	P
HOMA-BETA (%)	Basal	60 ± 43	32 ± 17	0,030 ^a
	Pioglitazona	38 ± 29	28 ± 23	0,367 ^a
	Variação (%)	-22 ± 58	-19 ± 36	0,341 ^b
IMC (Kg/m ²)	Basal	33 ± 6	29 ± 3	0,021 ^a
	Pioglitazona	32 ± 10	28,9 ± 3	0,042 ^b
	Variação (%)	-4,0 ± 26	-0,4 ± 3	0,023 ^b
Cálcio Ionizado (mmol/L)	Basal	1,11 ± 0,05	1,10 ± 0,09	0,796 ^b
	Pioglitazona	1,12 ± 0,07	1,12 ± 0,11	0,905 ^b
	Variação (%)	0,99 ± 6,5	2,45 ± 11,2	0,671 ^a
Cálcio Total (mg/dL)	Basal	9,2 ± 0,4	9,31 ± 0,41	0,502 ^a
	Pioglitazona	9,3 ± 0,4	9,34 ± 0,42	0,568 ^a
	Variação (%)	0,6 ± 7	0,44 ± 5,8	0,928 ^a
Fosfatase Ácida Total (U/L)	Basal	3,6 ± 0,8	3,6 ± 0,8	0,906 ^a
	Pioglitazona	3,3 ± 0,6	3,2 ± 0,8	0,717 ^a
	Variação (%)	-2,3 ± 33	-8,3 ± 28	0,592 ^b
Fosfatase Alcalina (U/L)	Basal	62 ± 22	74 ± 26	0,170 ^a
	Pioglitazona	63 ± 23	74 ± 21	0,100 ^b
	Variação (%)	4 ± 20	7 ± 30	0,755 ^a
Fósforo (mg/dL)	Basal	3,4 ± 0,5	3,3 ± 0,6	0,893 ^a
	Pioglitazona	3,3 ± 0,6	3,5 ± 0,6	0,336 ^a
	Variação (%)	-2,0 ± 16	6 ± 17	0,162 ^a
Magnésio (mg/dL)	Basal	1,96 ± 0,2	2,01 ± 0,19	0,411 ^a
	Pioglitazona	2,04 ± 0,2	2,03 ± 0,22	0,931 ^a
	Variação (%)	4,8 ± 10,5	2 ± 16	0,555 ^a

Nota: Número de indivíduos em parêntesis; Basal: sem tratamento; Pioglitazona: após tratamento com pioglitazona; %: % redução; A: aumento da expressão gênica após o tratamento; D: diminuição da expressão gênica após o tratamento; IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment* (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta-pancreática); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por teste t de Student ^(a) e Mann Whitney ^(b).

Tabela 11. Valores de concentrações médias dos parâmetros bioquímicos antes e após tratamento com pioglitazona em pacientes do grupo DM2, de acordo com a variação da expressão gênica de *OPG*.

Parâmetros		A (16)	D (20)	P
CT (mg/dL)	Basal	191 ± 38	196 ± 33	0,707 ^a
	Pioglitazona	188 ± 34	213 ± 34	0,040 ^a
	Variação (%)	-1 ± 10	10 ± 15	0,023 ^a
TG (mg/dL)	Basal	131 ± 25	148 ± 73	0,453 ^a
	Pioglitazona	106 ± 56	151 ± 110	0,196 ^b
	Variação (%)	-18 ± 32	5 ± 50	0,118 ^a
HDL-C (mg/dL)	Basal	35 ± 7	38 ± 6	0,303 ^a
	Pioglitazona	41 ± 9	44 ± 10	0,399 ^a
	Variação (%)	19 ± 24	20 ± 31	0,968 ^a
LDL-C (mg/dL)	Basal	133 ± 61	151 ± 38	0,307 ^a
	Pioglitazona	125 ± 34	139 ± 24	0,172 ^a
	Variação (%)	26 ± 117	-4 ± 21	0,871 ^b
VLDL-C (mg/dL)	Basal	27 ± 11	30 ± 15	0,538 ^b
	Pioglitazona	21 ± 11	30 ± 22	0,214 ^b
	Variação (%)	-20 ± 30	4 ± 49	0,089 ^a
Glicemia (mg/dL)	Basal	122 ± 24	120 ± 16	0,803 ^a
	Pioglitazona	108 ± 14	111 ± 20	0,549 ^a
	Variação (%)	-10 ± 16	-6 ± 17	0,569 ^a
Glicemia 120 min. (mg/dL)	Basal	201 ± 63	175 ± 61	0,264 ^a
	Pioglitazona	158 ± 58	160 ± 41	0,899 ^a
	Variação (%)	-17 ± 29	2 ± 39	0,183 ^b
Insulina (uUI/mL)	Basal	15 ± 12	15 ± 9	0,958 ^a
	Pioglitazona	10 ± 7	10 ± 7	0,984 ^a
	Variação (%)	-25 ± 39	-35 ± 26	0,461 ^a
Hb1Ac (%)	Basal	7,0 ± 1,0	6,1 ± 0,7	0,290 ^a
	Pioglitazona	6,0 ± 0,5	6,0 ± 0,4	0,474 ^a
	Variação (%)	-8,0 ± 13	-12 ± 9,0	0,082 ^a
HOMA-IR (%)	Basal	4,5 ± 3,5	4,6 ± 2,6	0,902 ^a
	Pioglitazona	2,5 ± 2	2,6 ± 1,7	0,881 ^a
	Variação (%)	-36 ± 37	-39 ± 29	0,828 ^a

Parâmetros		A (16)	D (20)	P
HOMA-BETA (%)	Basal	41 ± 38	42 ± 29	0,985 ^a
	Pioglitazona	29 ± 23	30 ± 24	0,998 ^a
	Variação (%)	-8 ± 61	-32 ± 28	0,269 ^b
IMC (Kg/m ²)	Basal	30 ± 4	31 ± 5	0,783 ^a
	Pioglitazona	31 ± 5	29 ± 9	0,641 ^b
	Variação (%)	0,7 ± 3	-5 ± 24	0,986 ^b
Cálcio Ionizado (mmol/L)	Basal	1,11 ± 0,08	1,09 ± 0,09	0,819 ^b
	Pioglitazona	1,09 ± 0,08	1,16 ± 0,09	0,023 ^b
	Variação (%)	-1,42 ± 10	6,65 ± 10,51	0,041 ^b
Cálcio Total (mg/dL)	Basal	9,3 ± 0,4	9,3 ± 0,4	0,785 ^a
	Pioglitazona	9,2 ± 0,4	9,4 ± 0,4	0,150 ^b
	Variação (%)	-1 ± 7	1,5 ± 5,5	0,248 ^a
Fosfatase Ácida Total (U/l)	Basal	3,7 ± 0,7	3,4 ± 1,0	0,428 ^a
	Pioglitazona	3,1 ± 0,7	3,5 ± 0,8	0,211 ^a
	Variação (%)	-12,5 ± 24	10 ± 44	0,102 ^a
Fosfatase Alcalina (U/l)	Basal	72 ± 21	62 ± 25	0,237 ^a
	Pioglitazona	71 ± 16	65 ± 26	0,410 ^a
	Variação (%)	4 ± 26	8 ± 26	0,713 ^a
Fósforo (mg/dL)	Basal	3,4 ± 0,6	3,3 ± 0,6	0,488 ^a
	Pioglitazona	3,5 ± 0,6	3,4 ± 0,7	0,637 ^a
	Variação (%)	3,7 ± 20	3 ± 13,5	0,888 ^a
Magnésio (mg/dL)	Basal	2 ± 0,2	2,0 ± 0,1	0,862 ^a
	Pioglitazona	2 ± 0,1	2,1 ± 0,2	0,129 ^b
	Variação (%)	0,6 ± 15	4,4 ± 12	0,418 ^a

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Basal: sem tratamento; Pioglitazona: após tratamento com pioglitazona; %: % redução; A: aumento da expressão gênica após o tratamento; D: diminuição da expressão gênica após o tratamento; IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment* (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta-pancreática); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por teste t de Student ^(a) e Mann Whitney ^(b).

A análise de correlação entre os parâmetros bioquímicos e os valores de expressão de mRNA do gene *RANK*, *RANKL* e *OPG* normalizados com o controle endógeno *GAPDH* dos DM2, antes do tratamento com pioglitazona, estão representados na **Tabela 12**. Observou-se uma correlação positiva entre a expressão gênica basal de *RANK* e a concentração de cálcio ionizado (r_s 0,375; $p=0,024$), essa correlação está representada na **Figuras 6**.

Em relação ao gene *RANKL* observou-se uma correlação positiva entre a expressão gênica basal de *RANKL* e a concentração de cálcio ionizado (r_s 0,0383; $p=0,023$), essa correlação está representada na **Figura 7**.

Não houve correlação entre a expressão gênica basal de *OPG* e os parâmetros bioquímicos antes do tratamento.

Tabela 12. Análise da correlação entre expressão de *RANK*, *RANKL* e *OPG* em LTSP e os parâmetros bioquímicos, antes do tratamento com pioglitazona em indivíduos diabéticos tipo 2 (DM2).

Parâmetros	<i>RANK</i> n(36)	<i>RANKL</i> n(36)	<i>OPG</i> n(36)
Glicemia (mg/dL)	rs -0,127 p=0,456	rs -0,068 p=0,692	rs 0,108 p=0,543
Glicemia 120 min. (mg/dL)	rs 0,323 p=0,071	rs 0,285 p=0,120	rs -0,099 p=0,600
Hb 1Ac (%)	rs -0,134 p=0,441	rs -0,150 p=0,393	rs 0,011 p=0,950
Insulina (uUI/mL)	rs -0,302 p=0,091	rs -0,299 p=0,101	rs 0,180 p=0,306
IMC (Kg/m ²)	rs -0,006 p=0,970	rs -0,043 p=0,804	rs 0,209 p=0,232
Homa –IR (%)	rs -0,293 p=0,082	rs -0,168 p=0,399	rs 0,214 p=0,222
Homa –Beta (%)	rs -0,335 p=0,060	rs -0,280 p=0,115	rs 0,238 p=0,174
Colesterol Total (mg/dL)	rs -0,052 p=0,760	rs 0,045 p=0,794	rs 0,057 p=0,743
LDL-C (mg/dL)	rs 0,058 p=0,733	rs 0,093 p=0,591	rs 0,119 p=0,503
HDL-C (mg/dL)	rs 0,172 p=0,314	rs 0,230 p=0,183	rs -0,039 p=0,825
VLDL-C (mg/dL)	rs -0,285 p=0,091	rs -0,204 p=0,238	rs 0,289 p=0,097
Triglicérides (mg/dL)	rs 0,288 p=0,088	rs -0,207 p=0,231	rs 0,309 p=0,074
Cálcio Ionizado (mmol/L)	rs 0,375 p=0,024	rs 0,383 p=0,023	rs 0,180 p=0,306
Cálcio Total (mg/dL)	rs 0,015 p=0,929	rs -0,046 p=0,790	rs 0,023 p=0,892

Parâmetros	<i>RANK</i> n(36)	<i>RANKL</i> n(36)	<i>OPG</i> n(36)
Fósforo (mg/dL)	rs -0,089 p=0,601	rs -0,293 p=0,087	rs -0,070 p=0,691
Magnésio (mg/dL)	rs 0,115 p=0,502	rs 0,211 p=0,221	rs 0,183 p=0,297
Fosfatase Alcalina (U/L)	rs 0,274 p=0,105	rs 0,208 p=0,228	rs 0,041 p=0,814
Fosfatase Ácida Total (U/L)	rs -0,026 p=0,876	rs 0,181 p=0,294	rs 0,118 p=0,503

Nota: Números de indivíduos em parênteses. IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment* (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta-pancreática); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade. A significância da correlação foi calculada por coeficiente de correlação de Pearson (rp) e Spearman (rs).

Figura 6. Análise da correlação entre expressão de *RANK* em LTSP e cálcio ionizado antes do tratamento com pioglitazona em indivíduos diabéticos tipo 2 (DM2).

Figura 7. Análise da correlação entre expressão de *RANKL* em LTSP e cálcio ionizado, antes do tratamento com pioglitazona em indivíduos diabéticos tipo 2 (DM2).

A análise de correlação entre os parâmetros bioquímicos e os valores de expressão de mRNA do gene *RANK*, *RANKL* e *OPG* normalizados com o controle endógeno *GAPDH* dos DM2, antes e após o tratamento com pioglitazona, estão representados na **Tabela 13**. Após o tratamento, detectou-se uma correlação positiva entre a variação da expressão gênica de *RANK* e a variação da concentração de Hb1Ac (rs 0,414; p=0,018), essa correlação está representada na **Figuras 8**.

Não houve correlação entre a variação da expressão gênica de *RANKL* e a variação dos parâmetros bioquímicos após o tratamento.

Em relação ao gene *OPG* observou-se uma correlação negativa entre a variação da expressão gênica de *OPG* e a variação da concentração de Hb1Ac (rs - 0,372; p=0,043), cálcio ionizado (rs-0,365; p=0,047) e cálcio total (rs-0,368; p=0,032) essa correlação está representada na **Figura 9**.

Tabela 13. Análise da correlação entre expressão de *RANK*, *RANKL* e *OPG* em LTSP e da variação dos parâmetros bioquímicos, antes e após tratamento com pioglitazona em indivíduos diabéticos tipo 2 (DM2).

Parâmetros	<i>RANK</i> n(36)	<i>RANKL</i> n(36)	<i>OPG</i> n(36)
Glicemia (mg/dL)	rs 0,114 p=0,503	rp -0,053 p=0,759	rs -0,233 p=0,184
Glicemia 120 min. (mg/dL)	rs -0,068 p=0,712	rs -0,125 p=0,500	rs -0,136 p=0,479
Hb 1Ac (%)	rs 0,414 p=0,018	rp 0,255 p=0,166	rs -0,372 p=0,043
Insulina (uUI/mL)	rs 0,368 p=0,053	rp 0,178 p=0,366	rs 0,141 p=0,490
IMC (Kg/m ²)	rs 0,306 p=0,069	rs 0,257 p=0,136	rs-0,008 p=0,963
Homa –IR (%)	rs 0,355 p=0,063	rs 0,255 p=0,190	rs 0,058 p=0,774
Homa – Beta (%)	rs 0,291 p=0,131	rs 0,245 p=0,206	rs 0,186 p=0,360
Colesterol Total (mg/dL)	rs -0,086 p=0,618	rp 0,035 p=0,843	rs -0,323 p=0,066
LDL-C (mg/dL)	rs 0,072 p=0,677	rs-0,019 p=0,913	rs 0,014 p=0,934
HDL-C (mg/dL)	rs -0,292 p=0,083	rp -0,041 p=0,812	rs 0,022 p=0,900
VLDL-C (mg/dL)	rs 0,102 p=0,398	rp 0,136 p=0,437	rs -0,297 p=0,087
Triglicérides (mg/dL)	rs 0,150 p=0,379	rp 0,136 p=0,435	rs -0,272 p=0,119
Cálcio Ionizado (mmol/L)	rs 0,085 p=0,638	rp -0,235 p=0,203	rs -0,365 p=0,047
Cálcio Total (mg/dL)	rs 0,123 p=0,474	rp 0,156 p=0,370	rs-0,368 p=0,032

Parâmetros	<i>RANK</i> n(36)	<i>RANKL</i> n(36)	<i>OPG</i> n(36)
Fósforo (mg/dL)	rs -0,150 p=0,380	rp -0,057 p=0,742	rs -0,005 p=0,975
Magnésio (mg/dL)	rs 0,188 p=0,269	rp 0,231 p=0,182	rs -0,079 p=0,653
Fosfatase Alcalina (U/L)	rs -0,204 p=0,255	rp -0,204 p=0,255	rs 0,035 p=0,846
Fosfatase Ácida Total (U/L)	rs 0,328 p=0,066	rs 0,095 p=0,605	rs -0,296 p=0,110

Nota: Números de indivíduos em parênteses. IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment* (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta-pancreática); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade. A significância da correlação foi calculada por coeficiente de correlação de Pearson (rp) e Spearman (rs).

Figura 8. Análise da correlação da variação entre expressão de *RANK* em LTSP e da variação de Hb1Ac, antes e após tratamento com pioglitazona em indivíduos diabéticos tipo 2 (DM2).

Figura 9. Análise da correlação da variação entre expressão de *OPG* em LTSP e da variação de Hb1Ac (A), cálcio ionizado (B) e cálcio total (C), antes e após tratamento com pioglitazona em indivíduos diabéticos tipo 2 (DM2).

5 DISCUSSÃO

A obesidade e ganho de peso estão entre os principais fatores de risco para DM2, estimando-se que cada quilograma de aumento de peso associe-se à elevação relativa de 9% na prevalência de DM2. Mais de 80% dos pacientes DM2 apresentam obesidade ou excesso de peso, o que agrava a sua situação metabólica, predispondo a dislipidemias e hipertensão arterial (ZAGURY & TAMBASCIA, 2006a). Entre os dois grupos não foram encontradas diferenças em relação ao IMC verificando-se que os valores médios acima de 30 kg/m² foram semelhantes nos dois grupos.

Os TZDs, classe de medicamentos empregados no tratamento do DM2, causam aumento da sensibilidade a insulina, melhoram a função das células β , apresentam efeitos favoráveis nas dislipidemias, melhorando a função cardiovascular. Shand *et al* (2007), demonstraram em seus estudos que os pacientes tratados com pioglitazona 45 mg durante 6 meses tiveram valores de glicemia diminuídos e perfil lipídico melhorado com o aumento de HDL. Esses achados foram confirmados no presente estudo, demonstrando que o grupo DM2 em relação ao grupo NG apresentou valores maiores de glicemia de jejum, glicemia de 120 min. após sobrecarga de glicose e Hb1Ac, e após o tratamento com pioglitazona houve uma redução significativa nesses parâmetros.

Também foi observado que a insulina, Índice HOMA-IR e HOMA-beta diminuíram após o tratamento, comprovando a eficiência da pioglitazona em diminuir a resistência à insulina, com melhora na função secretora das células β pancreática (OLIVEIRA *et al*, 2005).

Constataram-se também os efeitos dessa medicação na melhora do perfil lipídico. Os pacientes do grupo NG tiveram valores da HDL maiores em relação ao grupo DM2 sem tratamento, entretanto esses pacientes aumentaram os valores de HDL após o tratamento com pioglitazona (SHAND *et al*, 2007).

A osteoporose é definida como uma desordem caracterizada por um comprometimento ósseo predispondo o risco a fraturas. Vários fatores podem contribuir para o aumento desse risco, por isso algumas medidas devem ser levadas em consideração para poder avaliar o aumento do risco a fratura. Atualmente são empregados na prática clínica, diversos exames para diagnosticar a osteoporose, como a densitometria óssea (DO) e os marcadores bioquímicos. A DO é utilizada para o diagnóstico de osteoporose anterior ao tratamento, mas segundo Lane (2006), esse parâmetro isolado não é adequado para avaliar o risco a fratura e a eficácia terapêutica.

Em nosso estudo constatou-se que não houve variação dos marcadores do perfil ósseo antes e após o tratamento com pioglitazona, e isto provavelmente ocorreu devido à presença de insulina circulante nesses pacientes. Os marcadores bioquímicos de remodelação óssea representam os produtos de formação e reabsorção que são liberados na circulação. Entretanto esses marcadores não são sensíveis e específicos suficientes para diagnosticar a osteoporose nos pacientes com DM2. Numerosos estudos vêm demonstrando que os receptores de insulina são expressos nos osteoblastos e possuem uma ação específica afetando a síntese de colágeno, a produção de fosfatase alcalina e captação de glicose (FULZELE *et al*, 2007).

Experimentos utilizando modelos animais com deficiência de insulina sugerem uma diminuição na mineralização da superfície óssea, diminuição na taxa de deposição mineral, depressão na atividade dos osteoblastos e diminuição no número de osteoclastos ocasionando uma baixa na taxa de reconstrução óssea de maneira geral, entretanto, a terapia insulínica parece reverter às anormalidades histomorfométricas, biomecânicas e bioquímicas melhorando o crescimento ósseo (THRAILKILL *et al*, 2005).

No presente estudo observou-se que não houve alterações nos marcadores ósseos antes e após o tratamento com pioglitazona, sugerindo que a insulina possui um

efeito anabólico no metabolismo ósseo, ou seja, a presença de insulina nos pacientes DM2 possui um efeito protetor ósseo impedindo a aceleração da reabsorção óssea. Estes resultados vêm de encontro com os objetivos do estudo, em buscar novos marcadores mais sensíveis, específicos e menos invasivos para melhorar o diagnóstico e prognóstico da osteoporose nos pacientes com DM2.

Pode-se observar que os pacientes do grupo NG apresentaram valores de magnésio e fósforo maiores que o grupo DM2. Estudos indicam que DM1 e DM2 são as causas mais comuns de deficiência de magnésio com 25 a 39% de indivíduos afetados. Isso ocorre devido ao aumento de excreção de magnésio causado pela diurese osmótica (SWAMINATHAN, 2003; WELLS, 2008), justificando os valores de magnésio diminuídos nesses pacientes. Os valores de fósforo apesar de estarem aumentados no grupo NG, estão dentro dos valores de referência.

Ao analisar os resultados de expressão gênica em leucócitos totais do sangue periférico, observou-se expressão aumentada de *OPG* no grupo NG em relação ao grupo DM2 sem tratamento, além disso, constatou-se que este gene é mais expresso que os outros genes em ambos os grupos (DM2 e NG). Ao separar em gênero masculino e feminino, pode-se observar que entre o gênero masculino o *OPG* continua sendo mais expresso no grupo NG em relação ao grupo DM2 e é mais expresso que os outros genes em ambos os grupos (DM2 e NG). Entre o gênero feminino, o gene *RANK* é mais expresso no grupo DM2 em relação ao grupo NG, também se pode perceber que o gene *OPG* é mais expresso que os outros genes no grupo NG.

A expressão do gene *OPG* foi menor no grupo DM2 em relação ao grupo NG, sugerindo uma interação diminuída entre a ligação de *RANKL* e de *OPG*, favorecendo a osteoclastogênese com diminuição da atividade osteoblástica nesses pacientes. Suzuki

et al (2005), evidenciaram que a função dos osteoblastos estava diminuída enquanto que a função dos osteoclastos estava aumentada em pacientes diabéticos tipo 2.

Ao analisar a expressão gênica nos indivíduos do gênero feminino, pode-se perceber aumento da expressão de *RANK* no grupo DM2 (pós-menopausa) em relação ao grupo NG, sugerindo que a deficiência de estrógeno causa um aumento da atividade osteoclástica através da ligação entre *RANK* e *RANKL*. O estrógeno é o mais importante hormônio regulador da remodelação óssea, a função deste hormônio é manter o osso saudável mantendo a homeostasia do cálcio. O estrógeno impede a perda óssea através de seus efeitos na atividade osteoblástica e osteoclástica. A ativação dos receptores de estrógenos nos osteoblastos estimula a liberação de fatores de crescimento e de *OPG*, limitando atividade de *RANKL*, reduzindo a osteoclastogênese e aumentando a apoptose dos osteoclastos. A deficiência de estrógeno ocasiona um aumento da atividade osteoclástica com aumento de citocinas pró-inflamatórias que aumentam ativação das células T e promovem a liberação de *RANKL* o qual promove a osteoclastogênese (MCCORMICK, 2007).

Sabe-se que o mecanismo de ação das pioglitazonas está relacionado com o aumento da sensibilidade das células à insulina através da ativação do *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ). Alguns estudos demonstram que a ativação do PPAR γ pelos TZDs, talvez possa causar um aumento na adiposidade da medula óssea e diminuição da osteoblastogênese, causando uma redução na formação óssea (SCHWARTZ, 2006a; GREY, 2008; MEIER *et al*, 2008). Um estudo desenvolvido em nosso grupo de pesquisa verificou uma correlação positiva entre o aumento da expressão de PPAR γ 2 e a eficácia do tratamento com pioglitazona (MARQUES *et al*, 2007).

Wan e colaboradores (2007) demonstraram em um estudo em camundongos que a deficiência de PPAR γ bloqueia seletivamente *c-fos* na via de sinalização de RANKL inibindo a osteoclastogênese, esses achados sugerem que o tratamento prolongado com TZDs pode ocasionar osteoporose. Em nossos resultados, observou-se uma correlação positiva na expressão de mRNA entre os genes *RANK* e *RANKL*, demonstrando que a pioglitazona regula simultaneamente a expressão desses genes nos indivíduos DM2, ou seja, quanto maior a expressão de *RANK*, maior é a expressão de *RANKL*.

No nosso estudo, ao avaliar as diferenças nos parâmetros bioquímicos antes e após o tratamento com pioglitazona entre os grupos que aumentaram e diminuíram a expressão dos genes, observou-se que os indivíduos com o aumento da expressão de *RANKL*, também apresentaram concentrações maiores de insulina, índice Homa-IR e Homa-beta em relação ao grupo com redução da expressão de *RANKL* antes do tratamento.

Dados da literatura demonstram que o IGF-1 é um dos mais abundantes fatores de crescimento presentes no osso que estimula a atividade dos osteoblastos ocasionando a formação da matriz óssea. Devido a sua homologia com a pro-insulina humana, esse fator de crescimento é regulado pelo metabolismo da glicose e pelas concentrações de insulina. Estudos em humanos demonstraram que as concentrações séricas de RANKL estavam positivamente correlacionadas com as concentrações séricas de IGF-1, além disso, em culturas celulares, o IGF-1 aumentou a expressão de mRNA de *RANKL* (ZAHO *et al*, 2008). Nossos resultados sugerem que a insulina possui uma ação estimulatória nos osteoblastos através da ação do IGF-1, ocasionando maior expressão de *RANKL*, o qual é secretado por essa célula.

Para o gene *OPG*, os indivíduos que tiveram sua expressão diminuída apresentaram concentrações aumentadas de cálcio ionizado após o tratamento.

Também foi observada uma correlação negativa entre a variação da expressão gênica de *OPG* e a variação da concentração de cálcio ionizado e total após o tratamento. Paralelamente, observou-se uma correlação positiva entre a expressão basal de *RANK* e *RANKL* e a concentração basal de cálcio ionizado. Estudos demonstram que o PTH atua ligando-se aos seus receptores nos osteoblastos, resultando na ativação dos osteoclastos promovendo a reabsorção óssea. A ativação dos osteoclastos dissolve a matriz óssea liberando cálcio ionizado no fluido extracelular alterando a homeostase do cálcio (HUANG *et al*, 2004; LI *et al*, 2006).

No presente estudo, a correlação positiva entre *RANK*, *RANKL* e cálcio ionizado e a correlação negativa entre *OPG*, cálcio ionizado e total sugere um aumento atividade osteoclástica através da ligação entre *RANK* e *RANKL*. Acrescido de inibição de *OPG*, promovendo a reabsorção óssea liberando cálcio ionizado para a circulação sanguínea, como discutido na literatura. Huang e colaboradores (2004) e Poole & Reeve (2005) constataram que o hormônio paratireóideo (PTH) aumenta a expressão de *RANKL* em culturas celulares, com conseqüente osteoclastogênese associado à inibição da expressão de *OPG*.

Constatou-se no presente estudo uma correlação positiva entre a expressão de *RANK* e as concentrações de Hb1Ac e uma correlação negativa entre a expressão de *OPG* e as concentrações de Hb1Ac. Estudos estimaram que pacientes com as concentrações séricas de Hb1Ac maior que 10% possuem a taxa de formação óssea reduzida em comparação com os indivíduos saudáveis, esses pesquisadores demonstraram que altas concentrações de glicose inibem a maturação dos osteoblastos e com a melhora do controle glicêmico possa talvez haver uma melhora na função osteoblástica (BALINT *et al*, 2001). A concentração sérica aumentada de Hb1Ac indica que o paciente não está fazendo o controle da glicemia adequadamente, sugerindo uma

diminuição na taxa de formação óssea, evidenciada no presente estudo pela diminuição da expressão de *OPG* e aumento da expressão de *RANK*.

Este estudo mostrou que a expressão dos genes *OPG*, *RANK* e *RANKL* nos pacientes diabéticos tipo 2 está alterada e que o tratamento com pioglitazona pode acentuar o quadro de reabsorção óssea nesses indivíduos demonstrando que as relações entre diabetes tipo 2 e osteoporose são muito complexas. Ensaio complementares serão necessários para melhor elucidar as interações entre essas patologias, no sentido de descobrir qual é o verdadeiro papel desses genes na osteoporose em pacientes DM2, já que não existem muitos dados na literatura que relacionam a expressão desses genes em diabéticos tipo 2.

6 CONCLUSÕES

A eficiência do tratamento foi demonstrada através da redução da glicemia de jejum, da glicemia após sobrecarga de glicose, insulina, Hb1Ac, índice HOMA-IR, índice HOMA-Beta e aumento de HDL.

Não houve variação dos marcadores do perfil ósseo antes e após o tratamento com pioglitazona, sugerindo uma ação anabólica da insulina no metabolismo ósseo.

A expressão do gene *OPG* estava diminuída no grupo DM2 em relação ao grupo NG, favorecendo a osteoclastogênese com diminuição da atividade osteoblástica nesses pacientes.

Nas mulheres, o aumento da expressão de *RANK* no grupo DM2 (pós-menopausa) em relação ao grupo NG, sugere aumento da atividade osteoclástica através da ligação entre *RANK* e *RANKL*.

Não houve alteração na expressão gênica de *RANK*, *RANKL* e *OPG* após o tratamento com pioglitazona, entretanto, observou-se que esta medicação regula simultaneamente a expressão dos genes *RANK* e *RANKL* nos indivíduos DM2.

A correlação positiva entre *RANK*, *RANKL* e cálcio ionizado e a correlação negativa entre *OPG*, cálcio ionizado e total sugere um aumento atividade osteoclástica através da ligação entre *RANK* e *RANKL* e inibição de *OPG*.

A concentração sérica mais elevada de Hb1Ac sugere uma diminuição na taxa de formação óssea, evidenciada pela diminuição da expressão de *OPG* e aumento da expressão de *RANK*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRIGHT, F.; REIFENSTEIN, E.C. Parathyroid glands and metabolic bone disease: selected studies. **Williams Wilkins**, Baltimore, 1948.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes—2008. **DIABETES CARE**. v. 31, S.1, 2008.

ANAFOROGLU, I.; NAR-DEMIRER, A.; BASCIL-TUTUNCU, N.; ERTORER, M.E. Prevalence of osteoporosis and factors affecting bone mineral density among postmenopausal Turkish women with type 2 diabetes. **Journal of Diabetes and Its Complications** (2008). DOI: 10.1016/j.jdiacomp.2007.06.004.

ANDERSON, D.M.; MARASKOVSKY, E.; BILLINGSLEY, W.L.; DOUGALL, W.C.; TOMETSKO, M.E.; ROUX, E. R.; TEEPE, M.C.; DUBOSE, R.F.; COSMAN, D.; GALIBERT, L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. **Nature**. v. 390, p. 175–179, 1997.

BABSON, AL.; OLSON, D.R.; PALMIERI, T.; ROSS, A.C.; BECKER, D.M.; MULQUEEN, P.J. The IMMULITE assay tube: a new approach to heterogeneous ligand assay. **Clin Chem**. v. 37, n. 9, p.1521-2, 1991.

BALINT, E.; SZABO, P.; MARSHALL, C.F.; SPRAGUE, S.M. Glucose-induced Inhibition of In Vitro Bone Mineralization. **Bone**. v. 28, n. 1, p. 21-28, 2001.

BASHIR, A.; MAK,Y.T.; SANKARALINGAM, S.; CHEUNG, j.; MC GOWAN, N.W.A.; GRIGORIADIS, A.E.; FOGELMAN, I.; HAMPSON, G. Changes in RANKL/OPG/RANK gene expression in peripheral mononuclear cells following treatment with estrogen or raloxifene. **Steroids**. v. 70, n. 13, p. 847-55, 2005.

BOHUON, C. Microdetermination of magnesium in various biological media. **Clin Chim Acta**. v. 7, p.811-7, 1962.

BOWERS, G.N.; MC COMB, R. B. A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase. **Clin Chem**. v. 12, n. 2, p. 70-89, 1966.

BOYCE, B.F; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 473, p.139-146, 2008.

BUSTIN, S.A., Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol.**, v. 25, n.2, p.169-93, 2000.

COLEMAN, C.M.; STROJE, R.C. **Clin Chim Acta**. v. 13, p. 401, 1966.

CONNERTY, H. V.; BRIGGS, A.R. Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. **Am J Clin Pathol**. v. 45, n. 3, p. 290-6, 1966.

DAILY, J.A.; ERTINGSHAUSEN, G. Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the "Centrifichem". **Clin Chem**. v.18, p.263, 1972.

DENNISON, E.M.; SYDDAL, H.E.; SAYER, A.A.; CRAIGHEAD, S.; PHILLIPS, D.I.W.; COOPER, C. Type 2 diabetes mellitus is associated with increased axial bone density in men and women from the Hertfordshire Cohort Study: evidence for an indirect of insulin resistance? **Diabetologia**. v. 47, p. 1963-1968, 2004.

FORTINO, M.; MERSON, E.J.; ALLEN, F.H. Micromethod for rapid separation of lymphocytes from peripheral blood. **Ann Clin Sci**. v. 1, p. 131-3, 1971.

FRIEDWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein – an integrated approach to mechanisms and disorders. **N. Engl. J. Med**. v. 276, n. 32, 1967.

FULZELE, K.; DIGIROLAMO, D. J.; LIU, Z.; XU, J.; MESSINA, J. L.; CLEMENS, T. L. Disruption of the Insulin-like Growth Factor Type 1 Receptor in Osteoblasts Enhances Insulin Signaling and Action. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 282, n. 35, p. 25649-58, 2007.

GREY, A. Skeletal consequences of thiazolidinedione therapy. **Osteoporos Int**. v.19, p. 129-137, 2008.

HOLMBERG, A. H.; NILSSON, P. M.; NILSSON, J-A.; AKESSON K. The Association between Hyperglycemia and Fracture Risk in Middle Age. A Prospective, Population-Based Study of 22,444 Men and 10,902 Women. **J Clin Endocrinol Metab**. v.93, n.3, p. 815-822, 2008.

HOSODA, H.; FUKUIA, M.; NAKAYAMA, I.; ASANO, M.; KADONO, M.; HASEGAWA, G.; YOSHIKAWA, T.; NAKAMURA, N. Bone mass and bone resorption in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. **Metabolism Clinical and Experimental**. v. 57, p. 940-945, 2008.

HUANG J.C.; SAKATA, T.; PFLEGER, L. L.; BENCSIK, M.; HALLORAN, B.P.; BIKLE, D.D.; NISSENSON, R.A. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. **J Bone Miner Res**. v.19, n.2, p. 235-44, 2004.

JAFFE, M.Z. **Physiol Chem**. v. 10, p. 391-400, 1866.

KAPLAN, L.A.; PESCE, A.J. **Técnicas de Laboratório – Fisiopatologia – Métodos de análisis**. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1988.

KEARNS, A.E.; KHOSLA, S.; KOSTENUIK, P.J. Receptor Activator of Nuclear Factor B Ligand and Osteoprotegerin Regulation of Bone Remodeling in Health and Disease. **Endocrine Reviews**. v. 29, n. 2, p.155-192, 2008.

LACEY, D.L.; TIMMS, E.; TAN, H.L.; KELLET, M.J.; DUNSTAN, C.R.; BURGESS, T.; ELLIOTT, R.; COLOMBERO, A.; ELLIOTT, G.; SCULLY, S.; SULLIVAN, J.; HAWKINS, N.; DAVY, E.; CAPPARELLI, C.; ELI, A.; QIAN, Y.X.; KAUFMAN, S.; SAROSI, I.; SHALHOUB, V.; SENALDI, G.; GUO, J.; DELANEY, J.; BOYLE, W.J. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **Cell**. v. 93, n. 2, p. 165-176, 1998.

LANE, N.E., Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 194, s. 3-11, 2006.

LI, Z.; KONG, K.; QI, W. Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 343, p. 345-350, 2006.

LIEFDE, I.I.; VAN DER KLIFT, M.; LAET, C.E.D.H.; VAN DAELE, P.L.A.; HOFMAN, A.; POLS, H.A.P. Bone mineral density and fracture risk in type-2 diabetes mellitus: the Rotterdam Study. **Osteoporos Int**. v. 16, p. 1713-1720, 2005.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

MALECKI, M.T.; KLUPA, T. Type 2 diabetes mellitus: from genes to disease. **Pharmalogical Reports**. v. 57, suppl., p. 20-32, 2005.

MARQUES, M.F.S.F.; HIMELFARB, S.; SILVA, V, F.; DEL MONACO, M.I.; SAMPAIO, M.F.; BERTOLAMI, M.; ARMAGANIJAN, D.; HIRATA, R.D.C.; HIRATA, M.H. Estudo da expressão gênica do pparggamma2, SUR1 e KIR6.2 em indivíduos diabéticos melito tipo 2 (DMT2) Tratados com pioglitazona. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43, s. 1, p. 65, 2007.

MATTHEWS, D.; HOSKER, J.P.; RUDENSKI, A.S.; NAYLOR, B.A.; TRECHER, D.F.; TURNER, R.C.; Homeostasis model assessment: Insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. **Diabetologia**. v. 28, p.412-9, 1985.

MCCORMICK, R.K. Osteoporosis: integrating biomarkers and other diagnostic correlates into the management of bone fragility. **Altern Med Rev**. v.12, n.2, p.113-45, 2007.

MEIER, C.; KRAENZLIN, M.E.; BODMER, M.; JICK, S.S.; JICK, H.; MEIER, C.R. Use of Thiazolidinediones and Fracture Risk. **Arch Intern Med**. v. 168, n.8, p. 820-825, 2008.

MORINGA, T.; NAKAGAWA, N.; YASUDA, H.; TSUDA, E.; HIGASHIO, K. Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor. **Eur J Biochem**. v. 254, p. 685-691, 1998.

OKAZAKI, R.; TOTSUKA, Y.; HAMANO, K.; AJIMA, M.; MIURA, M.; HIROTA, Y.; HATA, K.; FUKUMOTO, S.; MATSUMOTO, T. Metabolic Improvement of Poorly Controlled Noninsulin-dependent Diabetes Mellitus Decreases Bone Turnover. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v. 82, n. 9, p. 2915-2920, 2006.

OLIVEIRA, E. O.; SOUZA, M.L.A.; LIMA, M.D.A. Índice HOMA (*homeostasis model assessment*) na prática clínica: uma revisão. **J Brás Patol Metab Lab.** v. 41, n. 4, p. 237-43, 2005.

PAIVA, D.C.P.; BERSUSA, A.A.S.; ESCUDER, M.M.L. Avaliação da assistência ao paciente com diabetes e/ou hipertensão pelo Programa Saúde da Família do Município de Francisco Morato, São Paulo, Brasil. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro.** v. 22, n.2, p.377-385, 2006.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucl. Acids Res.** v. 29, p. 2002-07, 2001.

POOLE, K.E.; REEVE, J. Parathyroid hormone - a bone anabolic and catabolic agent. **Curr Opin Pharmacol.** v.5, n.6, p. 612-7, 2005.

POUBELLE, P.E.; CHAKRAVARTI, A.; FERNANDES, M.J.; DORION K.; MARCEAU, A-A. Differential expression of, RANK, RANK-L, and osteoprotegerin by synovial fluid neutrophils patients with rheumatoid arthritis and by healthy human blood neutrophils. **Arthritis Research & Therapy.** v. 9, n. 2, p. 1-12, 2007.

RHO, J.; TAKAMI, M.; CHOI, Y. Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems. **Mol. Cells.** v. 17, n. 1, p.1-9, 2004.

RITCHIE, L.P.; GANAPATHY, S.; WOODWARD-LOPEZ, G.; GERSTEIN, D.E.; FLAMING, S.E. Prevention of type 2 diabetes in youth: etiology, promising interventions and recommendations. **Pediatric Diabetes.** v. 4, p. 174-209, 2003.

RZONCA, S.O.; SUDA, L.J.; GADDY, D.; MONTAGUE, D.C.; LECKA-CZERNIK, B. Bone Is a Target for the Antidiabetic Compound Rosiglitazone. **Endocrinology.** v. 145, p. 401-406, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. A single-step method for the simultaneous preparation of DNA, RNA, and protein from cells and tissues. In: **Molecular cloning: a laboratory manual.** 3^a ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001, cap. 7, p. 7.9-7.12b.

SCHOPPET, M.; PREISSNER, K.T.; HOFBAUER, L.C. Rank ligand and Osteoprotegerin paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 22, p. 549-553, 2002.

SCHWARTZ, A.V. Diabetes mellitus: Does it Affect Bone? **Calcif Tissue Int.** v. 73, p. 515-519, 2003.

SCHWARTZ, A.V. Diabetes, TZDs, and Bone: A Review of the Clinical Evidence. **PPAR Research.** p.1-6, 2006a.

SCHWARTZ, A.V.; SELLMEYER, D.E.; VITTINGHOFF, E.; PALERMO, L.; LECKA-CZERNIK, B.; FEINGOLD, R.; STROTMAYER, E.S.; RESNICK, H.E.; CARBONE, L.; BEAMER, B.A.; WON PARK, S.; LANE, N.E.; HARRIS, T.B.; CUMMINGS, S.R. Thiazolidinedione Use and Bone Loss in Older Diabetic Adults. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 91, n. 9, p. 3349-3354, 2006b.

SHAND, B.; SCOTT, R.; CONNOLLY, S.; CLARKE, R.; BAKER, J.; ELDER, P.; FRAMPTON, C.; YEO, J. Comparative study on the efficacy of pioglitazone in Caucasian and Maori- Polynesian patients with poorly controlled type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**. v. 9, p. 540-547, 2007.

SIEDEL, J.; *et al.* **AACC Meeting Abstract 34. Clin Chem**. v. 39, n.1127, 1993.

SIEDEL, J.; HAGELE, E.O.; ZIEGENHORN, J.; *et al.* **Clin Chem**. v.29, n. 1075, 1983.

SOROCÉANU, M.A.; MIAO, D.; BAI, X.; SU, H.; GOLTZMAN, D.; KARAPLIS, A.C. Rosiglitazone impacts negatively on bone by promoting osteoblast/osteocyte apoptosis. **Journal of Endocrinology**. v. 183, p. 203-216, 2004.

STEINER, M.L.; FERNANDES, C.E.; STRUFALDI, R.; AZEVEDO, L.H.; STEPHAN, C.; POMPEI, L.M.; PEIXOTO, S. Accuracy study on "Osteorisk": a new osteoporosis screening clinical tool for women over 50 years old. **Sao Paulo Med. J.** v.126, n.1, p.23-8, 2008.

SUGIUCHI H.; UJI Y.; OKABE, H.; IRIE T. *et al.* Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated α -cyclodextrin. **Clin. Chem**. v. 41, p. 717-23, 1995.

SUZUKI, K.; KUROSE, T.; TAKIZAWA, M.; MARUYAMA, M.; USHIKAWA, K.; KIKUYAMA, M.; SUGIMOTO, C.; SEINO, Y.; NAGAMATSU, S.; ISHIDA, H. Osteoblastic function is accelerated in male patients with type 2 diabetes mellitus: the preventive role of osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin (OCIF/OPG) on the decrease of bone mineral density. **Diabetes Research and Clinical Practice**. v. 68, p. 117-125, 2005.

SWAMINATHAN, R. Magnesium Metabolism and its Disorders. **Clin Biochem Rev**. v. 24, p. 47-66, 2003.

TALKE, H.; SHUBERT, G.E. Enzymatic urea determination in blood and serum in the Warburg optical test. **Klin Wochenschr**. v. 43, n. 1, p. 174-5, 1965.

THEOLEYRE, S.; WITTRANT, Y.; TAT, S.K.; FORTUN, Y.; REDINI, F.; HEYMANN, D. The molecular trait OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiology bone remodeling. **Cytokine & Growth Reviews**. v. 15, p. 457-475, 2004.

THRAIKILL, K.M.; LUMPKIN, C. K.; BUNN, C.R.J.; KEMP, S.F.; FOWLKES, J.L. Is insulin anabolic agent in bone? Dissecting diabetic bone for clues. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 289, p. E735-E745, 2005.

VANDERBORGHT, A.; LINSEN, L.; THEWISSEN, M.; GEUSENS, P.; RAUS, J.; STINISSEN, P. Osteoprotegerin and Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B mRNA Expression in Patients with Rheumatoid Arthritis and Health Controls. **The Journal of Rheumatology**. v. 31, n. 8, p. 1483-90, 2004.

VESTERGAARD, P.; REJNMARK, L.; MOSEKILDE, L. Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk. **Diabetologia**. v. 48, p.1292-1299, 2005.

WADA, T.; NAKASHIMA, T.; HIROSHI, N.; PENNINGER, J.M. Rankl-Rank signaling in osteoclastogenesis and bone diseases. **Trends in Molecular Medicine**. v. 12, n. 1, p.17-25, 2006.

WALSH, M.C.; KIM, Y.K.; RHO, J.; LEE, S.Y.; LORENZO, J.; CHOI, Y. Osteoimmunology: Interplay Between the Immune System and Bone Metabolism. **Annu. Rev. Immunol.** v. 24, p. 33-63, 2006.

WAN, Y.; CHONG, L-W; EVANS, R.M. PPAR-g regulates osteoclastogenesis in mice. v. **NATURE MEDICINE**. v. 13, n.12, p.1496-1503, 2007.

WELLS, I.C. Evidence that the etiology of the syndrome containing type a diabetes mellitus results from abnormal magnesium metabolism. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** v. 86, p. 16-24, 2008.

WENZEL, K. W. Pharmacological interference with in vitro tests of thyroid function. **Metabolim.** v. 30, n.7, p. 717-732, 1981.

World Health Organization. Definition and Diagnosis of classification of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Report of a WHO/IDF consultation, 2006.

ZAGURY, L.; TAMBASCIA, M. I Brazilian Guidelines for Diabetes. **Int Atheroscler.** v. 1, n. 3, p. 177-210, 2006a.

ZAGURY, L.; TAMBASCIA, M. **Tratamento e acompanhamento do Diabetes mellitus. Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes.** Rio de Janeiro: Diagraphic, 2006b.

ZHAO, H.Y.; Liu, J. M.; NING, G.; ZHAO, Y.J.; CHEN J.; SUN, L.H.; ZHANG, L. Z; XU, M.Y.; CHEN, J. L. Relationships between insulin-like growth factor-I (IGF-I) and OPG, RANKL, bone mineral density in healthy Chinese women. **Osteoporos Int.** v. 19, p. 221-226, 2008.

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO CEP FCF e IDPC

Ofício CEP nº 132/2006

São Paulo, 31 de outubro 2006.

Ilmo(a). Sr(a).

Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata FBC

Prezado(a) Senhor(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 30 de outubro de 2006, **APROVOU** o projeto "Avaliação da atividade osteoblástica e osteoclastica em diabéticos tipo 2 em tratamento com glitazonas" (Protocolo CEP nº 382) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 - item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética Pesquisa
FCF/USP

DATA DA ENTRADA: 26 de abril de 2006.

1º DATA DO PARECER: 02 de maio de 2006.

PARECER FINAL: 22 de junho de 2006

Nº DO PROTOCOLO NO CEP: 3436.

(ESTE Nº. DEVERÁ CITAR NAS CORRESPONDÊNCIAS REFERENTES A ESTE PROJETO)

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Prof. Mario Hiroyuki Hirata

PROJETO DE PESQUISA: "Avaliação da Atividade Osteoblastica e Osteoclastica em Diabetes Tipo 2 em Tratamento com Glitazonas".

AREA DE ESPECIALIZACAO: Biologia Molecular

Ao se proceder à análise ao projeto em questão, considera-se que:

- a) Foram atendidas as solicitações do referido parecer.
- b) O projeto preenche os requisitos fundamentais das resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agencia Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.
- c) O Comitê de Ética em Pesquisa avaliou o Protocolo de Estudo e o Termo de Consentimento livre e Esclarecido.
- d) O Comitê de Ética em Pesquisa segue os preceitos das resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agencia Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.

Diante do exposto, O Comitê de Ética em Pesquisa, manifesta-se pela:

Protocolo de Estudo: Aprovado.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Aprovado.

O Comitê de Ética em Pesquisa, solicita que:

- a. Enviar primeiro relatório parcial em 10 /12/ 2006;
- b. Informar imediatamente relatório sobre qualquer evento adverso ocorrido;
- c. Comunicar qualquer alteração no projeto e no TCLE.

São Paulo, 22 de junho 2006.

ANEXO B –**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Projeto de pesquisa: "Avaliação da atividade osteoblástica e osteoclástica em diabéticos tipo 2 em tratamento com pioglitazonas"

Dados de identificação do sujeito da pesquisa:

NOME DO PACIENTE _____
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº _____ SEXO M ☐ F ☐
DATA DE NASCIMENTO ____/____/____
ENDEREÇO _____ Nº _____ APTO _____
BAIRRO _____ CIDADE _____
CEP _____ TELEFONE _____

Prezado Paciente,

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima citado que estou desenvolvendo com a equipe de médicos da Seção de Coronariopatias que estão fazendo seu atendimento no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. Esse estudo é necessário para a avaliação da glitazona, medicamento que reduz o açúcar no sangue (glicemia), no estado de diabetes, em relação a osteoporose.

Para participar desta pesquisa precisarei do seu consentimento e de amostras de sangue, que serão coletadas no Setor de Coleta do Laboratório Clínico do IDPC e pelo seu médico, respectivamente. O risco a sua saúde será mínimo, por causa da coleta de sangue que pode formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha. Além de você outros cento e noventa e nove pacientes também participarão do estudo. Precisarei, ainda, que você responda algumas perguntas sobre doenças existentes nas pessoas de sua família, hábitos alimentares e uso de medicamentos.

Inicialmente, será coletada uma amostra de sangue para a avaliação da glicose e de insulina. Se a sua glicemia (açúcar no sangue) for normal, você será encaminhado para o grupo controle. Se você tiver glicose alta, será encaminhado para o Setor de nutrição do IDPC que lhe indicará uma dieta para baixar a glicose no sangue e manter seu peso, e após um mês seu sangue será coletado e será medida a sua glicemia (açúcar no sangue). Se a glicose continuar alta, o seu médico receitará uma medicação denominada de glitazona (que diminui o açúcar no sangue) de acordo com suas necessidades, e você deverá tomar durante quatro meses. Ao final de cada mês, para acompanhamento do tratamento, será coletada uma amostra de sangue (cerca de 5 mL) para medir a glicose no sangue. Ao final dos quatro meses serão coletadas mais 40 mL de sangue e então, sua participação neste estudo terminará. As amostras serão utilizadas para medir glicose, colesterol e outras frações do colesterol como

HDL, LDL e triglicérides, exames que avaliam a função óssea como cálcio, magnésio, fósforo e outros, e também para realizar testes genéticos.

Você receberá todos os resultados dos exames laboratoriais necessários, bem como o medicamento receitado (pioglitazona) sem qualquer custo. Você não receberá qualquer pagamento por sua participação. Caso seja de seu interesse, também disponibilizarei os resultados dos testes genéticos no final da pesquisa.

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode retirar-se a qualquer momento do estudo, sem penalidades ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia não será afetado.

Os dados e os resultados obtidos durante a investigação serão confidenciais e não serão revelados a terceiros, a menos que sua autorização prévia seja obtida. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados desse estudo forem publicados em revistas, artigos e serem tema de debate e aulas.

Por quaisquer motivos adequados, independentes de seu consentimento, os membros da equipe de pesquisa podem encerrar sua participação no estudo. O motivo lhe será explicado e poderá ser devido a alguma alteração médica que pode colocá-lo em risco de outras complicações se continuar a participar, cancelamento do estudo pela coordenação do estudo, caso o sujeito não cumpra as orientações ou outras questões administrativas.

Caso você tenha alguma dúvida em relação à pesquisa, ou se ocorrer lesão ou doença relacionada com a investigação você pode entrar em contato com a Dra. Maria Isabel Del Monaco (telefones: 5085-4038/4086), Silvia Himelfarb (telefones: 85867677 / 38851198) ou Prof. Mário Hirata (telefone: 30913660) a qualquer hora do dia.

Eu, _____ declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito, voluntariamente, em participar do presente Protocolo da Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de 20 _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será fornecida para você pelo médico do estudo.

ANEXO C –**FICHA PARA COLETA DE DADOS INDIVIDUAIS****DADOS DO PACIENTE**

Nome:.....Paciente nº

Data:...../...../..... Registro:Data de nascimento:...../...../.....

Sexo: M-1 () F-2 () Menopausa: Pré-1 () Pós-2 ()

Cor: Branca () Parda () Negra () Amarela ()

Hábito de fumar: Nunca fumou () Parou de fumar () há qto tempo? Fuma () Nº de cigarros/dia.....

Consume bebida alcoólica? Sim () Não ()

Até 7 doses/sem. () Mais de 7 doses/sem ()

Possui algum tipo de doença? Sim () Não () Qual(is)?

Diabetes Mellitus ()

Já teve infarte? Sim () Não () Há qto tempo?.....

É hipertenso? Sim () Não ()

Medida de Pressão arterial:.....(mmHg)

É obeso? Sim () Não ()

Peso (Kg)..... Altura (cm)..... IMC:.....

Cintura (cm) Quadril (cm) razão

Toma medicamento? Sim () Não ()

Qual(is)? Em que dosagem?.....

.....

Profissão:..... Há exigência de esforço físico? Sim () Não ()

Pratica exercício físico? Sim () Não () Com que frequência?.....

HISTÓRICO FAMILIAR

Possui algum parente com:

Diabetes Mellitus ()

Obesidade ()

Hipertensão ()

Doença cardiovascular () Hipercolesterolemia ()

Quem?.....

Não tem ()

Não sabe ()

EXAMES FÍSICOS

Coleta	Basal	4 sem	8 sem	12 sem	16 sem
Glicemia (mg/dL)					
Peso (kg)					
Cintura/quadril (cm)					
Pressão Arterial (mmHg)					

EXAMES LABORATORIAIS

Parâmetros	Medida Basal	Após Pioglitazona
Data da coleta:	___/___/___	___/___/___
Glicemia em jejum (mg/dL)		
Glicemia pós-prandial (mg/dL)		
Hb1Ac (%)		
Insulinemia em jejum (uUI/mL)		
Colesterol total (mg/dL)		
LDL-c (mg/dL)		
HDL-c (mg/dL)		
VLDL-c (mg/dL)		
Triglicérides (mg/dL)		
Uréia (mg/dL)		
Creatinina (mg/dL)		
Cálcio Ionizado (mmol/L)		
Cálcio (mg/dL)		
Fósforo (mg/dL)		
Magnésio (mg/dL)		
Fosfatase Alcalina (U/L)		
Fosfatase Ácida Total (U/L)		