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

Efeito da Pioglitazona sobre o Remodelamento Ósseo em Diabetes Tipo 2

Silvia Tchernin Himelfarb

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Titular Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo
2013

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

Efeito da Pioglitazona sobre o Remodelamento Ósseo em Diabetes Tipo 2

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Silvia Tchernin Himelfarb

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Titular Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo
2013

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

Silvia Tchernin Himelfarb

Efeito da Pioglitazona sobre o Remodelamento Ósseo em Diabetes Tipo 2

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof.Titular Mario Hiroyuki Hirata
orientador/presidente

Dr. Marcelo Chiara Bertolami
1º. examinador

Profa. Dra. Marisa Passareli
2º. examinador

Profa. Dra. Alice Cristina Rodrigues
3º. examinador

Dra. Maria José Brion Martinez
4º. examinador

São Paulo, 25 de fevereiro de 2013.

“ Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver”.

Dalai Lama

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Luiz e Frida, por terem me ensinado a ser uma pessoa forte e determinada, por sempre estarem presente em minha vida de uma forma ou de outra, por terem me orientado nas minhas escolhas profissionais e por garantirem que nunca faltasse nada para eu conquistar meus objetivos.

À minha segunda mãe Nicia, por sempre me socorrer nos momentos mais difíceis, tentando dinamizar minha vida, por cuidar do meu pai com imensa dedicação.

Ao meu esposo Miler, por toda paciência, 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, por ser lutador e perserverante e por nunca desistir de mim.

Ao meu filho Guilherme, que sem dúvida nenhuma me fez entender qual o real sentido da vida, me fez me sentir a pessoa mais importante do mundo e também me tornou a pessoa mais preocupada do mundo.

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

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata, meu orientador, por sempre estar disponível, pelos ensinamentos fornecidos, pela confiança e dedicação nestes sete anos de convivência.

À profª. Tit. 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 de seu Diretor, Prof. Tit. Jorge Mancini Filho.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu chefe, Profª. Sandra Helena P. Farsky.

À Profa. Profa. Irene S.Soares, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia-Área de Análises Clínicas, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior - CAPES, pela bolsa de doutorado concedida no período de 2008 a 2012.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido para execução do projeto de pesquisa.

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

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte em especial a Profa. Dra. Adriana Augusto Rezende, pela colaboração para realização dos experimentos em animais.

Ao Prof. Dr. Francisco Pignataro Lima do Departamento de Patologia do Centro de Ciências da Saúde da UFRN, pela realização das análises histomorfométricas das tíbias dos camundongos.

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

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

À técnica de Laboratório Cristina Moreno Fajardo (LBMAD - Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico da FCF-USP) pela amizade, paciência, compreensão e auxílio na parte laboratorial deste projeto.

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) e do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.

À minha querida sogra Eliana, que me ajudou a cuidar do meu filho para eu poder escrever a tese.

HIMELFARB, S.T. **Efeito da Pioglitazona sobre o Remodelamento Ósseo em Diabetes Tipo 2**. 2013. 157f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

RESUMO

Alterações morfológicas no tecido ósseo têm sido descritas nos usuários de hipoglicemiantes orais da classe das tiazolidinedionas (TZDs). Hipotetiza-se que alguns genes relacionados com a osteogênese e osteoclastogênese podem ser influenciados pelo tratamento farmacológico, entretanto, o exato mecanismo ainda não está bem esclarecido. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da pioglitazona no remodelamento ósseo através de genes envolvidos na osteoclastogênese em indivíduos recentemente diagnosticados com DM2 e modelos animais, com a finalidade de identificar marcadores genéticos sensíveis de alterações ósseas. Foram convidados para participar do estudo 199 indivíduos (100 diabéticos e 99 normoglicêmicos), no ambulatório de dislipidemias do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. Os indivíduos diabéticos foram tratados com pioglitazona (15, 30, 45, 45 mg/ dia/ via oral) por 16 semanas. Foram colhidas amostras de sangue, antes e após o tratamento para avaliações laboratoriais, extração de DNA genômico e de RNA total. Os polimorfismos e a expressão do mRNA nas células sanguíneas foram determinados pela PCR em tempo real através do sistema *TaqMan*®. Para o estudo em modelo animal após a indução da dieta hiperlipídica por 32 semanas, foram utilizados 12 camundongos machos da linhagem C57BL/J6, os quais foram divididos em três grupos: controle (n=4); diabéticos induzidos pela dieta hiperlipídica (DH, n=4) e diabéticos induzidos pela dieta hiperlipídica e tratados com pioglitazona 35mg/Kg/dia por 16 semanas (DHP, n=4). Para os grupos experimentais foram colhidos: amostras de sangue, para exames laboratoriais; fêmures, para a extração do RNA total; e tíbias, para determinação dos parâmetros histomorfométricos. Os pacientes DM2 apresentaram diminuição nas concentrações séricas de osteocalcina e na expressão de *OPG* e aumento na expressão de *VDR* em comparação ao grupo NG ($p<0,05$). A expressão de *RANKL* e *IL6* foi maior entre as mulheres, enquanto que a expressão de *PPARG* foi maior entre os homens com DM2 em comparação ao grupo NG ($p=0,032$). Pacientes DM2 antes do tratamento apresentaram glicemia e expressão do mRNA de *IL6* negativamente associados ao cálcio ionizado, enquanto que as transcrições de *TNFA* e *VDR* foram associadas positivamente e negativamente com bALP respectivamente ($p<0,05$). O tratamento com pioglitazona reduziu a glicemia de jejum, glicemia pós-prandial, insulina, HOMA-IR, triglicerídeos, VLDL-C, tALP e bALP e aumentou a HDL, tACP, TNF-α e a transcrição de *OPG* ($p<0,05$). A glicemia basal associou-se positivamente com o cálcio ionizado. A expressão basal de *OPG* foi associado negativamente com tALP, enquanto que a expressão basal de *TNFA* foi associada positivamente com tALP e negativamente com tACP. A expressão basal *IL6* foi associada positivamente com tALP, enquanto que a expressão basal de *VDR* foi associada negativamente com osteocalcina e positivamente com bALP em resposta ao tratamento ($p<0,05$). O polimorfismo *RANK* rs1805034 foi associado com redução na transcrição do gene *RANK* nos indivíduos DM2 e com o remodelamento ósseo após o tratamento com pioglitazona ($p<0,05$). O polimorfismo *RANKL* rs9525641 foi associado com aumento da transcrição gênica de *RANKL* nos indivíduos NG e DM2 e melhora da resposta farmacológica nos indivíduos DM2 tratados com pioglitazona ($p<0,05$). O polimorfismo rs3102735 do gene *OPG* foi associado com aumento da formação óssea nos indivíduos DM2 antes e após o tratamento ($p<0,05$). O genótipo CG do polimorfismo *OPG* rs2073618 foi associado com alteração da transcrição de *OPG* no grupo DM2 pré e pós-tratamento ($p<0,05$). O

polimorfismo *PPARG* rs1801282 foi associado com menor risco para o desenvolvimento de diabetes ($p<0,05$). O polimorfismo *PPARG* rs2972162 foi associado com melhora da resistência insulínica nos indivíduos DM2 tratados com pioglitazona ($p=0,017$). O polimorfismo *ESRI* rs9340799 foi associado com redução da formação óssea nos indivíduos DM2 ($p=0,038$). Nos camundongos, após a indução da dieta hiperlipídica por 32 semanas, observou-se aumento do peso, da glicemia, do colesterol total, da expressão do mRNA de *RANK*, *RANKL*, *IL6* e *TNFA* em fêmures e aumento de Tb.Sp e diminuição de BV/TV em comparação ao grupo controle ($p<0,05$). O tratamento com pioglitazona diminuiu a expressão de *TNFA* ($p=0,028$). As medidas histomorfométricas não alteraram-se após o tratamento ($p>0,05$). Os resultados sugerem que o estado hiperglicêmico e o tratamento influenciam os marcadores bioquímicos e moleculares. Os polimorfismos dos genes *RANK*, *RANKL*, *OPG* e *ESRI* parecem estar envolvidos no remodelamento ósseo independentemente da hiperglicemia e do tratamento e os polimorfismos do gene *PPARG* parecem estar envolvidos com menor risco para desenvolver diabetes e com a melhora da resistência insulínica em resposta ao tratamento com pioglitazona.

Palavras-chave: Pioglitazona. Diabetes Tipo 2. Expressão Gênica. Farmacogenética. OPG. RANK. RANKL. PPARG. VDR. ESRI.

HIMELFARB, S.T. **Pioglitazone Effect on Bone Remodeling in Type 2 Diabetes**. 2013. 157p. Thesis (Ph.D Degree) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ABSTRACT

Morphological changes in bone tissue have been reported in users of oral hypoglycemic class of thiazolidinediones (TZDs). It is hypothesized that some genes related to osteogenesis and osteoclastogenesis may be influenced by pharmacological treatment, however, was not aware exact mechanism. The study aims was to evaluate pioglitazone effect on bone remodeling through genes involved in osteoclastogenesis in individuals newly diagnosed with DM2 and animal models, in order to identify sensibles genetics markers of bone alterations. Were invited to participate in study 199 patients (100 diabetics and 99 normoglycemic), in dyslipidemia ambulatory of Institute Dante Pazzanese of Cardiology. Diabetic subjects were treated with pioglitazone (15, 30, 45 or 45 mg /day/oral) for 16 weeks. Blood samples were collected before and after treatment for laboratory evaluations, extraction of genomic DNA and total RNA. Polymorphisms and mRNA expression in blood cells was determined by real time PCR using *TaqMan*® system. For study in animal model after 32 weeks of fat diet induction, was used 12 male mice C57BL/J6, which were divided into three groups: control (n=4); induced diabetic fat diet (DH, n=4) and induced diabetic fat diet and treated with pioglitazone 35mg/Kg/day for 16 weeks (DHP, n=4). For experimental groups were collected: blood samples for laboratory tests; femurs, for extraction of total RNA; and tibias, to determine histomorphometric parameters. DM2 patients showed decrease in serum osteocalcin and *OPG* expression and increased *VDR* expression compared to NG group ($p<0.05$). *RANKL* and *IL6* expression were higher among women, whereas *PPARG* expression was higher among men with DM2 compared to NG group (p=0,032). DM2 patients before treatment showed blood glucose and *IL6* mRNA expression negatively associated with ionized calcium, whereas *TNFA* and *VDR* transcription are positively and negatively associated with bALP respectively ($p<0.05$). Pioglitazone treatment reduced fasting glucose, postprandial glucose, insulin, HOMA-IR, triglycerides, VLDL-C, tALP and bALP and increased HDL, tACP, TNF-α and *OPG* transcription ($p<0.05$). Basal blood glucose was positively associated with ionized calcium. Basal *OPG* expression was negatively associated with tALP, whereas basal *TNFA* expression was positively associated with tALP and negatively with tACP. Basal *IL6* expression was positively associated with tALP, whereas basal *VDR* expression was negatively associated with osteocalcin and positively with bALP in response to treatment ($p<0.05$). *RANK* rs1805034 polymorphism was associated with *RANK* gene transcription reduction in subjects with DM2 and bone remodeling after treatment with pioglitazone ($p<0.05$). *RANKL* rs9525641 polymorphism was associated with increased *RANKL* gene transcription in NG and DM2 subjects and pharmacological response improvement in DM2 subjects treated with pioglitazone ($p<0.05$). *OPG* rs3102735polymorphism was associated with increased bone formation in DM2 subjects before and after treatment ($p<0.05$). CG genotype of *OPG* rs2073618 polymorphism was associated with *OPG* transcription change in DM2 group before and after treatment ($p<0.05$). *PPARG* rs1801282 polymorphism was associated with lower risk for diabetes development ($p<0.05$). *PPARG* rs2972162 polymorphism was associated with insulin resistance improvement in DM2 subjects treated with pioglitazone (p=0,017). *ESRI* rs9340799 polymorphism was associated with reduced bone formation in DM2 subjects (p=0,038). In mice, after 32 weeks of fat diet induction, was observed increase weight, blood

glucose, total cholesterol and *RANK*, *RANKL*, *IL6* and *TNFA* mRNA expression in femurs and Tb.Sp increase and BV/TV decrease compared to control group ($p<0.05$). Treatment with pioglitazone decrease *TNFA* ($p=0,028$). Histomorphometrics measurements not change after treatment ($p>0.05$). Results suggest that hyperglycemic state and treatment influence biochemical and molecular markers. *RANK*, *RANKL*, *OPG* and *ESRI* polymorphisms seens to be involved in bone remodeling regardless of hyperglycemia and treatment and *PPARG* gene polymorphisms seens to be associated with lower risk for diabetes development and with insulin resistance improvement in response to treatment with pioglitazone.

Keywords: Pioglitazone. Type 2 Diabetes. Gene expression. Pharmacogenetics. OPG. RANK. RANKL. PPARG. VDR. ESRI.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de Remodelação Óssea..... 27

Figura 2. Mecanismos de ação do OPG, RANK e RANKL..... 30

Figura 3. Mecanismo de Ação das TZDs..... 36

Figura 4. Fotografias dos géis de agarose 1% em tampão MOPS para integridade do RNA dos fêmures..... 56

Figura 5. Expressão do mRNA de *RANK*, *RANKL*, *OPG*, *PPARG*, *IL6*, *TNFA* e *VDR* em LTSP nos indivíduos NG e DM2..... 67

Figura 6. Expressão do mRNA de *RANK*, *RANKL*, *OPG*, *PPARG*, *IL6*, *TNFA* e *VDR* em LTSP nos indivíduos NG e DM2 no gênero feminino..... 68

Figura 7. Expressão do mRNA de *RANK*, *RANKL*, *OPG*, *PPARG*, *IL6*, *TNFA* e *VDR* em LTSP nos indivíduos NG e DM2 no gênero masculino..... 69

Figura 8. Análise de correlação entre a expressão do mRNA de *RANKL* e de *RANK* basal e após o tratamento com pioglitazona em LTSP..... 71

Figura 9. Parâmetros Bioquímicos e Peso dos animais dos grupos C e DH após o período experimental de 16 semanas de dieta..... 99

Figura 10. Parâmetros Bioquímicos e Peso dos animais dos grupos C, DH e DHP após o período experimental de 32 semanas de dieta..... 100

Figura 11. Expressão do mRNA de *RANK*, *RANKL*,*OPG*, *PPARG*, *IL6*, *TNFA*, *VDR* e *PTH* em Fêmures de camundongos..... 102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação dos Polimorfismos Estudados..... 47

Tabela 2. Iniciadores e sondas marcadas utilizadas nas PCRqs em Tempo Real para Humanos..... 49

Tabela 3. Valores de inclinação da curva e eficiência da RT-PCRq em Tempo Real para Humanos..... 50

Tabela 4. Identificação dos ensaios utilizados nas PCRqs em Tempo Real para Camundongos 57

Tabela 5. Valores de inclinação da curva e eficiência da RT-PCRq em Tempo Real para Camundongos..... 58

Tabela 6. Dados Biodemográficos dos indivíduos NG e DM2..... 62

Tabela 7. Parâmetros Bioquímicos dos indivíduos NG e DM2 pré e pós-tratamento..... 64

Tabela 8. Expressão do mRNA de *RANK*, *RANKL*, *OPG*, *PPARG*, *IL6*, *TNFA* e *VDR* em LTSP nos indivíduos NG e DM2 pré e pós-tratamento..... 66

Tabela 9. Regressão Linear Múltipla: relação entre a expressão basal de mRNA e os marcadores do metabolismo ósseo antes e em resposta ao tratamento com pioglitazona..... 72

Tabela 10. Distribuição dos Genótipos e Frequência dos Alelos para o polimorfismo *RANK* rs1805034 nos indivíduos DM2 e NG..... 74

Tabela 11. Distribuição dos Genótipos e Frequência dos Alelos para o polimorfismo *RANKL* rs9525641 nos indivíduos DM2 e NG..... 74

Tabela 12. Distribuição dos Genótipos e Frequência dos Alelos para o polimorfismo *OPG* rs3102735 nos indivíduos DM2 e NG..... 75

Tabela 13. Distribuição dos Genótipos e Frequência dos alelos para o polimorfismo *OPG* rs2073618 nos indivíduos DM2 e NG..... 75

Tabela 14. Distribuição dos Genótipos e Frequência dos Alelos para o polimorfismo *PPARG* rs1801282 nos indivíduos DM2 e NG..... 76

Tabela 15. Distribuição dos Genótipos e Frequência dos Alelos para o polimorfismo *PPARG* rs2972162 nos indivíduos DM2 e NG..... 76

Tabela 16. Distribuição dos Genótipos e Frequência dos Alelos para o polimorfismo *VDR* rs11568820 nos indivíduos DM2 e NG..... 77

Tabela 17. Distribuição dos Genótipos e Frequência dos Alelos para o polimorfismo *ESRI* rs9340799 nos indivíduos DM2 e NG..... 77

Tabela 18. Efeito do polimorfismo *RANK* rs1805034 sobre a expressão gênica de *RANK* em LTSP nos indivíduos NG e DM2 (Basal) e após o tratamento com pioglitazona..... 79

Tabela 19. Efeito do polimorfismo *RANKL* rs9525641 sobre a expressão gênica de *RANKL* em LTSP nos indivíduos NG e DM2 (Basal) e após o tratamento com pioglitazona..... 79

Tabela 20. Efeito do polimorfismo *OPG* rs3102735 sobre a expressão gênica de *OPG* em LTSP nos indivíduos NG e DM2 (Basal) e após o tratamento com pioglitazona..... 79

Tabela 21. Efeito do polimorfismo *OPG* rs2073618 sobre a expressão gênica de *OPG* em LTSP nos indivíduos NG e DM2 (Basal) e após o tratamento com pioglitazona..... 80

Tabela 22. Efeito do polimorfismo *PPARG* rs1801282 sobre a expressão gênica de *PPARG* em LTSP nos indivíduos NG e DM2 (Basal) e após o tratamento com pioglitazona..... 80
Tabela 23. Efeito do polimorfismo *PPARG* rs2972162 sobre a expressão gênica de *PPARG* em LTSP nos indivíduos NG e DM2 (Basal) e após o tratamento com pioglitazona..... 80
Tabela 24. Efeito do polimorfismo *VDR* rs11568820 sobre a expressão gênica de *VDR* em LTSP nos indivíduos NG e DM2 (Basal) e após o tratamento com pioglitazona..... 81
Tabela 25. Parâmetros Bioquímicos dos indivíduos NG e DM2 antes e após tratamento com pioglitazona de acordo com os genótipos do polimorfismo *RANK* rs1805034..... 83
Tabela 26. Parâmetros Bioquímicos dos indivíduos NG e DM2 antes e após tratamento com pioglitazona de acordo com os genótipos do polimorfismo *RANKL* rs9525641..... 85
Tabela 27. Parâmetros Bioquímicos dos indivíduos NG e DM2 antes e após tratamento com pioglitazona de acordo com os genótipos do polimorfismo *OPG* rs3102735..... 87
Tabela 28. Parâmetros Bioquímicos dos indivíduos NG e DM2 antes e após tratamento com pioglitazona de acordo com os genótipos do polimorfismo *OPG* rs2073618..... 89
Tabela 29. Parâmetros Bioquímicos dos indivíduos NG e DM2 antes e após tratamento com pioglitazona de acordo com os genótipos do polimorfismo *PPARG* rs1801282..... 91
Tabela 30. Parâmetros Bioquímicos dos indivíduos NG e DM2 antes e após tratamento com pioglitazona de acordo com os genótipos do polimorfismo *PPARG* rs2972162..... 93
Tabela 31. Parâmetros Bioquímicos dos indivíduos NG e DM2 antes e após tratamento com pioglitazona de acordo com os genótipos do polimorfismo *VDR* rs11568820..... 95
Tabela 32. Parâmetros Bioquímicos dos indivíduos NG e DM2 antes e após tratamento com pioglitazona de acordo com os genótipos do polimorfismo *ESRI* rs9340799..... 97
Tabela 33. Variáveis Histomorfométricas da Tíbia..... 103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$1,25(OH)_2D$	1,25-dihidroxivitamina D
25(OH)D	25-hidroxivitamina D
7-DHC	7-dihidrocolesterol
ΔCt	Delta Ct
AAi	Fração de Área da Secção de i
ADA	Associação Americana de Diabetes
AGEs	Produtos Avançados de Glicação
AGL	Ácidos Graxos Livres
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVC	Acidente Vascular Cerebral
B	Coeficiente de Regressão
bALP	Fosfatase Alcalina Óssea Específica
BV/TV	Volume Ósseo/ Volume Total - volume ósseo trabecular
C	Grupo Controle (camundongos)
cDNA	Ácido Desoxi-ribonucléico Complementar
CT	Colesterol Total
Ct	Ciclo *Treshold* (Limiar)
DAC	Doença Arterial Coronariana
DH	Dieta Hiperlipídica
DH1	Animais tratados com Dieta Hiperlipídica durante 16 semanas
DH2	Animais tratados com Dieta Hiperlipídica durante 32 semanas
DHP	Animais tratados com Dieta Hiperlipídica por 16 semanas e em seguida submetidos ao tratamento com Pioglitazona 35mg/Kg/dia durante 16 semanas
DM	Diabetes Melito
DM1	Diabetes Melito Tipo 1

DM2	Diabetes Melito Tipo 2
DMO	Densidade Mineral Óssea
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DO	Densitometria Óssea
DP	Desvio Padrão
DPP-4	Dipeptidil peptidase-4
DXA	Absorção de Raios-x de Dupla Energia
E	Eficiência da Reação
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
EP	Erro Padrão
ESRI	Receptor de Estrógeno I
FAM	Fluoróforo 6-carboxifluoresceína
GAPD	Gliceraldeído 3-fosfato Deidrogenase
GLP-1	Peptídeo-1 Simile ao Glucagon
GWA	Associação do Genoma Total
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HDL-C	Colesterol da HDL
HOMA-Beta	Modelo de Avaliação da Homeostase – função secretora da célula beta
HOMA-IR	Modelo de Avaliação da Homeostase – resistência à insulina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
i	Densidade Volumétrica
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de Confiança
IDF	Federação Internacional de Diabetes
IGF-1	Fator de Crescimento-1 Simile à Insulina

IL-6	Interleucina- 6
IMC	Índice de Massa Corpórea
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LDL-C	Colesterol da LDL
LTSP	Leucócitos Totais do Sangue Periférico
MGB	*Minor Groove Binder*
mRNA	RNA Mensageiro
NFQ	*Quencher* Não Fluorescente
NG	Normoglicêmico
NIH	Instituto Nacional de Saúde
OPG	Osteoprotegerina
OR	*Odds Ratio* (Relação de Probabilidade)
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
PPARs	Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissomo
PPARγ	Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissomo gamma
Ppi	Fração de Pontos Testes Incuídos em i
PT	Pontos Testes
PTH	Hormônio da Paratireóide
RAMs	Reações Adversas aos Medicamentos
RANK	Receptor para o Fator Nuclear Kappa B Ativado
RANKL	Ligante do Receptor para o Fator Nuclear Kappa B Ativado
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCRq	Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase Quantitativa
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SNP	Polimorfismo de Um Único Nucleotídeo

T4L	Tetraiodotironina Livre
tACP	Fosfatase Ácida Total
tALP	Fofatase Alcalina Total
TAMRA	Tetrametil-rodamina
Tb.Sp	Distância Trabecular
Tb.N	Número Trabecular
Tb.Th	Espessura Trabecular
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
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TRAP	Fosfatase Ácida Tartarato-resistente
TSH	Hormônio Tireoestimulante
TZDs	Tiazolidinedionas
UNG	Uracil - N - glicosilase
UV	Ultravioleta
VDR	Receptor de Vitamina D
VIC	6-carboxirodamina
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
VLDL-C	Colesterol de VDLC
Vvi	Fração de Volume Ocupada por i
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21
1.1 Diabetes..... 21
1.2 DM2 x Metabolismo Ósseo 23
1.3 Remodelamento Ósseo..... 25
1.4 Tratamento do DM2..... 34
2 OBJETIVOS..... 39
2.1 Geral..... 39
2.2 Específicos..... 39
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 41
3.1 Casuística e Protocolo Terapêutico..... 41
3.2 Amostras Biológicas..... 43
3.3 Determinações dos Parâmetros Bioquímicos..... 43
3.3.1 Cálculo dos Indíces Homa-IR e Homa-Beta..... 45
3.4 Extração e Análise do DNA Genômico..... 45
3.5 Análise dos Polimorfismos Genéticos..... 46
3.6 Extração e Análise do RNA Total em Leucócitos Totais do Sangue Periférico (LTSP)..... 47
3.7 Expressão Gênica pela RT-PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-PCRq).... 48
4 EXPERIMENTOS EM ANIMAIS..... 51
4.1 Aspectos Éticos e Biossegurança..... 51
4.2 Animais..... 51
4.3 Formulações das Dietas..... 53
4.4 Tratamento com Pioglitazona..... 54
4.5 Determinação da Glicose Capliar e do Peso dos Animais..... 54
4.6 Amostras Biológicas..... 54
4.7 Determinações dos Parâmetros Bioquímicos..... 55
4.8 Extração e Análise do RNA Total em Fêmures..... 55
4.9 Expressão Gênica pela RT-PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-PCRq).... 56
4.10 Análises Histomorfométricas..... 58
5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... 60
6 RESULTADOS..... 62
6.1 Dados Biodemográficos..... 62

6.2 Efeito da Pioglitazona sobre as Determinações Bioquímicas..... 63
6.3 Efeito da Pioglitazona sobre a Expressão Gênica em LTSP..... 65
6.4 Associação dos Polimorfismos Genéticos com a Expressão Gênica em LTSP... 73
6.5 Associação dos Polimorfismos Genéticos com as Determinações Bioquímicas. 81
6.6 Experimetos em Animais..... 99
6.6.1 Experimentos ao Final de 16 Semanas..... 99
6.6.2 Experimentos ao Final de 32 Semanas..... 100
6.6.2.1 Efeito da Pioglitazona sobre a Expressão Gênica em Fêmures..... 101
6.6.2.2 Análise da Histomorfometria Óssea..... 103
7 DISCUSSÃO..... 104
CONCLUSÕES..... 118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 120
APÊNDICES..... 131
ANEXOS..... 140

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes

O diabetes melito (DM) é a mais comum das doenças metabólicas. Estima-se que 366 milhões de indivíduos no mundo tenham diabetes. Projeções indicam que o número de indivíduos que serão afetados pela doença em 2030 será de 552 milhões (IDF, 2012). Por isso essa enfermidade vem se tornando um dos maiores problemas de saúde pública do século 21. O crescimento dos casos de diabetes está relacionado com alterações no estilo de vida e no perfil sócio-econômico destes indivíduos (ADA, 2012; WHO, 2012).

Na população brasileira entre 20 e 79 anos, a prevalência do diabetes melito é cerca de 9,72% e em 2030 as cifras podem atingir 12,3% da população (IDF, 2012). Cerca de 50% dessas pessoas ainda não foram diagnosticadas e 25% da população diabética não faz nenhum tipo de tratamento (CAROLINO et al., 2008). Por ser uma doença crônica, com diversas complicações, o diabetes torna-se uma enfermidade muito onerosa não só para os indivíduos afetados, mas também para o sistema de saúde. Os custos diretos com DM variam entre 2,5% e 15% do orçamento anual da saúde, dependendo de sua prevalência e do grau de sofisticação do tratamento disponível. Estimativas do custo direto para o Brasil oscilam em torno de 3,9 bilhões de dólares, em comparação com 0,8 bilhão para a Argentina e 2 bilhões para o México (SBD, 2012-2013).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2012-2013), o diabetes não é uma única doença, mas um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresenta em comum à hiperglicemia, a qual é o resultado de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambos (SBD, 2012-2013). A classificação proposta pela Associação Americana de Diabetes (ADA) incluí quatro classes: diabetes tipo 1 (DM1), que resulta da destruição da célula β, ocasionando absoluta deficiência de insulina; diabetes tipo 2 (DM2),

que resulta de um progressivo defeito na secreção de insulina, causando resistência insulínica; outros tipos específicos de diabetes ocasionados por defeitos genéticos na função da célula β e na ação da insulina (doenças do pâncreas exócrino como fibrose cística); diabetes induzida por medicamentos ou agentes químicos; e diabetes gestacional (ADA, 2012).

O DM2 é a forma mais prevalente, responsável por 90% dos casos desta doença. Caracteriza-se principalmente pela presença de distúrbios na secreção de insulina e incapacidade dos tecidos periféricos em responder à insulina (resistência à insulina). Essa enfermidade resulta da interação entre fatores genéticos, ambientais e comportamentais (OLOKOBA et al., 2012; WHO, 2012).

A patogênese do DM2 ocorre através da ação combinada entre a resistência insulínica periférica e os defeitos na secreção de insulina (STUMVOLL et al., 2008). A diminuição da secreção de insulina e da capacidade das células β em responder às concentrações aumentadas de glicose reduz a sinalização de insulina nos tecidos, diminuindo o influxo de glicose para os adipócitos, células hepáticas e musculares, causando aumento nas concentrações de ácidos graxos livres (AGL) e de glicose na corrente sanguínea agravando a resistência e a secreção de insulina (SURAMPUDI et al., 2009).

As causas de resistência insulínica devem-se a interação entre fatores genéticos, modificações na via de sinalização da insulina e processos inflamatórios. Defeitos na via de sinalização do receptor de insulina afetam a captação de glicose pelas células, ocasionando aumento das concentrações plasmáticas de glicose. O tecido adiposo também desempenha um importante papel para o desenvolvimento do processo inflamatório, liberando substâncias como adiponectina e citocinas pró-inflamatórias, favorecendo a resistência insulínica. O TNF-α e a IL-6 estimulam a lipólise pelos adipócitos, ocasionando o aumento dos ácidos graxos, que, consequentemente, aumentam a resistência insulínica através dos efeitos negativos diretos na via de sinalização da insulina. Além disso, o TNF-α e a IL-6 entram na circulação

sanguínea através do sistema porta e contribuem com a inflamação hepática e resistência insulínica nos tecidos periféricos (STUMVOLL et al., 2008; SURAMPUDI et al., 2009).

A secreção de insulina depende da funcionalidade adequada da célula β, que pode ser afetada por diversos fatores como: a capacidade secretória da célula β; os efeitos das incretinas, que aumentam a secreção de insulina; o excesso de glicose, ácidos graxos e a deposição amiloide nas células β, prejudicando sua função. Desse modo, percebe-se que a interação entre a resistência e a secreção de insulina acarretam anormalidades metabólicas em tecidos-alvo como: diminuição na captação de glicose pelo músculo esquelético, produção excessiva de glicose pelo fígado e comprometimento da supressão de lipólise pelos adipócitos (SURAMPUDI et al., 2009). Em consequência dessas anormalidades, o aumento das concentrações séricas de glicose aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio e o estresse oxidativo, que por sua vez é responsável pelo desenvolvimento das complicações associadas ao DM2, como doença cardiovascular, retinopatia, nefropatia e neuropatia (ADA, 2012; ISMAIL-BEIGI, 2012). Além dessas complicações, o DM2 está associado a diversas comorbidades como problema auditivo, apneia do sono, esteatose hepática, periodontite, alguns tipos de cânceres e risco aumentado de fraturas (ADA, 2012).

1.2 DM2 x Metabolismo Ósseo

A relação entre a densidade mineral óssea (DMO) diminuída e o aumento do risco de fraturas em pacientes diabéticos foi descrito primeiramente por Albright & Reifenstein, em 1948. Posteriormente vários autores descreveram alterações no metabolismo ósseo dos pacientes diabéticos, utilizando diferentes técnicas de avaliações da DMO (LIEFDE et al., 2005; VESTERGAARD, 2007).

Estudos demonstraram que alterações no metabolismo ósseo estão associadas com DM1 resultando em perda óssea, responsável por uma das complicações crônicas destes pacientes (SUZUKI et al., 2005). Entretanto, a possível associação entre a DMO diminuída e o risco de osteoporose em pacientes com DM2 ainda é controversa (LIEFDE, DE et al., 2005; SCHWARTZ, 2006; VESTERGAARD, 2007; LESLIE et al., 2012).

A osteoporose é uma doença global que afeta tanto homens como mulheres em idade mais avançada, ocasionando a deterioração silenciosa da microarquitetura óssea, principalmente nas costelas e no quadril, culminando no risco aumentado de fraturas. O aumento desse risco no DM2, apesar da DMO ser normal em algumas áreas, vem demonstrando associação entre o diabetes e as alterações ósseas (WONGDEE & CHAROENPHANDHU, 2011; LESLIE et al., 2012).

Segundo Schwartz e Sellmeyer (2007), o metabolismo ósseo altera-se quando a glicemia não está controlada. A hiperglicemia gera altas concentrações de AGEs (produto avançado de glicação) no colágeno, podendo causar redução no crescimento ósseo. Além disso, a hiperglicemia leva a diurese osmótica e, consequentemente, a hipercalciúria relativa, ocasionando um balanço negativo de cálcio e hiperparatiroidismo secundário, que pode resultar na reabsorção óssea acelerada, diminuindo a massa óssea (DUARTE et al., 2005).

Por outro lado, vários estudos demonstram uma correlação positiva entre a DMO e a insulina nos pacientes com DM2, sugerindo que a hiperinsulinemia pode prevenir a diminuição da DMO (LIEFDE et al., 2005; THRAILKILL et al., 2005). Um estudo utilizando animais diabéticos evidenciou redução nos marcadores de formação óssea em comparação aos animais não diabéticos, a melhora deste perfil foi demonstrada após a terapia insulínica (THRAILKILL et al., 2005).

Em pacientes com diagnóstico recente de DM2, o aumento da DMO em comparação aos indivíduos normoglicêmicos foi positivamente associado à resistência insulínica e

hiperinsulinemia, sugerindo um efeito anabólico da insulina no metabolismo ósseo (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; GOPALAKRISHNAN et al., 2006).

1.3 Remodelamento Ósseo

Dados do terceiro "*National Health and Nutrition Examination Survey*" (NHANES III, 2003) indicam que 13 a 18% das mulheres com mais de 50 anos, nos Estados Unidos, têm osteoporose e, além disso, 37 a 50% apresentam diminuição da massa óssea no quadril. Esta doença resulta em mais de 350 mil fraturas de quadril por ano e este número tende a dobrar até 2025 (KANIS et al., 2012).

A osteoporose é uma doença caracterizada pela diminuição da massa óssea e aumento da fragilidade, que ocorre através do desequilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea, resultando no aumento do risco de fraturas. 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 envolvendo a síntese da matriz orgânica pelos osteoblastos e reabsorção óssea pelos osteoclastos (THEOLEYRE et al., 2004; RÄKEL et al., 2008).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a osteoporose é definida como DMO $\leq$ -2,5 através do T-score que é medido por meio da técnica de absorção de raios-x de dupla energia (DXA) e a osteopenia é definida com DMO entre -1 e -2,5 (WHO, 2003).

O tecido ósseo é formado por dois tipos: tecido ósseo cortical (mais compacto e externo) e tecido ósseo trabecular (esponjoso e interno). Os tecidos são biologicamente iguais, diferindo apenas na organização de sua microestrutura. A análise da arquitetura trabecular

avalia as propriedades geométricas, espaciais e topológicas do tecido ósseo, permitindo a avaliação do risco de fraturas. A arquitetura é caracterizada através da medição da região volumétrica de interesse da estrutura trabecular óssea. Essas medições denominadas de histomorfometria incluem a distância trabecular (Tb.Sp, mm), a espessura trabecular (Tb.Th, mm) e o volume ósseo trabecular (BV/TV). A fração volumétrica e a massa óssea vertebral diminuem com a deterioração e reabsorção da trabécula (FIELDS & KEAVENY, 2012).

A matriz óssea é composta por matriz orgânica associada a material 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 (LEE & LORENZO, 2006; CONFAVREUX, 2011).

Os osteoblastos são células de origem mesenquimal, 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 contínua localizada na superfície externa do tecido ósseo onde o novo osso é formado. A atividade de formação óssea pelos osteoblastos é lenta e ocorre continuamente em todos os ossos, dessa maneira o novo osso é constantemente formado. Os osteócitos são células que funcionam como sensores, identificando alterações ósseas e transmitindo sinais para os osteoblastos inciarem o processo de formação óssea. A diferenciação e função dos osteoblastos são reguladas por fatores de crescimento e citocinas (BUCK & DUMANIAN, 2012).

Os osteoclastos são derivados das células hematopoiéticas da linhagem monócito/macrófago. 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 *cathepsin* K que digere a matriz proteica óssea. A ativação dos osteoclastos dissolve a matriz óssea, liberando cálcio ionizado no fluido extracelular, alterando a homeostase do cálcio. (**Figura 1**) (CANALIS et al., 2007; KAPINAS & DELANY, 2011).

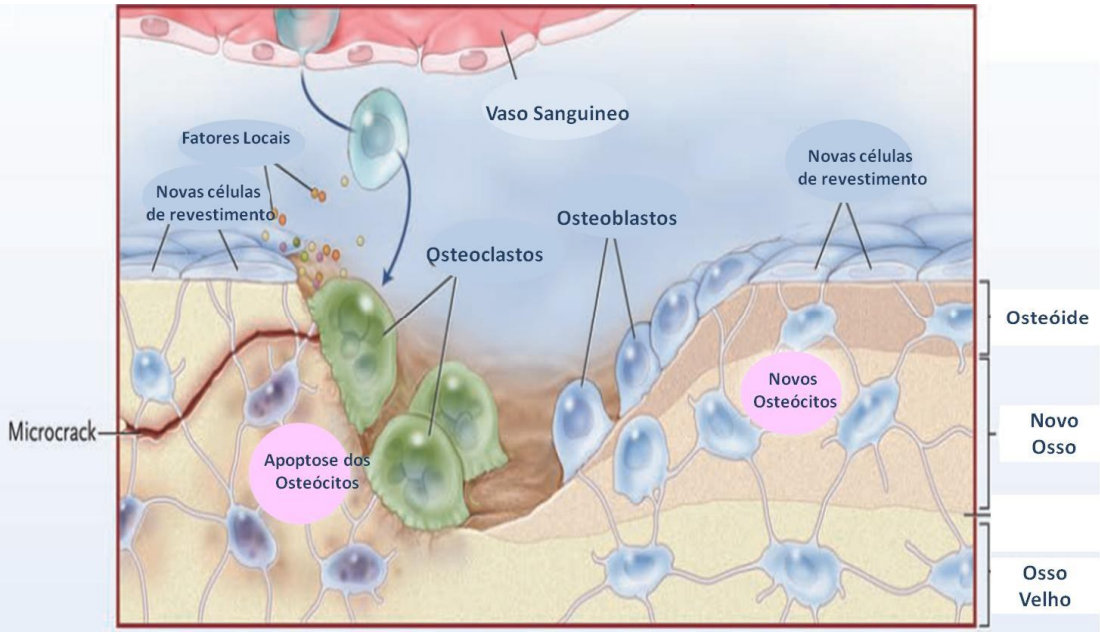


Figura 1. Processo de Remodelação Óssea. O osso é remodelado pelos osteoclastos e osteoblastos em unidades multicelulares básicas. Este processo é necessário para manter a homeostase do cálcio e renovar o osso reparando microfissuras. Adaptado de: CANALIS et al., 2007.

O equilíbrio entre a atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos é fortemente regulado 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; RÄKEL et al., 2008).

Após a conclusão do Projeto Genoma Humano e do Projeto HapMap (*International Hapmap Consortium*, 2003), as pesquisas envolvendo os genes relacionados com a

osteoporose foram direcionadas para os estudos de associação buscando genes candidatos, permitindo que variantes genéticas sejam analisadas simultaneamente, originando os estudos de associação do genoma total (GWA, *Genome Wide Association*) (WANG et al., 2005). Os estudos GWA na área da osteoporose identificaram a associação de vários polimorfismos de base única (SNPs, *single-nucleotide polymorphisms*) com a DMO ou risco de fratura, fornecendo um melhor entendimento desta doença complexa. Espera-se com estes estudos de larga escala que muitos dos genes que contribuem para variação interindividual na osteoporose e para a resposta terapêutica possam ser identificados (NGUYEN et al., 2008).

A partir desses estudos, 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; RÄKEL et al., 2008; SILVA & BRANCO, 2011).

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, células hematopoiéticas e imunológicas. A sua principal função no metabolismo ósseo é inibir a atividade e a diferenciação dos osteoclastos (SCHOPPET, 2002; BAUD'HUIN et al., 2007; SILVA & BRANCO, 2011).

O RANKL pertence à família dos ligantes dos fatores de necrose tumoral (TNFSF11) (CROCKETT et al., 2011). 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 e sangue periférico (KHOSLA, 2001; SCHOPPET, 2002). A sua principal função no metabolismo ósseo é a

estimulação da diferenciação e da atividade dos osteoclastos e inibição da apoptose dos osteoclastos (CLARKE & KHOSLA, 2010).

O RANK pertencente à 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 (KHOSLA, 2001; SCHOPPET, 2002; SILVA & BRANCO, 2011).

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).

Com a descoberta do sistema OPG/RANKL/RANK (**Figura 2**) foi possível o entendimento completo da regulação dos osteoblastos e dos osteoclastos na osteoclastogênese, fornecendo 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 (KHOSLA, 2001; KEARNS et al., 2008).

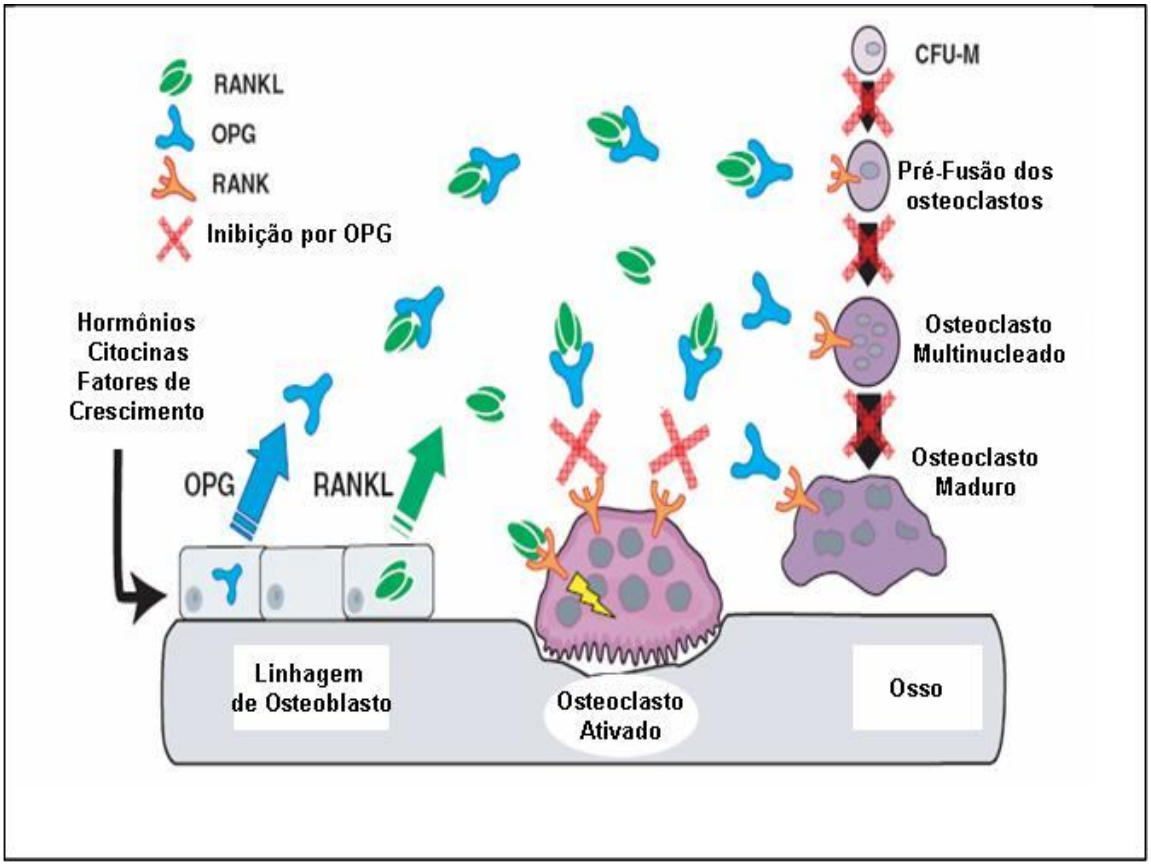


Figura 2. Mecanismos de ação do OPG, RANK e RANKL. O RANKL é produzido pelos osteoblastos sob controle de fatores de crescimento, hormônios e citocinas. Os osteoblastos produzem OPG, o qual se liga e inativa o RANKL. Na ausência de OPG, o RANKL ativa seu receptor RANK que se encontra nos osteoclastos 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.

Algumas doenças associadas ao metabolismo ósseo parecem estar relacionadas com mutações e polimorfismos nos genes do sistema OPG/RANKL/RANK. Lee et al. (2010) em um estudo de meta-análise e Hsu et al. (2006) demonstraram associação entre os polimorfismos rs3102735 na região promotora e rs2073618 no exon 1 (Lis3Asn) do gene *OPG* e a DMO diminuída em homens e mulheres. Arko et al. (2005), Choi et al. (2005) e Kim et al. (2007) também observaram relação entre o polimorfismo rs2073618 e a osteoporose, em mulheres pós-menopausa. Portanto, esses polimorfismos parecem ser indicadores de suscetibilidade genética para osteoporose.

Hsu et al. (2006) demonstraram em seus estudos associações entre o polimorfismo rs1805034 (Val192Ala), no exon 7, do gene *RANK* e aumento na DMO em homens e mulheres. Entretanto, em alguns estudos desenvolvidos por Choi et al. (2005) e Zupan et al. (2010) não foram observados relação entre este polimorfismo e a DMO em mulheres e homens.

Mencej et al. (2006) verificaram que o polimorfismo rs9525641 na região promotora do *RANKL* está associado com DMO reduzida em mulheres pós-menopausa. Takács et al. (2010) também associaram este polimorfismo com redução da DMO e aumento da expressão gênica de *RANKL* em tecido humano ósseo em mulheres pós-menopausa.

Além do sistema OPG/RANKL/RANK, existem uma série de moléculas fundamentais na regulação do processo de reabsorção e formação óssea.

O hormônio da paratireóide (PTH) é um dos mais importantes hormônios calciotrópicos, afetando a concentração plasmática de cálcio e reabsorção óssea. O PTH é secretado pelas glândulas da paratireóide, é um polipeptídio contendo 84 aminoácidos. O gene humano que codifica o *PTH* está localizado no cromossomo 11 (11p15.2) e possui 3 exons (TENNE et al., 2008). A função endócrina clássica do PTH é manter concentrações adequadas de cálcio plasmático, promovendo a reabsorção óssea e inibindo a excreção renal de cálcio. O PTH atua ligando-se aos seus receptores na superfície dos osteoblastos, resultando em alterações funcionais nos osteoblastos e nos osteoclastos (HUANG et al., 2004).

De acordo com Lee & Lorenzo (2002), muito dos efeitos do PTH na formação dos osteoclastos são mediados pela sua ação na produção de RANKL e de OPG. O PTH estimula a expressão do mRNA de *RANKL* e inibe do *OPG* em culturas celulares de medula óssea de camundongos. O efeito do PTH é indireto necessitando da presença dos osteoblatos para exercer sua ação, entretanto o mecanismo molecular envolvido ainda não está totalmente

descrito. Além disso, existem vários estudos utilizando culturas celulares e modelos animais, mas em humanos os dados das ações moleculares do PTH ainda são discretos (DATTA & ABOU-SAMRA, 2009).

A vitamina D ocupa um lugar central no metabolismo ósseo, através de sua ligação com o seu receptor (VDR). O gene que codifica *VDR* está localizado no cromossomo 12 (q12-14) e possui 5 exons (SLATTERY et al., 2007).

Durante a exposição solar, o 7-dihidrocolesterol (7-DHC) é transformado em vitamina D_3. Essa vitamina mais a vitamina D_2 vinda da alimentação são convertidas em 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] pelo fígado. O metabólito inativo 25(OH)D, por sua vez, é convertido pelos rins em 1,25-dihidroxivitamina D [1,25$(OH)_2$D] metabólito ativo, que interage com seu receptor (VDR) no intestino e nos osteoblastos, regulando o metabolismos do cálcio e do fósforo (ST-ARNAUD, 2008; DASTANI et al., 2012). Devido o metabólito ativo 1,25$(OH)_2$D apresentar um tempo de meia vida reduzido na circulação sanguínea (4-6 horas), a forma adequada para determinação da deficiência de vitamina D é através do metabólito inativo 25(OH)D, principal forma circulante, apresentando tempo de meia vida maior (2-3 semanas) (HOLICK, 2009).

Evidências recentes demonstram que a vitamina D está envolvida na regulação do sistema OPG/RANKL/RANK, afetando OPG e RANKL reciprocamente, promovendo a osteoclastogênese através do aumento do estímulo da expressão de *RANKL* e da diminuição do estímulo da expressão de *OPG* (MENCEJ-B et al., 2009). Vários estudos de associação têm sido realizados entre *VDR* e a DMO. Em um estudo de associação multicêntrico de larga escala envolvendo 26.242 participantes, apenas o polimorfismo rs11568820 no gene *VDR* foi associado com o risco de fraturas vertebrais (MENCEJ-B et al., 2009).

O hormônio estrógeno há muito tempo vem sido reconhecido pela sua importante função na regulação da massa óssea e desenvolvimento de osteoporose. O gene humano *ESRI*

(receptor de estrógeno I) está localizado no cromossomo 6 (6q25.1) e possui 8 exons. De acordo com Felson et al. (1993) e Cauley et al. (1995), a reposição hormonal de estrógeno em mulheres pós-menopausa previne a perda óssea e a diminuição do risco de fraturas. Este hormônio atua através da ligação com o seu receptor desencadeando a expressão de vários genes (LI et al., 2010b).

Um estudo envolvendo 5.834 mulheres e o gene *ESRI*, demonstrou que para o polimorfismo rs9340799 no intron I do gene *ESRI*, os indivíduos homozigotos para o alelo comum apresentaram aumento na DMO com consequente diminuição do risco de fraturas em relação aos indivíduos portadores do alelo raro (LI et al., 2010b).

Além do envolvimento de OPG, RANK, RANKL, PTH e VDR no metabolismo ósseo, os osteoclastos e as células imunológicas compartilham uma série de moléculas regulatórias que se influenciam mutuamente (NAKASHIMA & TAKAYANAGI, 2009).

O TNF-α e a IL-6 são citocinas importantes que estimulam a reabsorção óssea, melhorando a atividade osteoclástica (WENNBERG, 2002). Estudos demonstram que a expressão de *RANKL* pode ser regulada por fatores osteoclastogênicos como vitamina D, PTH, TNF-α e IL-6 (THEILL et al., 2002). A expressão aumentada de *RANKL* no líquido sinovial foi observada em pacientes com artrite reumatoide, demonstrando a associação de *RANKL* com a perda óssea em processos inflamatórios (NAKASHIMA & TAKAYANAGI, 2009). De acordo com Lee & Lorenzo (2006), a administração de TNF-α *in vivo* demonstrou aumento nas concentrações séricas de cálcio em camundongos com aumento da reabsorção óssea. A IL-6 parece estar envolvida na regulação da diferenciação das células osteoclásticas progenitoras em osteoclastos maduros, mediando o aumento da reabsorção em doenças ósseas (LEE & LORENZO, 2006).

Além disso, de acordo com o citado anteriormente, o DM é uma doença acompanhada por um processo inflamatório, ocasionando a liberação de citocinas pró-inflamatórias

favorecendo a resistência insulínica. Em modelos experimentais de diabetes em camundongos, foi visto que o aumento da expressão de fatores pro-osteoclastogênicos em condrócitos é mediado pelo menos em parte pela regulação de TNF-α no processo de cicatrização óssea nos diabéticos, mostrando a importância desta citocina na osteoclastogênese (ALBLOWI et al., 2009; ROSZER, 2011).

1.4 Tratamento do DM2

O tratamento do DM2 tem como objetivo principal a obtenção da normoglicemia reduzindo a incidência de complicações, incluindo as seguintes estratégias: modificações do estilo de vida (suspensão do fumo, aumento da atividade física e reorganização dos hábitos alimentares) e, quando necessário, uso de medicamentos (ZAGURY & TAMBASCIA, 2006; ADA, 2012). Dentre os medicamentos orais disponíveis estão: as Biguanidas (metformina); as Sulfoniluréias (glibenclamida, glipzida, glicazida e glimepirida); as Metiglinidas (repaglinida e nateglinida); as Tiazolidinedionas (pioglitazona e rosiglitazona); os Inibidores da α-glucosidase (acarbose e miglitol); os Agonistas do receptor GLP-1 (exanetida e liraglutida); os Inibidores DPP-4 (sitagliptina, vidalgliptina, saxagliptina e linagliptina) (SBD, 2009; ADA, 2012).

As Tiazolidinedionas (TZDs) são uma classe de agentes hipoglicemiantes orais que está sendo amplamente utilizada para pacientes que apresentam resistência insulínica no DM2 (YKI-J, 2004). As TZDs aumentam a sensibilidade das células à insulina, melhorando o controle glicêmico através da ativação do receptor ativado por proliferador de peroxissomo gamma (PPARγ), além disso, essa classe melhora a função endotelial, a dislipidemia e o processo inflamatório desenvolvido por estes pacientes. Primeiramente as TZDs ativam os receptores de PPARγ no tecido adiposo, promovendo uma redistribuição dos estoques

triglicerídeos viscerais para os tecidos subcutâneos. As TZDs também reduzem as concentrações séricas de citocinas pró-inflamatórias que promovem a resistência insulínica e ao mesmo tempo aumentam as concentrações de adiponectina, a qual apresenta propriedades anti-inflamatórias e sensibilizadora de insulina (OLOKOBA et al., 2012).

Os efeitos múltiplos das TZDs no tecido adiposo e a interação desses efeitos com o fígado, músculo esquelético, células β e o endotélio vascular são os responsáveis pela melhora na ação e secreção da insulina. A redistribuição dos triglicerídeos viscerais reduzem o conteúdo lipídico do fígado o qual está intimamente relacionado com a obesidade e resistência insulínica (**Figura 3**) (STUMVOLL et al., 2005; CARIOU et al., 2012).

A ativação do PPARγ pelas TZDs também afeta o metabolismo ósseo, o PPARγ promove a diferenciação dos adipócitos à custa da produção de osteoblastos nas células-tronco mesenquimais, além disso, diminui a produção de IGF-1 e promove a diferenciação dos precursores de osteoclastos em osteoclastos maduros. Esses efeitos em conjunto diminuem a formação e aumentam a reabsorção óssea (GREY, 2009).

O aumento da adiposidade na medula óssea, promovido pelo PPARγ inibe a mineralização da matriz extracelular pelos osteoblastos, suprimindo a expressão de alguns genes que atuam nessas células, por consequência, diminuindo a formação óssea (RZONCA et al., 2004; SOROCÉANU et al., 2004). De acordo com Beck et al. (2012), o tratamento com pioglitazona durante 6 meses em pacientes com DM2 resultou na diminuição da osteoblastogênese nas células da medula óssea comparados com o grupo placebo, indicando um efeito indireto negativo nos osteoblastos. Recentemente foi demonstrado que o PPARγ promove o recrutamento e diferenciação dos osteoclastos nas células hematopoiéticas progenitoras através do controle da expressão da proteína c-fos, proteína importante para desenvolvimento da linhagem dos osteoclastos (WAN et al., 2007).

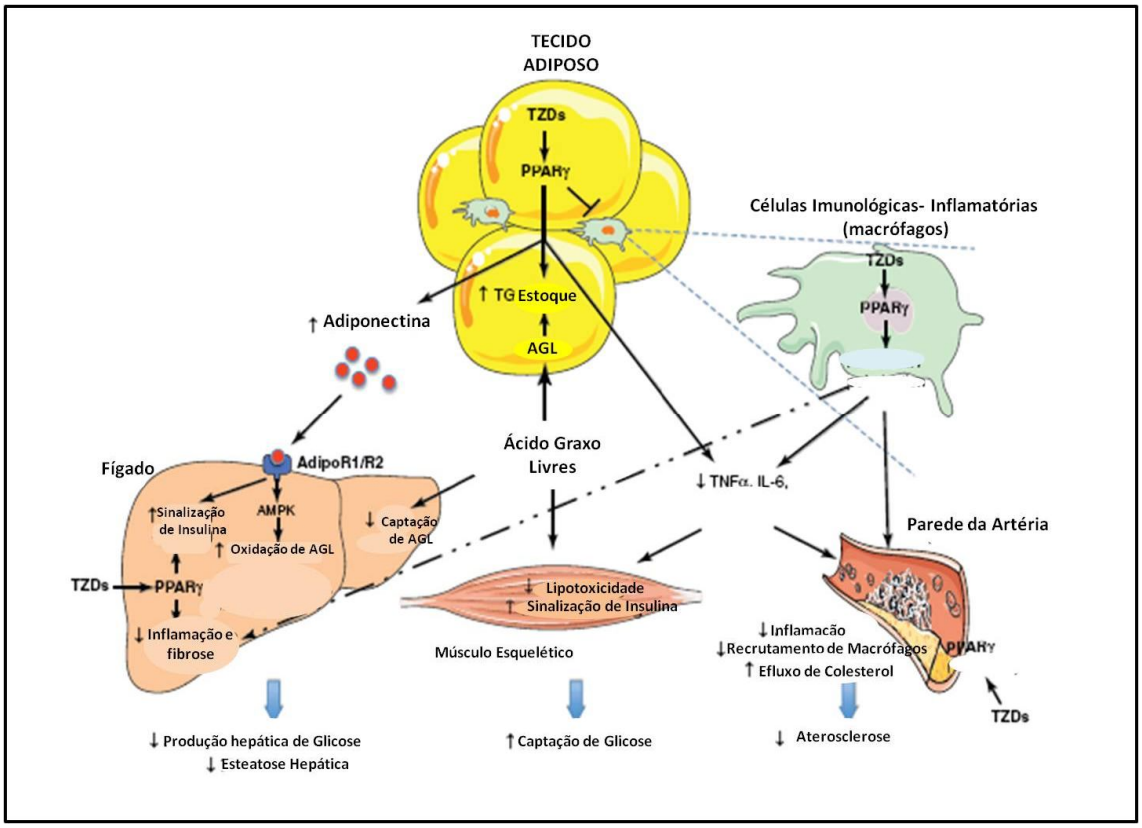


Figura 3. Mecanismo de Ação das TZDs. A ativação do PPARγ pelas TZDs no tecido adiposo promove diminuição da captação de lipídeos e aumento do estoque de triglicerídeos, através da diminuição da captação de AGL no fígado e músculo esquelético, onde seu acúmulo ocasiona bloqueio na sinalização de insulina. PPARγ também controla a produção de adiponectina pelos adipócitos e nos macrófagos diminui a liberação de citocinas pró-inflamatórias. No fígado as TZDs ativam o PPARγ, o qual promove a redução da fibrose e inflamação. A ativação do PPARγ nos macrófagos e no endotélio também reduz a aterosclerose. Adaptado de: CARIOU et al., 2012.

Para muitos pacientes com DM2 o tratamento farmacológico, com o passar do tempo torna-se ineficaz, demonstrando que nem todos os indivíduos respondem da mesma forma ao tratamento. De acordo com Distefano & Watanabe (2010), o controle glicêmico em resposta aos hipoglicemiantes orais varia amplamente, muitos fatores contribuem para as diferenças inter-individuais em relação à resposta farmacológica como a idade, o sexo, as interações medicamentosas e alimentares, as comorbidades e os fatores genéticos.

A variabilidade na resposta terapêutica é observada em várias áreas da medicina. As reações adversas aos medicamentos (RAMs) são responsáveis pelo término de aproximadamente 20% dos ensaios clínicos. Identificar as contribuições genéticas para as

RAMs pode levar a uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes à identificação de pacientes com risco e a uma diminuição no número de eventos adversos (NELSON et al., 2009).

Mutações em vários genes têm sido associadas com a forma heterogênea de DM2 (TAVARES et al., 2005a). Entretanto na maioria dos pacientes, os mecanismos genéticos envolvidos nesta patogênese ainda não estão claros. Os PPARs, membros da superfamília de receptores nucleares dos fatores de transcrição ativados, são potencias alvos para a avaliação da farmacogenética das TZDs (DISTEFANO & WATANABE, 2010).

O gene *PPARG* está localizado no cromossomo 3 (3p25) e apresenta três isoformas (PPARγ1, PPARγ2 e PPARγ3). Foram identificadas até o momento sete mutações pontuais. Um polimorfismo incomum, localizado na porção amino-terminal da isoforma PPARγ2, substituindo a prolina por alanina no códon 12 (rs1801282 - Pro12Ala), tem sugerido apresentar efeito protetor contra o risco de desenvolver resistência à insulina e DM2, associado com redução em 25% do risco para DM2 (MOORE & FLOREZ, 2008).

Outro polimorfismo, no exon 6 do gene *PPARG*, resultado de uma substituição de C para T (rs2972162 - C161T), tem sido alvo de estudos com relação à obesidade e a intolerância a glicose. Tavares et al. (2005b) verificaram que em indivíduos brasileiros com DM2, os portadores do alelo 161T apresentaram diminuição no índice aterogênico plasmático, nos triglicerídeos e no VLDL-C em comparação aos não portadores (TAVARES et al., 2005b). Em contrapartida, outro estudo desenvolvido por Yilmaz-Aydogan et al. (2011), em indivíduos DM2 com doença coronariana, evidenciou que os portadores do genótipo CT apresentaram aumento nas concentrações séricas de triglicerídeos em relação aos portadores do genótipo CC.

Com bases nessas informações, o DM2, o uso das TZDs e os polimorfismos genéticos influenciam de maneira significativa o remodelamento ósseo. Entretanto, os mecanismos

envolvidos ainda são controversos. É importante comentar que os estudos que envolvem pacientes com DM2 frequentemente 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 verificar o efeito da pioglitazona no remodelamento ósseo em pacientes DM2 e em modelo animal de diabetes, propomo-nos a avaliar a expressão dos genes *RANK*, *RANKL*, *OPG*, *PPARG*, *IL6*, *TNFA* e *VDR* e suas associações com os polimorfismos e marcadores ósseos em células do sangue periférico em pacientes com DM2 em resposta ao tratamento com pioglitazona.

Além disso, utilizaremos modelo experimental de diabetes para verificar se as alterações da estrutura óssea se correlacionam com as alterações encontradas no tecido sanguíneo nos animais tratados com pioglitazona.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar o efeito da Pioglitazona no remodelamento ósseo através de genes envolvidos na osteoclastogênese em pacientes diabéticos tipo 2 e em modelos experimentais, com a finalidade de identificar marcadores genéticos sensíveis de alterações do metabolismo ósseo.

2.2 Específicos

2.2.1 Avaliar a expressão do mRNA dos genes *RANK*, *RANKL*, *OPG*, *PPARG*, *IL6*, *TNFA* e *VDR* em leucócitos totais do sangue periférico nos indivíduos DM2 e comparar com os indivíduos normoglicêmicos;

2.2.2 Avaliar o efeito do tratamento com pioglitazona sobre a expressão do mRNA dos genes *RANK*, *RANKL*, *OPG*, *PPARG*, *IL6*, *TNFA* e *VDR* em leucócitos totais do sangue periférico nos indivíduos DM2;

2.2.3 Avaliar os efeitos dos polimorfismos dos genes: *RANK* (rs1805034), *RANKL* (rs9525641), *OPG* (rs3102735 e rs2073618), *PPARG* (rs1801282 e rs2972162) e *VDR* (rs11568820) sobre a expressão do mRNA em leucócitos totais do sangue periférico nos indivíduos DM2, antes e após o tratamento com pioglitazona;

2.2.4 Avaliar os efeitos dos polimorfismos *RANK* (rs1805034), *RANKL* (rs9525641), *OPG* (rs3102735 e rs2073618), *PPARG* (rs1801282 e rs2972162), *VDR* (rs11568820) e *ESRI* (rs9340799) sobre os parâmetros bioquímicos nos indivíduos DM2 antes e após o tratamento com pioglitazona;

2.2.5 Avaliar a expressão de mRNA dos genes *RANK*, *RANKL*, *OPG*, *PPARG*, *IL6* *TNFA*, *VDR* e *PTH*, em fêmures de camundongos C57BL/J6 submetidos a uma dieta hiperlipídica para indução de DM2 e tratados com pioglitazona;

2.2.6 Avaliar os parâmetros histomorfométricos nas tíbias de camundongos C57BL/J6 submetidos a uma dieta hiperlipídica para indução de DM2 e tratados com pioglitazona.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística e Protocolo Terapêutico

Foram selecionados inicialmente 239 pacientes na seção de Coronárias e Dislipidemias do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC). Desses indivíduos, 100 pacientes diagnosticados como DM2, de acordo com os critérios da Associação Americana de Diabetes (ADA, 2012), participaram integralmente do estudo. Entre os indivíduos normoglicêmicos (NG) e considerados não diabéticos pelos mesmos critérios da ADA, 99 participaram integralmente do estudo. Os demais indivíduos não puderam permanecer no estudo por diversas razões, como abondono e não compatibilidade com os critérios de exclusão, entre outros.

Todos os convidados a participar do estudo foram informados sobre o protocolo que foi previamente aprovado pelos Comitês de Ética das Instituições envolvidas Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP sob número 382/2006 (ANEXO A) e Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia sob número 3436/2006 (ANEXO B) e somente participaram os que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A).

Os pacientes diagnosticados com hiperglicemia na primeira coleta de sangue, todos virgem de tratamento, foram orientados a seguir uma dieta hipocalórica, sem o uso de hipoglicemiante oral, por 30 dias, conforme indicação médica. Após esse período, os pacientes foram reavaliados e os que apresentaram valores de glicemia maior ou igual a 126 mg/dL (7,0 mmol/L) ou maior ou igual a 200 mg/dL (11,1 mmol/L) 2hs pós-sobrecarga de 75g de glicose, receberam pioglitazona 15, 30, 45 e 45 mg /dia/ via oral, titulada de acordo com critério clínico, por 16 semanas consecutivas. No primeiro mês foi administrado ao paciente 15 mg, no segundo mês 30 mg, no terceiro e quarto mês 45 mg. Durante as 16

semanas de tratamento com pioglitazona, a cada 4 semanas foram avaliados a glicemia através do método capilar (Accu-Check Advantage; Roche Diagnostics) para acompanhamento do tratamento, também foram avaliados pressão arterial, peso e medida da cintura e do quadril.

Os dados biodemográficos foram obtidos de cada indivíduo através de entrevistas e preenchimento de um formulário específico (APÊNDICE B). Informações sobre a menopausa, o consumo de tabaco (fumo), consumo de álcool, hipertensão arterial, medicação em uso, atividade física e histórico familiar de doença arterial coronariana (DAC) foram registrados. Tabagismo foi definido como um consumo diário de um ou mais cigarros. O consumo de álcool foi considerado como uma ingestão diária de cerveja, vinho e aguardente de ≥ 1 g/dia. A atividade física foi considerada a prática de esportes, como caminhar, correr ou nadar, por pelo menos 2 horas por semana.

Cada indivíduo declarou sua etnia no momento da entrevista, como recomendado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Medidas antropométricas, como índice de massa corpórea (IMC), foram coletadas de cada participante. Pressão arterial sistólica/diastólica foi aferida após repouso por 30 minutos, por um único médico cardiologista, utilizando um esfigmomanômetro de coluna de mercúrio.

Critérios de Exclusão

Foram excluídos pacientes em uso de bloqueadores β-adrenérgicos, inibidores da enzima conversora de angiotensina, diuréticos tiazídicos, corticosteróides, fibratos, suplementos de cálcio, reposição hormonal e agentes hipoglicemiantes orais (tais como: metformina, repaglinida e 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.

3.2 Amostras Biológicas

Antes e após o tratamento com pioglitazona, foram coletadas amostras de sangue periférico, após jejum de 12 horas, utilizando o sistema de coleta a vácuo do tipo BD Vacutainer® (BD Diagnostics, São Paulo, SP, BR). Para a extração de DNA genômico, 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 glicose, insulina, perfil ósseo (fósforo, cálcio total, cálcio ionizado, tALP, bALP, tACP e Osteocalcina), renal (uréia e creatinina), hepático (ALT e AST), lipídico (colesterol total, triglicerídeos, HDL-C, LDL-C e VLDL-C), TSH, T4L, IL-6 e TNF-α. As amostras colhidas no tubo de coleta com heparina foram utilizadas para determinação da vitamina D. A avaliação de TSH e T4L foi utilizada para exclusão de pacientes com hipo ou hipertireoidismo. A dosagem de uréia e creatinina e a avaliação da atividade das enzimas ALT e AST foram utilizadas para exclusão de pacientes com lesão renal e hepática respectivamente.

3.3 Determinações dos Parâmetros Bioquímicos

A glicemia foi determinada através de método enzimático colorimétrico (TRINDER, 1969), a Hb1Ac e a vitamina D, por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). As concentrações séricas de colesterol total, HDL-C e triglicerídeos foram determinadas pelo método enzimático-colorimétrico (SUGIUCHI et al., 1995) e as de VLDL-C e LDL-C foram calculadas segundo a fórmula de Friedwald (FRIEDWALD et al., 1967). As concentrações

séricas de uréia, AST e ALT foram determinadas através do método enzimático (TALKE & SHUBERT, 1965) e as de creatinina foram determinadas pelo método colorimétrico modificado (JAFFE, 1866). As atividades séricas de tALP (BOWERS & MC COMB, 1966) e de tACP (COLEMAN & STROJE, 1966) foram determinas pelo método cinético e colorimétrico respectivamente. As concentrações séricas de cálcio total (CONNERTY & BRIGGS, 1966) e de fósforo (DAILY & ERTINGSHAUSEN, 1972) foram determinadas pelo método colorimétrico. As concentrações séricas do cálcio ionizado 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 monitorizarão 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), insulina e bALP (BABSON et al., 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 impedanciometria e citometria de fluxo automatizado (Pentra 80, ABX, Horiba, Japão). Todos os exames foram realizados no laboratório de análises clínicas do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, com excessão da bALP, cuja amostras foram enviadas para o Laboratório Alvaro / DA (Cascavel, PR).

Para a determinação das concentrações séricas de Osteocalcina, IL-6 e TNF-α foram utilizados testes de imunoensaios enzimáticos do tipo multiplex, utilizando o Kit HUMAN BONE PANEL 1A (Millipore, Billerica, MA, EUA), através do aparelho Luminex xMAP (Luminex, Austin, TX, EUA).

3.3.1 Cálculo dos Índices Homa-IR e Homa-Beta

O índice HOMA-IR, que avalia indiretamente a resistência insulínica, foi calculado utilizando a fórmula: Insulina (nmol/L) x glicemia (mmol/L) / 22,5 (BONORA et al., 2000). Para o cálculo do índice HOMA-Beta, que avalia a função secretora da célula beta, foi utilizado a fórmula: 20 x insulinemia (nmol/L) / (glicemia (mmol/L) - 3,5) (MATTHEWS et al., 1985).

3.4 Extração e Análise do DNA Genômico

O DNA genômico foi obtido a partir do sangue total periférico, colhido com EDTA, usando o kit *QiAmp DNA Blood Mini*® (Qiagen Biotecnologia do Brasil Ltda, São Paulo, SP) e a estação de trabalho robótica para purificação de DNA QIAcube® (Qiagen Biotecnologia do Brasil Ltda, São Paulo, SP).

A integridade das amostras de DNA foi avaliada por separação eletroforética em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE (Tris-HCl a 90 mM, ácido bórico a 90 mM e EDTA a 2,0 mM, pH 8,0), corado com gel RED® (BIO America, In, Miami, FL, EUA). Os resultados foram registrados em sistema de captura de imagem Lumis Bis®1.4MP (BIO America, In, Miami, FL, EUA). A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria a 260nm, utilizando o equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington EUA).

3.5 Análise dos Polimorfismos Genéticos

Os polimorfismos dos genes *RANK*, *RANKL*, *OPG*, *PPARG*, *VDR* e *ESRI* foram determinados pela PCR em tempo real, utilizando o sistema *TaqMan*® PCR (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Os iniciadores e sondas marcados com os fluoróforos FAM® e VIC® foram produzidos comercialmente (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil) baseados na sequência do banco de dados do *NIH* (Instituto Nacional de Saúde). Os demais reagentes foram fornecidos sob forma pré-preparada como *Master Mix*®, contendo dNTPs com dUTP (desoxiuridina trifosfato), *AmpErase*® UNG (Uracil N-glicosilase), enzima *AmpliTaq Gold*® DNA Polimerase, uma referência passiva e tampão de reação *Gold PCR Buffer*® (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Foram utilizados 10ng de DNA genômico para genotipagem para o volume final de 12µL. As reações foram realizadas no equipamento ABI 7500 FAST® (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil), empregando o seguinte programa: (1) um ciclo 2 minutos a 50ºC (ativação da UNG); (2) um ciclo de 10 minutos a 95ºC (inativação da UNG); (3) 40 ciclos de 15 segundos a 95ºC (desnaturação) e 1 minuto a 60ºC (hibridização e extensão). Os sinais de fluorescência foram analisados através do programa *Sequence Detection* v1.2.3 (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil), nos quais os sinais de amplificação permitem identificar cada genótipo.

Com o objetivo de garantir a precisão da genotipagem, os ensaios foram repetidos em 10% das amostras. Na **Tabela 1** estão descritos os polimorfismos estudados.

Tabela 1. Identificação dos Polimorfismos Estudados

Genes	Núm. do SNP de Referência	Ref/Seq/Gene	Troca de Base	Frequência do Alelo Raro (NCBI)
RANK	rs1805034	NM_003839.2	C>T	C=39,5%
RANKL	rs9525641	NM_033012.3	C>T	C=46,2%
OPG	rs3102735	NC_000008.10	C>T	C=16,4%
OPG	rs2073618	NC_000008.10	C>G	G=35,6%
PPARG	rs1801282	NM_005037.5	C>G	G=6,6%
PPARG	rs2972162	NM_005037.5	C>T	T=44,7%
VDR	rs11568820	NG_008731.1	A>G	A=41,5%
ESRI	rs9340799	NM_000125.3	A>G	G= 25,6%

Fonte: Banco de Genes (GenBank) do NCBI do Instituto Nacional de Saúde (*NIH*) (www.ncbi.nlm.gov).

3.6 Extração e Análise do RNA Total em Leucócitos Totais do Sangue Periférico (LTSP)

O RNA total foi obtido a partir de células do sangue total periférico, colhido com EDTA utilizando o kit de extração *QiAamp RNA Blood Mini*® (Qiagen Biotecnologia do Brasil Ltda, São Paulo, SP) imediatamente após a colheita do sangue. RNA total foi eluído em 30µL em água livre de RNases (*QIAamp RNA Blood Mini Handbook*). O material obtido foi armazenado a - 80°C até a sua análise.

O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria (260/280nm) no ultravioleta (UV) (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) com a utilização do equipamento NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, EUA). O grau de pureza do RNA foi determinado pela relação A260 nm/A280 nm (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

3.7 Expressão Gênica pela RT-PCR Quantitativa em Tempo Real (RT-PCRq)

A medida quantitativa da expressão do mRNA em LTSP foi realizada através da reação de transcriptase reversa (RT), seguida de amplificação pela reação em cadeia da polimerase quantitativa (PCRq) em tempo real, utilizando o sistema *TaqMan*® no equipamento ABI 7500 FAST® (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Para determinar o gene de referência mais estável (*housekeeping*) foi avaliado um painel de genes candidatos conforme descrito por Vandesompele et al. (2002), utilizando o *software* geNorm (http://medgen.ugent.be/genorm/). Após esse procedimento, os ensaios foram normalizados pelo gene gliceraldeido-3-fosfato deidrogenase (GAPD).

O cDNA foi obtido a partir de 200ng de RNA, na presença de 200ng de iniciadores aleatórios (*random primers*), DTT 20mM (Life Technologies do Brasil, São Paulo, SP, Brasil), dNTP a 10mM (Amersham-Pharmacia Biotech do Brasil, São Paulo, SP, Brasil), 200U de transcriptase reversa (SuperScript™II RT RNase H^-) e tampão (Tris-HCl 250mM pH 8,3, KCl 375mM, $MgCl_2$ 15mM) (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil). O ensaio de RT foi realizado em termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., Walthan, MA, EUA) com as seguintes etapas: 25°C por 10 minutos, 42°C por 50 minutos e 70°C por 15 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a realização da PCRq.

Os iniciadores e as sondas marcados com os fluoróforos VIC®, FAM® e TAMRA® de acordo com a **Tabela 2**, para os genes *RANK*, *RANKL*, *OPG*, *PPARG*, *IL6*, *TNFA* e *GAPD* foram selecionados com o auxílio do programa *Primer Express*® (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil) com base nas sequências gênicas disponíveis no banco de dados do *NIH* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Para o gene *VDR*, a sequência dos iniciadores e da sonda marcada com fluoróforo foram obtidos comercialmente (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil) (**Tabela 2**).

As reações de amplificação foram realizadas com o ensaio de expressão gênica 1X T*aqMan*® (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil) para o gene *VDR* e com 250nM de sonda e 300nM de cada iniciador (sense e antisense), para os demais genes. Os demais reagentes foram fornecidos em solução duas vezes concentrada denominada *Master Mix*®, contendo dNTPs com dUTP (desoxiuridina trifosfato), *AmpErase*® UNG (Uracil N-glicosilase), enzima *AmpliTaq Gold*® DNA Polimerase, uma referência passiva e tampão de reação *Gold PCR Buffer*® (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil) e 1µL do cDNA, em um volume total de 10µL. As condições de termociclagem da PCRq foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 minuto. As reações foram realizadas em duplicata.

Tabela 2. Iniciadores e sondas marcadas utilizadas nas PCRqs em Tempo Real para Humanos.

Genes	**Iniciadores e Sondas**	**Fragmentos**
RANK	5'CACTGGATCAATGAGGCTTGTG3' 5'GTTTGCCGTGTGTG ACTGACA3' 5'FAM TAAGTGGAGATAAGGAGTCC MGB3'	81 bp
RANKL	5'CGTTGGATCACAGCACATCAG3' 5'TGCTCCTCTTGGCCAGATCT3' 5'FAM CAGAGAAAGCGATGGTGG MGB3'	74 bp
OPG	5'TGCAGCGGCACATTGG3' 5'TTACCGGGAAAGAAAGTGGGA3' 5'FAM ACCTCCCTTCGAGCAG MGB3'	82 bp
PPARG	5' GCAAAGGCGAGGGCG 3' 5'CCCATCATTAAGGAATTCATGTCAT 3' 5'FAM CAGACAAATCACCATTCG MGB3'	82 bp
TNFA	5' CCTGCCCCAATCCCTTTATT 3' 5' CCAATTCTCTTTTTGAGCCAGAA 3' 5'TAMRACCCCCTCCTTCAGACACCCTCAACC3'	70 bp
IL6	5' CGGGAACGAAAGAGAAGCTCTA 3' 5' GGCGCTTGTGGAGAAGGA 3' 5' TAMRACGCCTCCAGGAGCCCAGCTATGA 3'	68 bp
GAPD	5'GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA3' 5'CTGGAAGATGGTGATGGGATTTC3' 5'VIC TCAGCCTTGAGGGTGC NFQ3'	229 bp
*VDR**	Hs01045840_m1	88 bp

Legenda:* Para iniciadores e sonda adquiridos comercialmente (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil). FAM®: fluoróforo 6-carboxifluoresceína; MGB: *minor groove binder*; NFQ: *quencher* não fluorescente: VIC®: 6-carboxirodamina; TAMRA®: tetrametil-rodamina.

As condições da PCRq foram otimizadas para cada gene. As eficiências dos ensaios de amplificação foram calculadas utilizando-se curva padrão obtida da relação entre o log de diferentes quantidades de cDNA e os respectivos valores de ciclo *treshold* (Ct). A eficiência (E) 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). A eficiência de cada ensaio foi considerada adequada para valores entre 90 e 110%. Segundo Livak & Schmittgen (2001), para a PCRq em tempo real ter alta eficiência, a inclinação da curva-padrão deve ser próximo de -3,3. Na **Tabela 3** são apresentados os resultados das inclinações (*slopes*) das curvas e as respectivas eficiências dos ensaios para os genes.

Tabela 3. Valores de inclinação da curva e eficiência da RT-PCRq em Tempo Real para Humanos.

Gene	Inclinação da curva	Eficiência
RANK	-3,60	89 %
RANKL	-3,01	114 %
OPG	-3,41	96 %
PPARG	-3,32	101 %
IL6	-3,20	100%
TNFA	-3,21	100%
GAPD	-3,43	96%
VDR	-3,41	96%

A quantificação da expressão gênica foi realizada utilizando o gene de referência escolhido (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Essa relação é denominada Delta Ct (ΔCt) e é calculada pela fórmula: $\Delta Ct = (Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene endógeno}})$.

Para avaliar a expressão após o tratamento com pioglitazona, os dados obtidos a partir do ΔCt foram convertidos em escala logarítmica ($2^{-\Delta Ct}$), para análise dos dados.

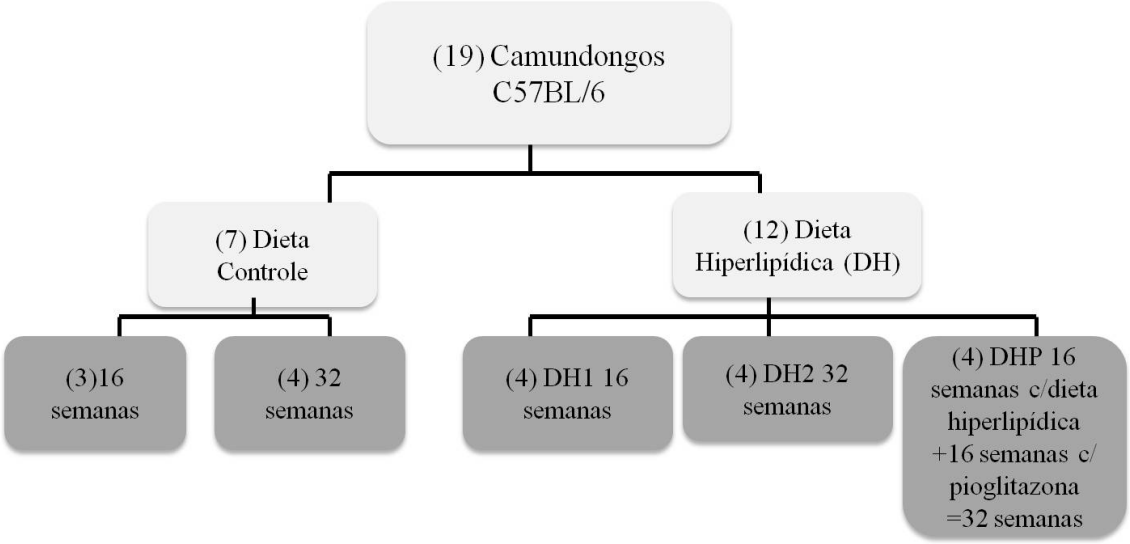
4 EXPERIMENTOS EM ANIMAIS

4.1 Aspectos Éticos e Biossegurança

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) em Natal, sob número 023/2009 (ANEXO C). Os animais foram tratados e manipulados seguindo as recomendações da Comissão de Ética no uso de animais, obedecendo aos preceitos da lei 11.794/2008 e ainda da resolução nº 879/2008. Os resíduos gerados durante os procedimentos foram descartados segundo recomendações da ANVISA (RDC 33/2003) e o material encaminhado para autoclavação e posteriormente descartado como resíduo do grupo D do serviço de saúde.

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/J6, de peso entre 20-25 g, mantidos no Biotério do Centro de Ciências da Saúde da UFRN. Foram obedecidos os critérios de ciclo de claro/escuro de 12 horas, temperatura ambiente de 23°C ± 1 e umidade de 55% ± 5. Os animais receberam água *ad libitum* e rações manufaturadas de acordo com o Instituto Americano de Nutrição (AIN-93). Os animais (n=19) foram divididos de acordo com o **Fluxograma 1**.



Fluxograma 1. Grupo Controle (n=7), os quais receberam dieta controle por 16 semanas (n=3) e por 32 semanas (n=4); Grupo DH1 – animais tratados com dieta hiperlipídica durante 16 semanas (n=4); Grupo DH2 – animais tratados com dieta hiperlipídica durante 32 semanas (n=4); Grupo DHP – animais tratados com dieta hiperlipídica por 16 semanas e em seguida submetidos ao tratamento com Pioglitazona 35mg/Kg/dia durante 16 semanas (n=4).

A dosagem da glicemia dos animais foi utilizada como critério para determinação da instalação do DM.

Após o término do período experimental, os animais foram anestesiados através da via intravenosa com Tiopental Sódico (45mg/Kg) e posteriormente foram submetidos à eutanásia e à laparotomia para coleta de sangue por punção cardíaca e retirada dos tecidos.

Os cuidados com os animais foram conduzidos de forma a minimizar o sofrimento e limitar o número de espécimes necessário às investigações, de acordo com o "*The guide for the care and use of laboratory animals*", 1996 (NATIONAL RESEARCH COUNCIL,1996).

4.3 Formulações das Dietas

As dietas balanceadas foram formuladas de acordo com as normas estabelecidas pelo Instituto Americano de Nutrição em 1993 (AIN-93), especificamente para roedores. Foram desenvolvidos dois tipos de formulações de acordo com o **Quadro 1**.

Quadro 1. Formulações da Dieta Controle e da Dieta Hiperlipídica

Dieta Controle (g/Kg de ração)			**Dieta Hiperlipídica (g/Kg de ração)**		
Nutrientes		**%**	**Nutrientes**		**%**
Amido de milho	620,692g/Kg	62,0692%	Amido de milho	250,692g/Kg	25,0692%
Caseína	140g/Kg	14,0%	Caseína	190g/Kg	19,0%
Óleo de Soja	40g/Kg	4,0%	Óleo de soja	40g/Kg	4,0%
Sacarose	100g/Kg	10,0%	Sacarose	100g/Kg	10,0%
Mistura de Minerais	35g/Kg	3,5%	Mistura de Minerais	35g/Kg	3,5%
Mistura Vitamínica	10g/Kg	1,0%	Mistura Vitamínica	10g/Kg	1,0%
Colina	2,5g/Kg	0,25%	Colina	2,5g/Kg	0,25%
Fibra	50g/Kg	5,0%	Fibra	50g/Kg	5,0%
Cistina	1,8g/Kg	0,18%	Cistina	1,8g/Kg	0,18%
Antioxidante	0,008g/Kg	0,0008%	Antioxidante	0,008g/Kg	0,0008%
			Banha de porco	320g/Kg	32,0%

Os ingredientes utilizados para as formulações das dietas foram provenientes da Rhoster Indústria e Comércio Ltda (Araçoiaba da Serra, SP, Brasil). O preparo foi realizado a partir da mistura de todos os ingredientes em pó, seguido de um processo de peneiração (10 vezes) a fim de se obter uma mistura homogênea e com partículas uniformes. A banha foi adicionada e misturada à ração em pó, após o processo de peneiração. Todo o procedimento foi realizado com a devida paramentação de biossegurança. Os animais do grupo C (controle) se alimentaram de cerca de 4 g diárias de ração e os animais do grupo DH de 2,6 g diárias de ração. Os animais do grupo DH ingeriram menos quantidade de ração, uma vez que a mesma

foi manipulada com banha, que leva a uma maior saciedade e ganho calórico do que a ração controle.

4.4 Tratamento com Pioglitazona

O medicamento foi pulverizado com o auxilio de gral e pistilo, e misturado à ração em pó através de diluição geométrica. A ração em pó contendo o fármaco foi misturada a banha diariamente no momento do trato dos animais, sendo ingerido pelos animais em média uma concentração de 35mg/Kg/dia de Pioglitazona em 2,6g de ração. A ração ingerida pelos animais foi pesada diariamente.

4.5 Determinação da Glicose Capilar e do Peso dos Animais

A glicose capilar foi determinada através do glicosímetro digital (Advantage; Boehringer Mannheim), utilizando-se apenas uma gota de sangue retirada da extremidade da cauda do animal. Esse procedimento foi realizado no dia zero e a cada dois meses. Neste mesmo período foi obtido o peso corporal dos animais.

4.6 Amostras Biológicas

Após o término do período experimental, os animais em estudo foram anestesiados com Tiopental Sódico (45mg/Kg), sendo posteriormente submetidos à laparotomia para a coleta de sangue por punção cardíaca e retirada dos fêmures, das tíbias, do fígado, dos rins e do coração. As amostras de sangue foram encaminhadas para realização das dosagens bioquímicas no laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFRN. Os fêmures

foram armazenados em freezer -80°C para posterior extração do RNA total. As tíbias foram utilizadas para avaliar os parâmetros histomorfométricos. O fígado, os rins e o coração foram armazenados a -80°C para estudos posteriores.

4.7 Determinações dos Parâmetros Bioquímicos

Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 4°C (Centrifuga Modelo 5810 - Eppendorf, Alemanha) a 2.000 rpm, durante 10 minutos. As dosagens de fósforo, cálcio total, glicose, colesterol total e triglicerídeos foram realizadas utilizando os *kits Biosystems Reagents and Instruments* (Barcelona, Espanha), de acordo com a metodologia descrita pelo fabricante, utilizando o espectrofotômetro RA 50 (Bayer Diagnósticos, Irlanda). A dosagem do cálcio ionizado foi realizada utilizando o analisador de eletrólitos Eletrolyte Analyser AVL 9180, ROCHE (Nova Jersey, EUA).

4.8 Extração e Análise do RNA Total em Fêmures

O RNA total foi obtido a partir dos fêmures armazenados a -80°C utilizando o kit de extração *RNeasy Plus Mini Kit*® (Qiagen Biotecnologia do Brasil Ltda, São Paulo, SP). O RNA total foi eluído em 30µL em água livre de RNases (*RNeasy Plus Mini Kit*). O material obtido foi armazenado a -80°C até a sua análise.

A quantificação do RNA foi realizada de acordo com o item **3.6**. Os fragmentos de separação eletroforéticas foram visualizadas sob luz UV, após coloração com gel Red® (BIO America, In, Miami, FL, USA) (SAMBROOK & RUSSEL, 2001) e fotodocumentados através do sistema de captura de imagem *ChemiImager*® 4400 (v5.5) (*Alpha Innotech*

Corporation, San Leandro, CA, EUA). Na **Figura 4**, podem ser visualizadas as subunidades 28 e 18s do RNA ribossomal.

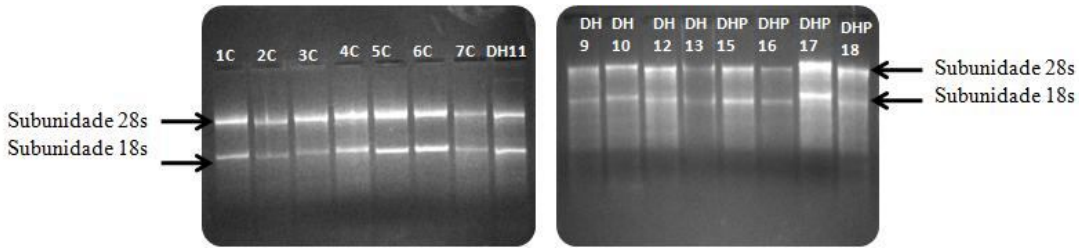


Figura 4. Fotografias dos géis de agarose 1% em tampão MOPS para integridade do RNA dos fêmures. C: Grupo controle (1-7); DH: Grupo submetido à dieta hiperlipídica (9-13); DHP: Grupo submetido à dieta hiperlipídica e tratamento com pioglitazona (15-18).

4.9 Expressão Gênica pela RT-PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-PCRq)

A medida quantitativa da expressão do mRNA fêmures foi realizada pela RT-PCRq em tempo real utilizando o sistema *TaqMan*® RT-PCR (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil). O sinal de fluorescência emitido pelo fluoróforo da sonda *TaqMan*® foi detectado em tempo real no equipamento ABI 7500 FAST® (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Para os genes do estudo, as sequências dos iniciadores e das sondas marcadas com fluoróforos foram produzidas comercialmente (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Os códigos de identificação dos ensaios estão descritos na **Tabela 4**.

Tabela 4. Identificação dos ensaios utilizados nas PCRqs em Tempo Real para Camundongos.

Genes	Identificação do ensaio	Fragmento
RANK	Mm00437135_m1	107 bp
RANKL	Mm01313943_m1	73 bp
OPG	Mm01205928_m1	75 bp
PPARG	Mm00440940_m1	63 bp
IL6	Mm99999064_m1	75 bp
TNFA	Mm0043259_g1	74 bp
VDR	Mm00437297_m1	95 bp
PTH	Mm00451600_g1	82 bp
GAPD	Mm99999915_g1	107 bp

Legenda: Iniciadores e sondas adquiridos comercialmente (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil).

Para os ensaios da RT-PCRq em tempo real, o cDNA obtido e a eficiência da reação foram realizadas conforme já descrito no item **3.7**. Na **Tabela 5**, são apresentados os resultados de inclinações (*slopes*) das curvas e as respectivas eficiências dos ensaios para os genes em camundongos.

Tabela 5. Valores de inclinação da curva e eficiência da RT-PCRq em Tempo Real para Camundongos.

Gene	Inclinação da curva	Eficiência
RANK	-3,30	100 %
RANKL	-3,37	98 %
OPG	- 3,39	99 %
PPARG	- 3,42	95 %
TNFA	-3,52	92%
IL6	-3,56	90%
VDR	-3,41	96%
PTH	-3,50	93%
GAPD	- 3,24	103%

4.10 Análises Histomorfométricas

As análises histomorfométricas foram realizadas pelo Prof. Dr. Francisco Pignataro Lima (PhD, Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde – UFRN). As análises foram realizadas nos animais do grupo C, DH e DHF ao final de 32 semanas da indução de diabetes. Utilizou-se a tíbia direita extraída dos animais, que após livre de todo tecido mole aderente, foi submersa imediatamente em solução fixadora de formol tamponado a 10%. Em seguida, foi realizada a descalcificação em ácido nítrico a 7,5%, seguida de desidratação em solução de xilol. Finalmente, impregnada em parafina líquida, sendo utilizado um processador automático de tecidos. O fragmento foi então incluído no bloco de parafina e seccionado em um micrótomo rotativo em cortes de 4 micrômetros de espessura. As lâminas foram levadas à estufa de secagem durante 30 minutos para em seguida serem coradas com hematoxilina-eosina. Para a análise histomorfométrica, visando determinar a espessura média das trabéculas ósseas da região metafisária, bem como a distância trabecular, foi utilizado um microscópio

Olympus BX 51 com uma câmera Q-Color 3 Olympus (Olympus, Tókio, Japão) acoplada com auxilio do software Q-Capture Pro (Surrey, BC, Canadá). Foram selecionadas para a análise três áreas, ao acaso, em secções não adjacentes de cada trabécula óssea.

A análise da porcentagem de área ocupada pelo osso trabecular e medula óssea trabecular foi realizada utilizando microfotografias retiradas da região metadiafisária das tíbias dos animais com aumento de 200X. Essas microfotografias digitalizadas foram processadas através do programa Photostudio 2.0 SE (Tiling 3D grid, com grade tamanho médio; ArcSoft, Fremont, CA, EUA). A planimetria foi feita por superposição de pontos observada na secção. A contagem dos pontos foi realizada em todas as transecções incluídas no osso trabecular, excetuando-se os pontos das bordas da imagem. Foi utilizado o princípio *Delesse*, o qual estabelece que a fração do volume Vvi (fração de volume ocupada por i) de uma componente i (densidade volumétrica) em um tecido pode ser estimada pela medida da fração de área AAi (fração de área da secção de i). A fração Ppi (fração de pontos testes incluídos em i) de pontos localizados nas transecções de i dividida por PT (número de pontos testes) resulta na estimativa de Vvi (WEIBEL, 1966). O porcentual foi encontrado usando-se a média da fração de volume de densidade de cada animal em cada grupo.

5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram analisados através do software Sigma Stat versão 2.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA), considerando o nível de significância $p<0,05$. Para avaliar as diferenças de frequências das variáveis qualitativas como obesidade e sexo, foram realizados os testes de Qui-Quadrado e Exato de Fischer.

Para comparar os valores dos parâmetros bioquímicos entre os grupos NG e DM2 foram utilizados o Teste-t de *Student* e *Mann-Whitney*. Para comparar os valores dos parâmetros bioquímicos antes e após o tratamento com pioglitazona no grupo DM2 foram utilizados o Teste-t de *Student* pareado para o teste paramétrico e *Wilcoxon Signed Rank Test* para o teste não paramétrico.

Para comparar os valores de expressão gênica entre os grupos NG e DM2 foi utilizado o teste *Mann-Whitney*. Para comparar os valores de expressão gênica antes e após o tratamento com pioglitazona foi utilizado teste *Wilcoxon Signed Rank*.

Para a análise de regressão linear múltipla, os valores de expressão foram transformados em log de base 10 para os testes paramétricos. Os marcadores ósseos antes do tratamento e em resposta ao tratamento foram usados como variáveis dependentes e os valores de glicemia de jejum, insulina e a expressão de mRNA dos genes *RANKL*, *OPG*, *PPARG*, *IL6*, *TNFA* e *VDR* foram inclusos no modelo como variáveis independentes. Idade, gênero, hipertensão, IMC e TNF-α sérico foram inclusos como covariáveis. O coeficiente de regressão (B) e o erro padrão (EP) foram obtidos de cada variável dependente. A significância estatística foi considerada com $p<0,05$.

Para a análise de correlação entre a expressão dos genes *RANK* e *RANKL* antes e após o tratamento foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman para valores não paramétricos.

As frequências alélicas e genotípicas foram comparadas pelo teste Qui-Quadrado. Foram calculados *Odds Ratio* (OR) e o Intervalo de Confiança (IC) de 95%. Para avaliar a influência dos polimorfismos na expressão gênica e nos parâmetros bioquímicos, foram utilizados o Teste-t de *Student* para comparação da média entre duas variáveis e o teste *One Way* ANOVA para comparação de três ou mais variáveis contínuas, seguido do teste de Tukey ou Dunn para múltiplas comparações. Para a análise das variáveis não contínuas foram utilizados os testes *Mann-Whitney* e *Kruskall Wallis*. Para as análises dos polimorfismos genéticos, foi utilizado o modelo genético recessivo, no qual os genótipos heterozigotos foram agrupados com o genótipo raro (quando este apresentou frequência inferior a 14%). A avaliação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizada usando o programa MS-DOS QBasic V. 1.1 (Microsoft Informática Ltda., São Paulo, Brasil).

Financiamento do Projeto

Este Projeto foi financiado pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, sob o nº 2007/56244-4. Os experimentos em animais foram executados com a colaboração da Profa. Dra. Adriana Augusto Rezende do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciencias Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

6 RESULTADOS

6.1 Dados Biodemográficos

Os dados biodemográficos dos indivíduos NG e DM2 estão sumarizados na **Tabela 6**. A idade média e o IMC foram maiores no grupo DM2 em comparação ao grupo NG ($p<0,05$). A distribuição relativa entre os sexos, etnia, mulheres com ou sem menopausa, obesidade, hipertensão, consumo de tabaco e de álcool, atividade física e histórico familiar de DAC foram similares entre os grupos ($p>0,05$).

Tabela 6. Dados Biodemográficos dos indivíduos NG e DM2.

Variáveis	**NG (99)**	**DM2 (100)**	***P***
Idade, anos	53,9 ± 11,2	60,8 ± 8,2	**0,001**
Mulheres, %	51,5 (51)	44,0 (44)	0,358
Caucasianos, %	62,6 (62)	74,0 (74)	0,970
Hipertensão, %	47,5 (47)	50,0 (50)	0,830
Obesidade, %	34,3 (34)	45,0 (45)	0,164
IMC, kg/m^2	29,1 ± 5,1	30,8 ± 6,6	**0,036**
Menopausa, %	76,5 (39)	81,8 (36)	0,700
Consumo de tabaco, %	11,1 (11)	14,0 (14)	0,688
Consumo de álcool, %	7,1 (7)	7,0 (7)	0,797
Atividade física, %	37,4 (37)	34,0 (34)	0,641
Histórico familiar de DAC, %	42,4 (42)	42,0 (42)	0,099

Legenda: Número de indivíduos está entre parênteses. NG: normoglicêmicos; DM2: diabetes tipo 2, IMC: índice de massa corpórea; DAC: doença arterial coronariana. Indivíduos com IMC ≥ 30 kg / m² foram classificados como obesos e aqueles com pressão arterial sistólica/diastólica superior a 140/90 mmHg ou estavam sob terapia anti-hipertensiva foram considerados hipertensos. As variáveis contínuas estão apresentados como média ± DP e comparadas pelo Teste-t de *Student*. As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste do Qui-Quadrado.

6.2 Efeito da Pioglitazona sobre as Determinações Bioquímicas

Os valores médios das determinações bioquímicas dos indivíduos DM2 (pré-tratamento e pós-tratamento) e NG estão apresentados na **Tabela 7.** Os indivíduos DM2 apresentaram aumento nas concentrações basais de glicemia de jejum, glicemia pós-prandial, Hb1Ac, insulina e índice HOMA-IR e diminuição de HDL-C, Osteocalcina e TNF-α em relação aos indivíduos NG ($p<0,05$). Os demais parâmetros não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p>0,05$).

Após 16 semanas de tratamento com pioglitazona, os indivíduos DM2 apresentaram diminuição nos valores de glicemia de jejum, glicemia pós-prandial, insulina, índice HOMA-IR, triglicerídeos, VLDL-C, tALP e bALP e aumento de HDL, tACP e TNF-α em comparação ao grupo basal ($p<0,05$).

Tabela 7. Parâmetros Bioquímicos dos indivíduos NG e DM2 pré e pós-tratamento.

Variáveis	NG (99)	DM2 Basal (100)	p^1	DM2 Pioglitazona (100)	p^2	Variação (%)
Peso (Kg)	78,7 ± 17,2	81,1 ± 18,7	0,401[b]	81,8 ± 19,0	0,058[c]	0,9
Glicemia (mmol/L)	5,2 ± 0,7	6,4 ± 1,2	**0,001[b]**	5,8 ± 1,1	**0,001[c]**	- 9,3
Glicemia pós-prandial (mmol/L)	5,8 ± 1,6	10,6 ± 2,9	**0,001[b]**	7,8 ± 2,5	**0,001[c]**	- 22,7
Hb1Ac (%)	5,8 ± 0,4	6,3 ± 0,9	**0,001[b]**	6,2 ± 1,1	0,140[d]	- 0,07
Insulina (nmol/L)	9,9 ± 6,5	13,6 ± 8,1	**0,001[b]**	10,5 ± 11,5	**0,001[d]**	- 8,1
Índice HOMA-IR	2,3 ± 1,6	3,9 ± 2,3	**0,001[b]**	2,7 ± 2,8	**0,001[d]**	- 19,8
Índice HOMA-Beta (%)	125,3 ± 91,3	114,1 ± 107,6	0,154[b]	120,5 ± 154,5	0,500[d]	55, 4
Perfil lipídico (mmol/L)						
Colesterol Total	5,1 ± 0,9	4,9 ± 1,1	0,139[b]	5,0 ± 1,2	0,079[c]	2,0
Triglicerídeos	1,7 ± 0,8	1,8 ± 1,2	0,885[b]	1,5 ± 1,0	**0,001[d]**	- 16,7
HDL-C	1,22 ± 0,36	1,10 ± 0,36	**0,002[b]**	1,18 ± 0,29	**0,001[d]**	7,3
LDL-C	3,0 ± 0,8	3,0 ± 1,0	0,477[b]	3,1 ± 1,1	0,058[c]	3,3
VLDL-C	0,8 ± 0,4	0,8 ± 0,5	0,794[b]	0,7 ± 0,5	**0,001[d]**	- 12,5
Cálcio Total (mmol/L)	2,3 ± 0,3	2,3 ± 0,1	0,055[b]	2,3 ± 0,1	0,171[d]	- 0,6
Cálcio Ionizado (mmol/L)	1,16 ± 0,10	1,15 ± 0,09	0,276[b]	1,15 ± 0,10	0,885[d]	0,9
Fósforo (mmol/L)	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,876[b]	1,1 ± 0,2	0,480[c]	3,0
tACP (U/L)	3,4 ± 1,8	3,1 ± 1,3	0,180[a]	3,6 ± 1,5	**0,043[c]**	76,5
tALP (U/L)	79,1 ± 26,7	75,8 ± 23,0	0,513[b]	70,8 ± 19,9	**0,004[c]**	- 2,6
bALP (U/L)	18,8 ±15,5	21,5 ±15,4	0,053[b]	11,8 ± 5,7	**0,001[d]**	- 29,9
OC (ng/mL)	11,7 ± 5,1	10,8 ± 7,7	**0,006[b]**	11,9 ± 7,9	0,117[d]	22,3
25(OH)VD (pg/mL)	26,5 ± 9,6	27,8 ± 9,4	0,299[b]	24,6 ± 8,8	0,109[d]	- 0,5
TNF-α (pg/mL)	7,5 ± 5,0	6,3 ± 3,8	**0,050[b]**	10,3 ± 6,5	**0,001[d]**	84,5
IL-6 (pg/mL)	6,9 ± 18,4	6,3 ± 8,9	0,510[b]	6,3 ± 8,0	0,777[d]	- 0,5

Legenda: Número de indivíduos está entre parênteses. NG: normoglicêmicos; DM2: diabetes tipo 2; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: modelo de avaliação da homeostase - resistência à insulina; HOMA-Beta: modelo de avaliação da homeostase - 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; tACP: fosfatase ácida total; tALP: fosfatase alcalina total; bALP: fosfatase alcalina óssea específica; OC: osteocalcina; 25(OH)VD: 25,hidróxi-vitamina D. Os resultados estão apresentados como média ± desvio-padrão quando comparados por: Teste-t de *Student*[(a)], *Mann-Whitney*[(b)], Teste-t pareado[(c)] e *Wilcoxon Signed Rank Test*[(d)]. P^1: NG x DM2 basal; P^2: DM2 basal x pioglitazona; % variação: (Pioglitazona-Basal)/Basal x 100.

6.3 Efeito da Pioglitazona sobre a Expressão Gênica em LTSP

As expressões dos genes *RANK*, *RANKL*, *OPG*, *PPARG*, *IL6*, *TNFA* e *VDR* em LTSP foram analisadas em 100 indivíduos do grupo DM2 que concluíram o tratamento de 16 semanas e 99 indivíduos do grupo NG (**Tabela 8**, **Figura 5**, **6** e **7**).

Ao analisarmos os resultados de expressão gênica no grupo DM2 basal, pode-se observar que a expressão de *OPG* está diminuída ($p<0,006$), enquanto que a expressão de *VDR* está aumentada ($p<0,001$) em comparação ao grupo NG (**Figura 5**). Entre o gênero feminino, observou-se que a expressão de *RANKL*, *IL6* e *VDR* no grupo DM2 está aumentada em comparação ao grupo NG ($p<0,05$). A expressão dos outros genes foi similar entre os grupos do gênero feminino analisados ($p>0,05$) (**Figura 6**). No gênero masculino, observou-se que a expressão de *OPG* no grupo DM2 está diminuída em comparação ao NG ($p<0,048$), enquanto que a expressão de *PPARG* e *VDR* está aumentada no grupo DM2 em comparação ao NG ($p<0,05$). A expressão dos outros genes foi similar entre os grupos do gênero masculino analisados ($p>0,05$) (**Figura 7**).

O resultado da expressão gênica após o tratamento com pioglitazona mostrou aumento somente de *OPG* ($p<0,027$) (**Figura 5**). As expressões dos outros genes foram similares entre os grupos NG e DM2 e entre os gêneros analisados ($p>0,05$) (**Tabela 8**, **Figura**, **5**, **6** e **7**).

Tabela 8. Expressão do mRNA de *RANK*, *RANKL*, *OPG*, *PPARG*, *IL6*, *TNFA* e *VDR* em LTSP nos indivíduos NG e DM2 pré e pós-tratamento

Total	**Genes ($2^{\Delta ct}$)**	**NG (99)**	**DM2 Basal (100)**	***p*[1]**	**DM2 Pioglitazona (100)**	***p*[2]**
	RANK	0,0016 (0,0006-0,0033)	0,0017 (0,0007-0,0030)	0,723	0,0017 (0,0008-0,0045)	0,163
	RANKL	0,0021 (0,0009-0,0045)	0,0023 (0,0010-0,0059)	0,256	0,0028 (0,0011-0,0075)	0,393
	OPG	0,0223 (0,0092-0,0656)	0,0138 (0,0041-0,0319)	**0,006**	0,0192 (0,0081-0,0658)	**0,027**
	PPARG	0,0006 (0,0003-0,0017)	0,0008 (0,0004-0,0015)	0,130	0,0010 (0,0004-0,0017)	0,911
	IL6	0,0014 (0,0004-0,0034)	0,0013 (0,0006-0,0079)	0,184	0,0013 (0,0006-0,0103)	0,179
	TNFA	0,0547 (0,0249-0,1400)	0,0485 (0,0284-0,0984)	0,537	0,0447 (0,0268-0,1089)	0,581
	VDR	0,0221 (0,0113-0,0586)	0,0803 (0,0173-0,1729)	**0,001**	0,0870 (0,0118-0,1591)	0,577
Gênero Feminino	**Genes ($2^{\Delta ct}$)**	**NG (51)**	**DM2 Basal (44)**	***p*[1]**	**DM2 Pioglitazona (44)**	***p*[2]**
	RANK	0,0011 (0,0006-0,0034)	0,00201 (0,0009-0,0030)	0,134	0,0019 (0,0010-0,0050)	0,525
	RANKL	0,0016 (0,0007-0,0027)	0,0036 (0,0012-0,0061)	**0,007**	0,0045 (0,0013-0,0089)	0,414
	OPG	0,0247 (0,0092-0,0613	0,0149 (0,0047-0,0328)	0,060	0,0283 (0,0113-0,0771)	0,073
	PPARG	0,0006 (0,0002-0,0021)	0,0006 (0,0003-0,0012)	0,820	0,0007 (0,0003-0,0020)	0,795
	IL6	0,0006 (0,0004-0,0028)	0,0021 (0,0007-0,0109)	**0,004**	0,0042 (0,0008-0,0203)	0,110
	TNFA	0,0522 (0,0249-0,1763)	0,0479 (0,0293-0,0786)	0,457	0,0481 (0,0256-0,1163)	0,120
	VDR	0,0443 (0,0116-0,0613)	0,0891 (0,0163-0,1651)	**0,002**	0,0991 (0,0208-0,1636)	0,436
Gênero Masculino	**Genes ($2^{\Delta ct}$)**	**NG (48)**	**DM2 Basal (56)**	***p*[1]**	**DM2 Pioglitazona (56)**	***p*[2]**
	RANK	0,0018 (0,0008-0,0033)	0,0013 (0,0006-0,0029)	0,334	0,0015 (0,0006-0,0035)	0,189
	RANKL	0,0033 (0,0012-0,0061)	0,0020 (0,0010-0,0051)	0,316	0,0021 (0,0011-0,0063)	0,612
	OPG	0,0207 (0,0087-0,0669)	0,0132 (0,0041-0,0309)	**0,048**	0,0176 (0,0057-0,0644)	0,155
	PPARG	0,0006 (0,0004-0,0015)	0,0010 (0,0006-0,0017)	**0,032**	0,0011 (0,0006-0,0017)	0,993
	IL6	0,0024 (0,0008-0,0036)	0,0010 (0,0005-0,0067)	0,309	0,0007 (0,0005-0,0037)	0,770
	TNFA	0,0618 (0,0212-0,1217)	0,0485 (0,0259-0,1108)	0,943	0,0412 (0,0274-0,1001)	0,490
	VDR	0,0182 (0,0111-0,0393)	0,0615 (0,0178-0,1743)	**0,001**	0,0819 (0,0098-0,1559)	0,984

Legenda: Número de indivíduos está entre parênteses. NG: normoglicêmicos; DM2: diabetes tipo 2. A expressão do mRNA de cada gene foi medida pela PCRq e normalizada com o controle endógeno ($2^{\Delta ct}$). Os resultados estão apresentados como mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%), quando comparados por *Mann-Whitney* (NG x DM2 basal; p^1) e *Wilcoxon Signed Rank Test* (DM2 basal x Pioglitazona; p^2).

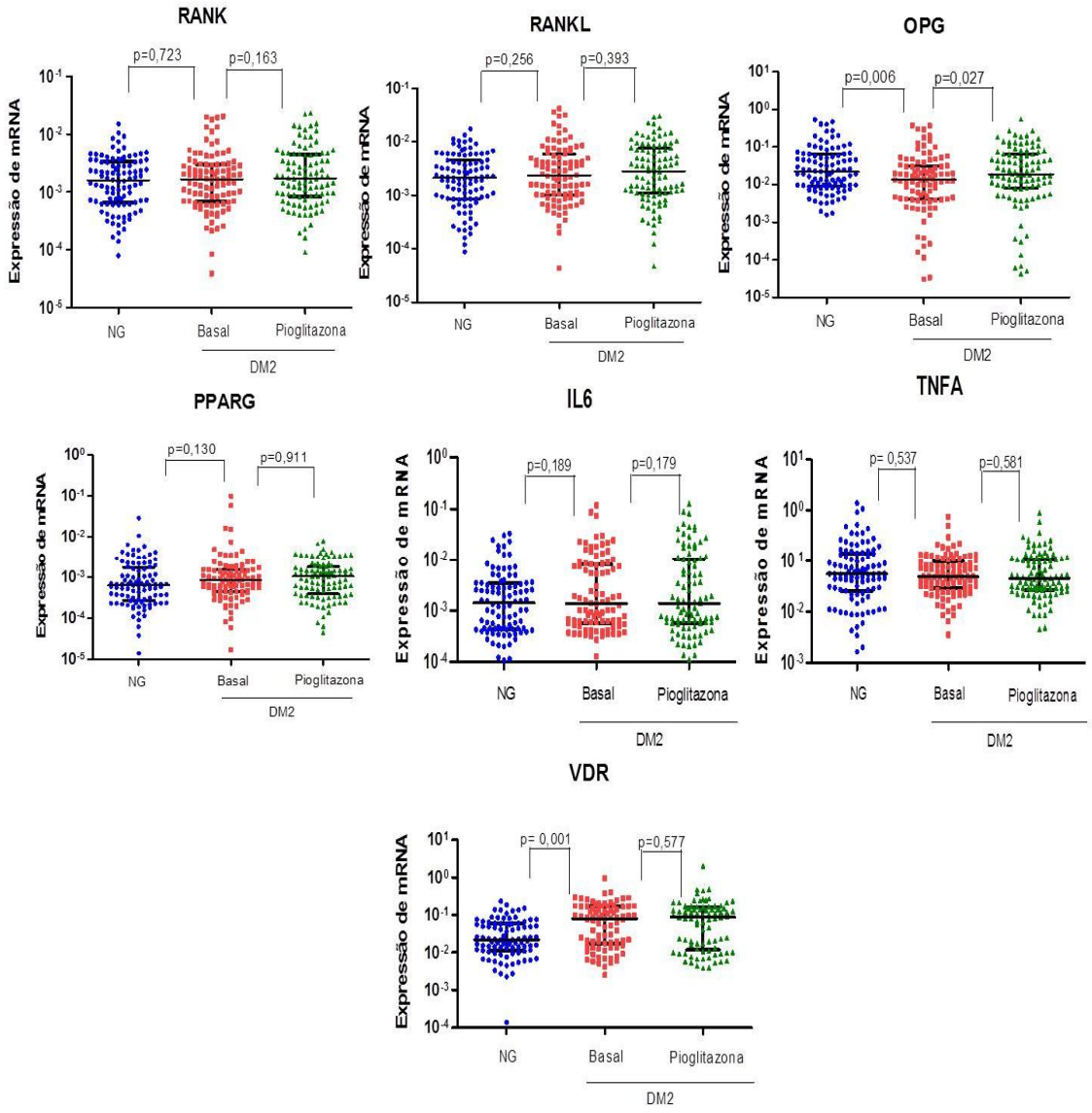


Figura 5. **Expressão do mRNA de *RANK, RANKL, OPG, PPARG, IL6, TNFA* e *VDR* em LTSP nos indivíduos NG e DM2.** Nos pacientes DM2, a expressão do mRNA foi avaliada antes (basal) e depois de 16 semanas de tratamento com pioglitazona (15/30/45/45mg/dia/4 semanas). Valores apresentados como mediana e intervalos interquartílicos através do gráfico Scatter plot e comparados pelo teste *Mann-Whitney* e *Wilcoxon signed rank test*. P <0,05.

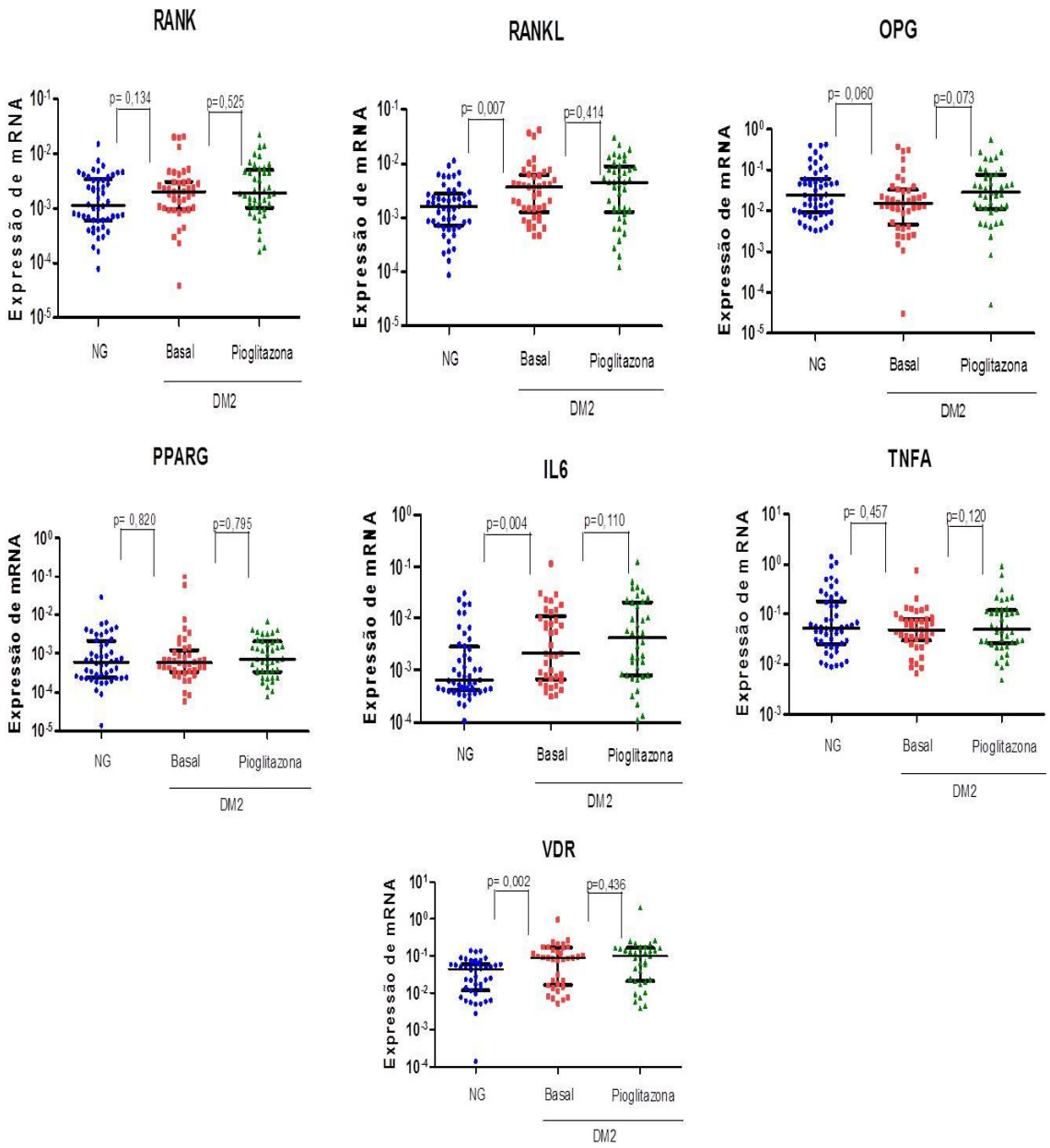


Figura 6. **Expressão do mRNA de *RANK, RANKL, OPG, PPARG, IL6, TNFA* e *VDR* em LTSP nos indivíduos NG e DM2 no gênero feminino.** Nos pacientes DM2, a expressão do mRNA foi analisada antes (basal) e depois de 16 semanas de tratamento com pioglitazona (15/30/45/45mg/dia/4semanas). Os dados estão apresentados como mediana e intervalos interquartílicos através do gráfico Scatter plot e comparados pelo teste *Mann-Whitney* e *Wilcoxon signed rank test*. P <0,05.

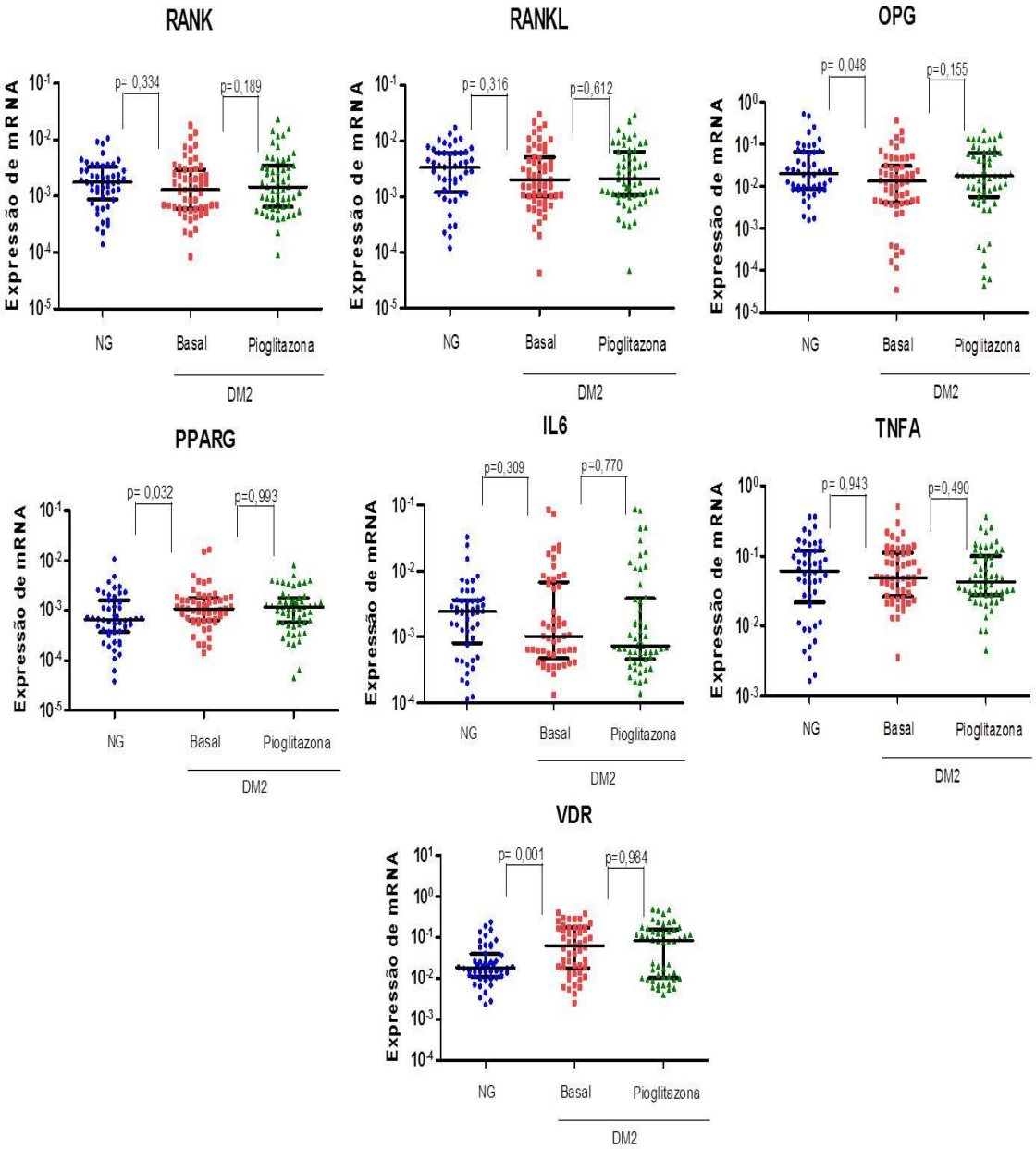


Figura 7. **Expressão do mRNA de *RANK, RANKL, OPG, PPARG, IL6, TNFA* e *VDR* em LTSP nos indivíduos NG e DM2 no gênero masculino.** Nos pacientes DM2, a expressão do mRNA foi analisada antes (basal) e depois de 16 semanas de tratamento com pioglitazona (15/30/45/45mg/dia/4semanas). Os dados estão apresentados como mediana e intervalos interquartílicos através do gráfico Scatter plot e comparados pelo teste *Mann-Whitney* e *Wilcoxon signed rank test*. P <0,05.

Com o objetivo de identificar marcadores precoces de alterações no metabolismo ósseo, realizou-se a análise de regressão linear múltipla (**Tabela 9**). No modelo para os marcadores ósseos basais (antes do tratamento), o aumento de 1 mmol/L de glicemia de jejum no basal contribuiu com a diminuição de 0,25 mmol/L de cálcio ionizado, além disso, o aumento da expressão do mRNA de *OPG* e de *TNFA* contribuiu com o aumento de 0,03 mmol/L de cálcio ionizado e de 11,38 U/L de bALP respectivamente e o aumento da expressão do mRNA de *IL6* e de *VDR* contribuiu com a diminuição de 0,05 mmol/L de cálcio ionizado e de 20,14 U/L de bALP respectivamente. O modelo para o tratamento com pioglitazona prevê que o aumento de 1 mmol/L de glicemia de jejum no basal contribuiu com o aumento de 36,37% de cálcio ionizado em resposta ao tratamento. Além disso, cada unidade de aumento do mRNA de *OPG*, *TNFA* e *IL6* no basal contribuíram com a redução de 8,75% e aumento de 16,62% e 13,41% de tALP respectivamente em resposta ao tratamento. Neste mesmo modelo, cada unidade de aumento do mRNA de *TNFA* e *VDR* contribuiu com redução de 134,14% de tACP e 52,09% de osteocalcina respectivamente em resposta ao tratamento. O aumento do mRNA de *VDR* também contribuiu com o aumento de 33,58% de bALP em resposta ao tratamento. Nos dois modelos, a expressão de *RANK* não foi inclusa como variável dependente, devido a sua correlação positiva com *RANKL* antes e depois do tratamento (**Figura 8**).

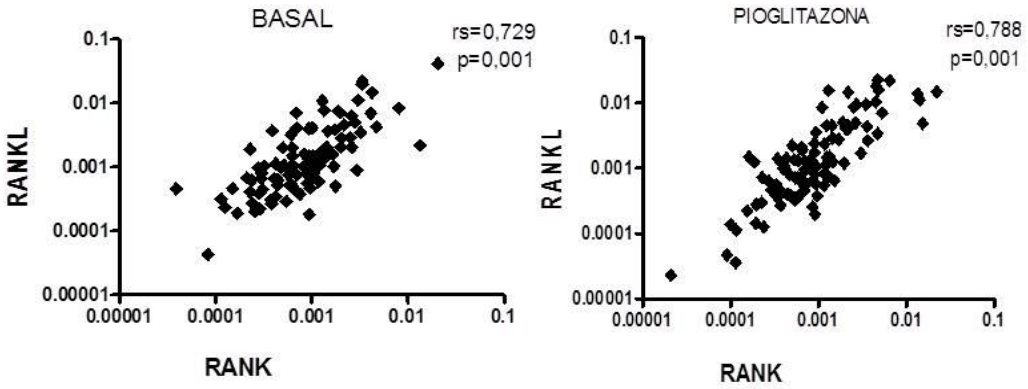


Figura 8. Análise de correlação entre a expressão do mRNA de RANKL e de RANK basal e após o tratamento com pioglitazona em LTSP. A significância da correlação foi calculada por coeficiente de correlação de Spearman (rs).

Tabela 9. Regressão Linear Múltipla: relação entre a expressão basal de mRNA e os marcadores do metabolismo ósseo antes e em resposta ao tratamento com pioglitazona.

	Variáveis (basal)							
Modelos e Variáveis	Glicose (mmol/L)	Insulina (nmol/L)	*RANKL* mRNA	*OPG* mRNA	*PPARG* mRNA	*TNFA* mRNA	*IL6* mRNA	*VDR* mRNA
	B (EP)	B (EP)	B (EP)	B (EP)	B (EP)	B (EP)	B (EP)	B (EP)
Modelo para os valores basais								
OC	-14,19 (12,55)	3,50 (4,04)	-1,00 (2,43)	2,00 (1,35)	-1,69 (2,43)	-5,01 (3,08)	-0,11 (2,16)	2,15 (3,12)
Cálcio Ionizado	**-0,25 (0,13)***	-0,04 (0,04)	-0,009 (0,02)	**0,03 (0,01)***	-0,01 (0,02)	-0,03 (-1,12)	**-0,05 (0,02)***	0,03 (0,03)
tACP	0,30 (2,12)	0,80 (0,67)	0,11 (0,40)	0,18 (0,23)	-0,50 (0,40)	0,48 (0,52)	-0,31 (0,36)	-0,20 (0,53)
tALP	-27,07 (32,83)	1,51 (10,33)	-4,48 (6,06)	5,99 (3,52)	-6,65 (6,18)	-13,81 (7,80)	0,84 (5,58)	1,35 (7,88)
bALP	17,63 (18,84)	-5,50 (6,15)	-6,85 (3,79)	0,16 (2,06)	3,49 (3,72)	**11,38 (4,57)***	-0,16 (3,40)	**-20,14 (4,61)***
25 (OH) VD	26,26 (15,06)	6,01 (4,81)	-0,88 (2,82)	1,16 (1,62)	0,91 (3,19)	-3,04 (4,17)	-0,49 (2,70)	1,36 (3,80)
Modelo para o tratamento								
OC	-27,95 (113,3)	-54,11 (36,04)	-13,39 (21,05)	-5,83 (11,53)	24,31 (22,55)	17,36 (26,52)	-13,77 (19,31)	**-52,09 (26,62)***
Cálcio Ionizado	**36,37 (13,73)***	4,11 (4,54)	0,97 (2,58)	-1,25 (1,51)	0,44 (2,47)	2,06 (3,39)	0,93 (2,39)	-1,10 (3,35)
tACP	-216,68 (261,94)	14,82 (86,91)	-30,59 (49,88)	3,01 (29,98)	40,68 (52,96)	**-134, 14 (64,79)***	41,36 (45,30)	36,72 (67,11)
tALP	33,80 (35,30)	13,62 (11,36)	-0,91 (6,63)	**-8,75 (3,87)***	-4,64 (6,92)	**16,62 (8,53)***	**13,41 (6,12)***	-12,54 (8,71)
bALP	-30,96 (59,73)	26,77 (19,31)	11,45 (12,58)	-2,05 (6,28)	1,29 (11,17)	-23,26 (15,07)	-10,02 (10,09)	**33,58 (13,83)***
25 (OH) VD	-73,54 (64,28)	-30,92 (19,38)	1,31 (10,85)	4,55 (6,44)	-19,38 (12,44)	16,58 (17,50)	-3,65 (10,68)	18,75 (15,54)

Legenda: Modelos ajustados para idade, gênero, hipertensão, IMC e TNF-α sérico. Para os valores no modelo basal, os coeficientes de regressão foram expressos em ng/mL, para OC, mmol/L, para cálcio ionizado, U/L para tACP, tALP e bALP e pg/mL para 25(OH)VD. Para o modelo tratamento, os coeficientes de regressão foram expressos em % de variação para cada variável. B (EP), coeficiente de regressão (erro padrão); *p<0,05; OC: osteocalcina; tACP: fosfatase ácida total; tALP: fosfatase alcalina total; bALP: fosfatase alcalina óssea específica; 25(OH)VD: 25, hidróxi-vitamina D. As variáveis independentes foram logaritmicamente transformadas.

6.4 Associação dos Polimorfismos Genéticos com a Expressão Gênica em LTSP

A distribuição dos genótipos e a frequência relativa dos alelos para os polimorfismos *RANK* (rs1805034), *RANKL* (rs9525641), *OPG* (rs3102735 e rs2073618), *PPARG* (rs1801282 e rs2972162), *VDR* (rs11568820) e *ESRI* (rs9340799) nos grupos estudados estão apresentadas nas **Tabelas 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16** e **17**. Para o polimorfismo *OPG* (rs3102735), a frequência genotípica e alélica foi diferente entre os grupos estudados ($p<0,05$). Houve maior frequência do genótipo raro CC e do alelo C no grupo NG comparado ao grupo DM2 (OR: 0,51, 95% IC: 0,28-0,94) (**Tabela 12**). Para os demais polimorfismos estudados as frequências genotípicas e alélicas foram similares entre os grupos DM2 e NG e entre os gêneros. Os resultados da análise de Equilíbrio de Hardy-Weinberg indicaram que, para os polimorfismos estudados, o número de genótipos observados em ambos os grupos obedece à distribuição esperada para uma população em condições de equilíbrio. Portanto, a amostragem analisada é representativa da população, permitindo de forma confiável, a comparação das frequências gênicas entre os grupos avaliados.

Tabela 10. Distribuição dos Genótipos e Frequência dos Alelos para o polimorfismo *RANK* rs1805034 nos indivíduos DM2 e NG.

Grupos	SNP	Distribuição dos Genótipos			Frequência dos Alelos	
	RANK rs1805034	**CC**	**CT**	**TT**	**C**	**T**
DM2	Mulheres (44)	11,4% (5)	50,0% (22)	38,6% (17)	36,4% (32)	63,6% (56)
	Homens (56)	8,9% (5)	60,7% (34)	30,4% (17)	39,3% (44)	60,7% (68)
		χ^2= 0,752 (1*gl*)* p=0,385			χ^2= 0,178 (1*gl*)* p=0,672	
	OR	0,69 (95%IC: 0,30-1,59)				
NG	Mulheres (50)	14,0% (7)	52,0% (26)	34,0% (17)	40,0% (40)	60,0% (60)
	Homens (48)	16,6% (8)	41,7% (20)	41,7% (20)	37,5% (36)	62,5% (60)
		χ^2= 0,612 (1*gl*)* p=0,433			χ^2= 0,129 (1*gl*)* p=0,719	
	OR	1,38 (95%IC: 0,61-3,14)				
Total	DM2 (100)	10,0% (10)	56,0% (56)	34,0% (34)	38,0% (76)	62,0% (124)
	NG (98)	15,3% (15)	46,9% (46)	37,8% (37)	38,8% (76)	61,2% (120)
		χ^2= 0,303 (1*gl*)* p=0,581			χ^2= 0,025 (1*gl*)* p=0,873	
	OR	1,17 (95%IC: 0,65-2,10)				

Legenda: Número de indivíduos está entre parênteses; gl, graus de liberdade; * teste Qui-Quadrado; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança de 95%. Equilíbrio de Hardy-Weinberg: DM2: χ^2= 3,55 (1*gl*, p>0,05); NG: $\chi^{2=}$0,01 (1*gl*, p>0,05).

Tabela 11. Distribuição dos Genótipos e Frequência dos Alelos para o polimorfismo *RANKL* rs9525641 nos indivíduos DM2 e NG.

Grupos	SNP	Distribuição dos Genótipos			Frequência dos Alelos	
	RANKL rs 9525641	**CC**	**CT**	**TT**	**C**	**T**
DM2	Mulheres (44)	15,9% (7)	52,3% (23)	31,8% (14)	42,0% (37)	58,0% (51)
	Homens (56)	26,8% (15)	41,1% (23)	32,1% (18)	47,3% (53)	52,7% (59)
		χ^2= 0,001 (1*gl*)* p=0,972			χ^2= 0,554 (1*gl*)* p=0,456	
	OR	1,01 (95%IC: 0,43-2,36)				
NG	Mulheres (50)	16,0% (8)	56,0% (28)	28,0% (14)	44,0% (44)	56,0% (56)
	Homens (48)	12,5% (6)	50,0% (24)	37,5% (18)	37,5% (36)	62,5% (60)
		χ^2= 1,005 (1*gl*)* p=0,316			χ^2= 0,856 (1*gl*)* p=0,354	
	OR	1,54 (95%IC: 0,65-3,06)				
Total	DM2 (100)	22,0% (22)	46,0% (46)	32,0% (32)	45,0% (90)	55,0% (110)
	NG (98)	14,3% (14)	53,1% (52)	32,6% (32)	40,8% (80)	59,2% (116)
		χ^2= 0,009 (1*gl*)* p=0,921			χ^2= 0,707 (1*gl*)* p=0,400	
	OR	1,03 (95%IC: 0,56-1,86)				

Legenda: Número de indivíduos está entre parênteses; gl, graus de liberdade; * teste Qui-Quadrado; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança de 95%. Equilíbrio de Hardy-Weinberg: DM2: χ^2= 0,5 (1*gl*, p>0,05); NG: $\chi^{2=}$0,95 (1*gl*, p>0,05).

Tabela 12. Distribuição dos Genótipos e Frequência dos Alelos para o polimorfismo *OPG* rs3102735 nos indivíduos DM2 e NG.

Grupos	SNP	Distribuição dos Genótipos			Frequência dos Alelos	
	OPG rs3102735	**CC**	**CT**	**TT**	**C**	**T**
DM2	Mulheres (44)	0% (0)	34,1% (15)	65,9% (29)	17,0% (15)	83,0% (73)
	Homens (56)	0% (0)	19,6% (11)	80,4% (45)	9,8% (11)	90,2% (101)
		χ^2= 2,673 (1*gl*)* p=0,102			χ^2= 2,274 (1*gl*)* p=0,131	
	OR	2,11 (95%IC: 0,85-5,24)				
NG	Mulheres (48)	2,1% (1)	47,9% (23)	50,% (24)	26,0% (25)	74,0% (71)
	Homens (48)	4,2% (2)	27,1% (13)	68,7% (33)	17,7% (17)	82,3% (79)
		χ^2= 3,498 (1*gl*)* p=0,061			χ^2= 1,950 (1*gl*)* p=0,162	
	OR	2,20 (95%IC: 0,95-5,05)				
Total	DM2 (100)	0% (0)	26,0% (26)	74,0% (74)	13,0% (26)	87,0% (174)
	NG (96)	3,1% (3)	37,5% (36)	59,4% (57)	21,9% (42)	78,1% (150)
		χ^2= 4,726 (1*gl*)* **p=0,029**			χ^2= 5,381 (1*gl*)* **p=0,020**	
	OR	0,51 (95%IC: 0,28-0,94)				

Legenda: Número de indivíduos está entre parênteses; gl, graus de liberdade; * teste Qui-Quadrado; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança de 95%. Equilíbrio de Hardy-Weinberg: DM2: χ^2= 2,23 (1*gl*, p>0,05); NG: $\chi^{2=}$0,91 (1*gl*, p>0,05).

Tabela 13. Distribuição dos Genótipos e Frequência dos Alelos para o polimorfismo *OPG* rs2073618 nos indivíduos DM2 e NG.

Grupos	SNP	Distribuição dos Genótipos			Frequência dos Alelos	
	OPG rs2073618	**CC**	**CG**	**GG**	**C**	**G**
DM2	Mulheres (44)	36,4% (16)	43,2% (19)	20,4% (9)	57,9% (51)	42,1% (37)
	Homens (56)	44,6% (25)	39,3% (22)	16,1% (9)	64,3% (72)	35,7% (40)
		χ^2= 0,698 (1*gl*)* p=0,403			χ^2= 0,834 (1*gl*)* p=0,361	
	OR	1,41 (95%IC: 0,62-3,17)				
NG	Mulheres (49)	30,0% (16)	40,0% (24)	30,0% (9)	57,1% (56)	42,9% (42)
	Homens (48)	39,1% (13)	41,3% (26)	19,6% (9)	54,2% (52)	45,8% (44)
		χ^2= 0,358 (1*gl*)* p=0,549			χ^2= 0,174 (1*gl*)* p=0,676	
	OR	0,76 (95%IC: 0,32-1,83)				
Total	DM2 (100)	41,0% (41)	41,0% (41)	18,0% (18)	61,5% (123)	38,5% (77)
	NG (97)	30,0% (29)	51,5% (50)	18,5% (18)	55,7% (108)	44,3% (86)
		χ^2= 2,650 (1*gl*)* p=0,103			χ^2= 1,380 (1*gl*)* p=0,240	
	OR	0,61 (95%IC: 0,34-1,10)				

Legenda: Número de indivíduos em parênteses; gl, graus de liberdade; * teste Qui-Quadrado; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança de 95%. Equilíbrio de Hardy-Weinberg: DM2: χ^2= 1,18 (1*gl*, p>0,05); NG: $\chi^{2=}$0,19 (1*gl*, p>0,05).

Tabela 14. Distribuição dos Genótipos e Frequência dos Alelos para o polimorfismo *PPARG* rs1801282 nos indivíduos DM2 e NG.

Grupos	SNP	Distribuição de genótipos			Frequência de Alelos	
	PPARG rs1801282	**CC**	**CG**	**GG**	**C**	**G**
DM2	Mulheres (44)	88,6% (39)	11,4% (5)	0% (0)	94,3% (83)	5,7% (5)
	Homens (56)	85,7% (48)	12,5% (7)	1,8% (1)	92,0% (103)	8,0% (9)
		χ^2= 0,186 (1*gl*)* p=0,666			χ^2= 0,419 (1*gl*)* p=0,517	
	OR	0,77 (95%IC: 0,23-2,54)				
NG	Mulheres (50)	92,0% (46)	8,0% (4)	0% (0)	96,0% (96)	4,0% (4)
	Homens (48)	83,3% (40)	14,6% (7)	2,1% (1)	90,6% (87)	9,4% (9)
		χ^2= 1,712 (1*gl*)* p=0,190			χ^2= 2,285 (1*gl*)* p=0,130	
	OR	0,43 (95%IC: 0,12-1,55)				
Total	DM2 (100)	87,0% (87)	12,0% (12)	1,0% (1)	93,0% (186)	7,0% (14)
	NG (98)	87,7% (86)	11,3% (11)	1,0% (1)	93,4% (183)	6,6% (13)
		χ^2= 0,025 (1*gl*)* p=0,872			χ^2= 0,021 (1*gl*)* p=0,884	
	OR	1,07 (95%IC: 0,46-2,47)				

Legenda: Número de indivíduos em parênteses; gl, graus de liberdade; * teste Qui-Quadrado; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança de 95%. Equilíbrio de Hardy-Weinberg: DM2: χ^2= 0,61 (1*gl*, p>0,05); NG: $\chi^{2=}$0,86 (1*gl*, p>0,05).

Tabela 15. Distribuição dos Genótipos e Frequência dos Alelos para o polimorfismo *PPARG* rs2972162 nos indivíduos DM2 e NG.

Grupos	SNP	Distribuição dos Genótipos			Frequência dos Alelos	
	PPARG rs2972162	**CC**	**CT**	**TT**	**C**	**T**
DM2	Mulheres (44)	34,1% (15)	40,9% (18)	25,0% (11)	54,5% (48)	45,5% (40)
	Homens (56)	30,3% (17)	41,1% (23)	28,6% (16)	50,9% (57)	49,1% (55)
		χ^2= 0,157 (1*gl*)* p=0,691			χ^2= 0,263 (1*gl*)* p=0,607	
	OR	1,18 (95%IC: 0,50-2,76)				
NG	Mulheres (50)	30,0% (16)	40,0% (19)	30,0% (15)	51,0% (51)	49,0% (49)
	Homens (46)	41,3% (19)	39,1% (18)	19,6% (9)	60,9% (56)	39,1% (36)
		χ^2= 0,895 (1*gl*)* p=0,340			χ^2= 1,892 (1*gl*)* p=0,169	
	OR	1,49 (95%IC: 0,64-3,44)				
Total	DM2 (100)	32,0% (32)	41,0% (41)	27,0% (27)	52,5% (105)	47,5% (95)
	NG (96)	36,5% (35)	38,5% (37)	25,0% (24)	55,7% (107)	44,3% (85)
		χ^2= 0,432 (1*gl*)* p=0,510			χ^2= 0,411 (1*gl*)* p=0,521	
	OR	1,21 (95%IC: 0,67-2,20)				

Legenda: Número de indivíduos em parênteses; gl, graus de liberdade; * teste Qui-Quadrado; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança de 95%. Equilíbrio de Hardy-Weinberg: DM2: χ^2= 3,17 (1*gl*, p>0,05); NG: $\chi^{2=}$3,12 (1*gl*, p>0,05).

Tabela 16. Distribuição dos Genótipos e Frequência dos Alelos para o polimorfismo *VDR* rs11568820 nos indivíduos DM2 e NG.

Grupos	SNP	Distribuição dos Genótipos			Frequência dos Alelos	
	VDR rs11568820	**AA**	**AG**	**GG**	**A**	**G**
DM2	Mulheres (44)	6,8% (3)	59,1% (26)	34,1% (15)	36,4% (32)	63,6% (56)
	Homens (56)	12,5% (7)	48,2% (27)	39,3% (22)	36,6% (41)	63,4% (71)
		χ^2= 0,285 (1*gl*)* p=0,593			χ^2= 0,001 (1*gl*)* p=0,971	
	OR	1,25 (95%IC: 0,54-2,84)				
NG	Mulheres (49)	14,3% (7)	34,7% (17)	51,0% (25)	31,6% (31)	68,4% (67)
	Homens (48)	18,7% (9)	39,6% (19)	41,7% (20)	38,5% (37)	61,5% (59)
		χ^2= 0,853 (1*gl*)* p=0,355			χ^2= 1,017 (1*gl*)* p=0,313	
	OR	0,68 (95%IC: 0,30-1,52)				
Total	DM2 (100)	10,0% (10)	53,0% (53)	37,0% (37)	36,5% (73)	63,5% (127)
	NG (97)	16,5% (16)	37,1% (36)	46,4% (45)	35,1% (68)	64,9% (126)
		χ^2= 1,787 (1*gl*)* p=0,181			χ^2= 0,089 (1*gl*)* p=0,764	
	OR	1,47 (95%IC: 0,83-2,60)				

Legenda: Número de indivíduos em parênteses; gl, graus de liberdade; * teste Qui-Quadrado; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança de 95%. Equilíbrio de Hardy-Weinberg: DM2: χ^2= 2,05 (1*gl*, p>0,05); NG: $\chi^{2=}$3,32 (1*gl*, p>0,05).

Tabela 17. Distribuição dos Genótipos e Frequência dos Alelos para o polimorfismo *ESRI* rs9340799 nos indivíduos DM2 e NG.

Grupos	SNP	Distribuição dos Genótipos			Frequência dos Alelos	
	ESRI rs9340799	**AA**	**AG**	**GG**	**A**	**G**
DM2	Mulheres (44)	50,0% (22)	34,1% (15)	15,9% (7)	67,0% (59)	33,0% (29)
	Homens (53)	50,9% (27)	35,8% (19)	13,3% (7)	70,7% (73)	29,3% (33)
		χ^2= 0,008(1*gl*)* p=0,926			χ^2= 0,073 (1*gl*)* p=0,768	
	OR	1,03 (95%IC: 0,46-2,31)				
NG	Mulheres (47)	38,3% (18)	44,7% (21)	17,0% (8)	60,6% (57)	39,4% (37)
	Homens (47)	40,4% (19)	48,9% (23)	10,7% (5)	64,9% (61)	35,1% (33)
		χ^2= 0,044 (1*gl*)* p=0,832			χ^2= 0,364 (1*gl*)* p=0,546	
	OR	1,09 (95%IC: 0,47-2,50)				
Total	DM2 (97)	50,5% (49)	35,0% (34)	14,5% (14)	68,1% (132)	31,9% (62)
	NG (94)	39,4% (37)	46,8% (44)	13,8% (13)	62,8% (118)	37,2% (70)
		χ^2= 2,39 (1*gl*)* p=0,121			χ^2= 1,175 (1*gl*)* p=0,278	
	OR	0,63 (95%IC: 0,35-1,12)				

Legenda: Número de indivíduos em parênteses; gl, graus de liberdade; * teste Qui-Quadrado; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confiança de 95%. Equilíbrio de Hardy-Weinberg: DM2: χ^2= 3,65 (1*gl*, p>0,05); NG: $\chi^{2=}$0,01 (1*gl*, p>0,05).

As expressões do mRNA dos genes *RANK*, *RANKL*, *OPG*, *PPARG* e *VDR* em LTSP, nos grupos NG e DM2 antes e após o tratamento com pioglitazona em relação aos genótipos estão representados nas **Tabelas 18**, **19**, **20**, **21**, **22**, **23** e **24**. Para o polimorfismo *RANK* rs1805034, os indivíduos portadores do genótipo CC+CT apresentaram diminuição da expressão de *RANK* em comparação aos portadores do genótipo TT, no grupo DM2 basal (p=0,027) (**Tabela 18**). Para o polimorfismo *RANKL* rs9525641, os indivíduos portadores do genótipo CC apresentaram aumento da expressão de *RANKL* em comparação aos portadores do genótipo CT e TT, no grupo NG (p=0,042) e diminuição da expressão de *RANKL* no grupo DM2 basal em comparação ao grupo NG (p=0,033) (**Tabela 19**). Para o polimorfismo *OPG* rs3102735, no grupo DM2 basal, os indivíduos portadores do genótipo CC+CT e TT apresentaram diminuição na expressão de *OPG* em relação ao grupo NG (p<0,05) (**Tabela 20**). Para o polimorfismo *OPG* rs2073618, os indivíduos portadores do genótipo CG apresentaram diminuição na expressão de *OPG* no grupo DM2 em relação ao grupo NG (p=0,013). Após o tratamento com pioglitazona, houve aumento na expressão de *OPG* nos indivíduos portadores do genótipo CG (p=0,036) (**Tabela 21**). Para os demais polimorfismos, não foram encontradas diferenças nas expressões dos genes no grupo NG e DM2 antes e após o tratamento de acordo com os diferentes genótipos (p>0,05) (**Tabelas 22**, **23** e **24**).

Tabela 18. Efeito do polimorfismo *RANK* rs1805034 sobre a expressão gênica de *RANK* em LTSP nos indivíduos NG e DM2 (Basal) e após o tratamento com pioglitazona.

Genótipos	NG ($2^{\Delta Ct}$)	DM2 Basal ($2^{\Delta Ct}$)	*p1*	DM2 Pioglitazona ($2^{\Delta Ct}$)	*p2*
CC+CT	0,0009 (0,0004-0,0022)	0,0006 (0,0003-0,0012)	0,074	0,0008 (0,0003-0,0015)	0,194
TT	0,0014 (0,0006-0,0031)	0,0009 (0,0006-0,0019)	0,778	0,0009 (0,0006-0,0020)	0,632
p3	0,174	**0,027**		0,189	

Legenda: NG: normoglicêmicos; DM2: diabetes tipo 2. Número de indivíduos está entre parênteses. NG: CC+CT (61) e TT (37); DM2: CC+CT (66) e TT (34). A expressão do mRNA de cada gene foi medida pela PCRq e normalizada com o controle endógeno. Os resultados estão apresentados como mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%), quando comparados por *Mann-Whitney* (NG x DM2 basal; p^1), *Wilcoxon Signed Rank Test* (DM2 basal x Pioglitazona; p^2) e *Mann-Whitney* (CC+CT x TT; p^3). Portadores do alelo raro (C) foram agrupados para as análises estatísticas.

Tabela 19. Efeito do polimorfismo *RANKL* rs9525641 sobre a expressão gênica de *RANKL* em LTSP nos indivíduos NG e DM2 (Basal) e após o tratamento com pioglitazona.

Genótipos	NG ($2^{\Delta Ct}$)	DM2 Basal ($2^{\Delta Ct}$)	*p1*	DM2 Pioglitazona ($2^{\Delta Ct}$)	*p2*
CC	0,0035 (0,0010-0,0069)[a]	0,0011 (0,0005-0,0024)	**0,033**	0,0009 (0,0006-0,0019)	0,990
CT	0,0013 (0,0006-0,0023)[b]	0,0010 (0,0006-0,0024)	0,754	0,0014 (0,0006-0,0040)	0,667
TT	0,0019 (0,0006-0,0033)[b]	0,0015 (0,0005-0,0039)	0,835	0,0011 (0,0004-0,0047)	0,973
p3	**0,042**	0,825		0,867	

Legenda: NG: normoglicêmicos; DM2: diabetes tipo 2. Número de indivíduos está entre parênteses. NG: CC (14), CT (52) e TT (32); DM2: CC (22), CT (46) e TT (32). A expressão do mRNA de cada gene foi medida pela PCRq e normalizada com o controle endógeno. Os resultados estão apresentados como mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%), quando comparados por *Mann-Whitney* (NG x DM2 basal; p^1), *Wilcoxon Signed Rank Test* (DM2 basal x Pioglitazona; p^2) e *Kruskal-Wallis* (CC x CT x TT; p^3). a,b letras diferentes apontam medianas significativamente diferentes (Teste de Dunn).

Tabela 20. Efeito do polimorfismo *OPG* rs3102735 sobre a expressão gênica de *OPG* em LTSP nos indivíduos NG e DM2 (Basal) e após o tratamento com pioglitazona.

Genótipos	NG ($2^{\Delta Ct}$)	DM2 Basal ($2^{\Delta Ct}$)	*p1*	DM2 Pioglitazona ($2^{\Delta Ct}$)	*p2*
CC+CT	0,0223 (0,0084-0,0520)	0,0115 (0,0035-0,0231)	**0,032**	0,0121 (0,0070-0,0407)	0,502
TT	0,0147 (0,0082-0,0455)	0,0084 (0,0032-0,0279)	**0,007**	0,0113 (0,0038-0,0357)	0,380
p3	0,293	0,433		0,448	

Legenda: NG: normoglicêmicos; DM2: diabetes tipo 2. Número de indivíduos está entre parênteses. NG: CC+CT (39) e TT (57); DM2: CC+CT (26) e TT (74). A expressão do mRNA de cada gene foi medida pela PCRq e normalizada com o controle endógeno. Os resultados estão apresentados como mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%), quando comparados por *Mann-Whitney* (NG x DM2 basal; p^1), *Wilcoxon Signed Rank Test* (DM2 basal x Pioglitazona; p^2) e *Mann-Whitney* (CC+CT x TT; p^3). Portadores do alelo raro (C) foram agrupados para as análises estatísticas.

Tabela 21. Efeito do polimorfismo *OPG* rs2073618 sobre a expressão gênica de *OPG* em LTSP nos indivíduos NG e DM2 (Basal) e após o tratamento com pioglitazona.

Genótipos	NG ($2^{\Delta Ct}$)	DM2 Basal ($2^{\Delta Ct}$)	*p1*	DM2 Pioglitazona ($2^{\Delta Ct}$)	*p2*
CC	0,0205 (0,0078-0,0461)	0,0089 (0,0032-0,0251)	0,081	0,0098 (0,0038-0,0218)	0,735
CG	0,0193 (0,0096-0,0461)	0,0094 (0,0040-0,0195)	**0,013**	0,0149 (0,0049-0,0402)	**0,036**
GG	0,0095 (0,0041-0,0527)	0,0089 (0,0007-0,0299)	0,116	0,0110 (0,0062-0,0580)	0,205
p3	0,390	0,671		0,469	

Legenda: NG: normoglicêmicos; DM2: diabetes tipo 2. Número de indivíduos está entre parênteses. NG: CC (29), CG (50) e GG (18); DM2: CC (41), CG (41) e GG (18). A expressão do mRNA de cada gene foi medida pela PCRq e normalizada com o controle endógeno. Os resultados estão apresentados como mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%), quando comparados por *Mann-Whitney* (NG x DM2 basal; p^1), *Wilcoxon Signed Rank Test* (DM2 basal x Pioglitazona; p^2) e *Kruskal-Wallis* (CC x CG x GG; p^3).

Tabela 22. Efeito do polimorfismo *PPARG* rs1801282 sobre a expressão gênica de *PPARG* em LTSP nos indivíduos NG e DM2 (Basal) e após o tratamento com pioglitazona.

Genótipos	NG ($2^{\Delta Ct}$)	DM2 Basal ($2^{\Delta Ct}$)	*p1*	DM2 Pioglitazona ($2^{\Delta Ct}$)	*p2*
CC	0,0005 (0,0002-0,0012)	0,0006 (0,0003-0,0011)	0,761	0,0006 (0,0002-0,0012)	0,695
CG+GG	0,0006 (0,0003-0,0022)	0,0006 (0,0004-0,0009)	0,723	0,0004 (0,0002-0,0008)	0,587
p3	0,498	0,923		0,350	

Legenda: NG: normoglicêmicos; DM2: diabetes tipo 2. Número de indivíduos está entre parênteses. NG: CC (86) e CG+GG (12); DM2: CC (87) e CG+GG (13). A expressão do mRNA de cada gene foi medida pela PCRq e normalizada com o controle endógeno. Os resultados estão apresentados como mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%), quando comparados por *Mann-Whitney* (NG x DM2 basal; p^1), *Wilcoxon Signed Rank Test* (DM2 basal x Pioglitazona; p^2) e *Mann-Whitney* (CC x CG+GG; p^3). Os portadores do alelo raro (G) foram agrupados para as análises estatísticas.

Tabela 23. Efeito do polimorfismo *PPARG* rs2972162 sobre a expressão gênica de *PPARG* em LTSP nos indivíduos NG e DM2 (Basal) e após o tratamento com pioglitazona.

Genótipos	NG ($2^{\Delta Ct}$)	DM2 Basal ($2^{\Delta Ct}$)	*p1*	DM2 Pioglitazona ($2^{\Delta Ct}$)	*p2*
CC	0,0006 (0,0003-0,0012)	0,0007 (0,0004-0,0013)	0,514	0,0007 (0,0002-0,0014)	0,446
CT	0,0006 (0,0002-0,0022)	0,0005 (0,0002-0,0008)	0,121	0,0005 (0,0002-0,0011)	0,152
TT	0,0004 (0,0002-0,0009)	0,0006 (0,0004-0,0014)	0,120	0,0008 (0,0004-0,0019)	0,772
p3	0,573	0,052		0,178	

Legenda: NG: normoglicêmicos; DM2: diabetes tipo 2. Número de indivíduos está entre parênteses. NG: CC (35), CT (37) e TT (24); DM2: CC (32), CT (41) e TT (27). A expressão do mRNA de cada gene foi medida pela PCRq e normalizada com o controle endógeno. Os resultados estão apresentados como mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%), quando comparados por *Mann-Whitney* (NG x DM2 basal; p^1), *Wilcoxon Signed Rank Test* (DM2 basal x Pioglitazona; p^2) e *Kruskall-Wallis* (CC x CT x TT; p^3).

Tabela 24. Efeito do polimorfismo *VDR* rs11568820 sobre a expressão gênica de *VDR* em LTSP nos indivíduos NG e DM2 (Basal) e após o tratamento com pioglitazona.

Genótipos	NG ($2^{\Delta Ct}$)	DM2 Basal ($2^{\Delta Ct}$)	*p1*	DM2 Pioglitazona ($2^{\Delta Ct}$)	*p2*
AA+AG	0,0204 (0,0116-0,0488)	0,0236 (0,0129-0,0918)	0,167	0,0263 (0,0093-0,1040)	0,379
GG	0,0183 (0,0092-0,0522)	0,0326 (0,0111-0,0729)	0,229	0,0217 (0,0097-0,0809)	0,886
p3	0,690	0,682		0,501	

Legenda: NG: normoglicêmicos; DM2: diabetes tipo 2. Número de indivíduos está entre parênteses. NG: AA+AG (52) e GG (45); DM2: AA+AG (63) e GG (37). A expressão do mRNA de cada gene foi medida pela PCRq e normalizada com o controle endógeno. Os resultados estão apresentados como mediana e intervalos interquartílicos (25%-75%), quando comparados por *Mann-Whitney* (NG x DM2 basal; p^1), *Wilcoxon Signed Rank Test* (DM2 basal x Pioglitazona; p^2) e *Mann-Whitney* (AA+AG x GG; p^3). Os portadores do alelo raro (A) foram agrupados para as análises estatísticas.

6.5 Associação dos Polimorfismos Genéticos com as Determinações Bioquímicas

Os valores das determinações bioquímicas dos grupos NG, DM2 basal e pós-tratamento de acordo com os genótipos dos polimorfismos *RANK* (rs1805034), *RANKL* (rs9525641), *OPG* (rs3102735) e *OPG* (rs2073618), *PPARG* (rs1801282), *PPARG* (rs2972162), *VDR* (rs11568820) e *ESRI* (rs9340799) estão apresentados nas **Tabelas 25**, **26**, **27**, **28**, **29**, **30**, **31** e **32**, respectivamente.

Para o polimorfismo *RANK* rs1805034, observou-se que os indivíduos portadores do genótipo CC+CT apresentaram aumento nas concentrações séricas de insulina em comparação aos portadores do genótipo TT no grupo NG (p=0,05). No grupo DM2, os indivíduos portadores do genótipo CC+CT apresentaram diminuição nas concentrações séricas de cálcio ionizado em resposta ao tratamento em comparação aos portadores do genótipo TT (p=0,033) (**Tabela 25**). Para o polimorfismo *RANKL* rs9525641, os indivíduos portadores do genótipo CT apresentaram redução nas concentrações de glicemia pós-prandial em resposta ao tratamento em relação aos portadores do genótipo TT (p=0,041, **Tabela 26**). Para o polimorfismo *OPG* rs3102735, constatou-se que os indivíduos portadores do genótipo CC+CT apresentaram aumento na atividade sérica de tALP no grupo DM2 antes do

tratamento e tALP e bALP após o tratamento com pioglitazona em comparação aos portadores do genótipo TT ($p<0,05$, **Tabela 27**).

Para o polimorfismo *PPARG* rs1801282, observou-se que os indivíduos portadores do genótipo CG+GG apresentaram menores concentrações séricas de glicemia pós-prandial, contudo a redução nas concentrações séricas em resposta ao tratamento foi maior nos portadores do genótipo CC no grupo DM2 ($p<0,05$). Além disso, os indivíduos portadores do genótipo CG+GG apresentaram aumento na atividade sérica de tACP em relação aos portadores do genótipo CC no grupo DM2 basal ($p=0,033$) (**Tabela 29**). Para o polimorfismo *PPARG* rs2972162, constatou-se que os indivíduos portadores do genótipo TT e CC apresentaram maior redução nas concentrações séricas de glicemia de jejum em comparação aos portadores do genótipo CT em resposta ao tratamento ($p=0,019$). Além disso, os portadores do genótipo CT e TT apresentaram menores concentrações séricas de insulina após o tratamento em comparação aos portadores do genótipo CC ($p=0,017$) (**Tabela 30**). Para o polimorfismo *ESRI* rs9340799, observou-se que os indivíduos portadores do genótipo AG+GG apresentaram maiores concentrações séricas de cálcio ionizado no grupo NG e DM2 basal e diminuição da atividade sérica de tALP no grupo DM2 basal em comparação aos portadores do genótipo AA ($p<0,05$, **Tabela 32**). Para os demais polimorfismos, não houve diferenças nos parâmetros bioquímicos no grupo NG e no grupo DM2 basal e pós-tratamento de acordo com os genótipos ($p>0,05$).

Tabela 25. Parâmetros Bioquímicos dos indivíduos NG e DM2 antes e após tratamento com pioglitazona de acordo com os genótipos do polimorfismo *RANK* rs1805034.

Parâmetros	CC + CT	TT	p (CC+CT *vs.* TT)
Glicemia de jejum (mmol/L)			
NG	5,2 ± 0,7	5,2 ± 0,6	0,756[a]
DM2 Basal	6,4 ± 0,9	6,5 ± 1,6	0,590[b]
DM2 Pós-tratamento	5,8 ± 1,2	5,7 ± 1,1	0,704[b]
DM2 Variação (%)	-8,8 ± 18,3	-8,6 ± 25,2	0,601[b]
Glicemia pós-prandial (mmol/L)			
NG	5,8 ± 1,6	5,7 ± 1,6	0,744[a]
DM2 Basal	10,5 ± 2,5	10,7 ± 3,5	0,764[a]
DM2 Pós-tratamento	7,9 ± 2,8	7,5 ± 2,0	0,860[b]
DM2 Variação (%)	-23,3 ± 25,9	-21,9 ± 34,3	0,848[b]
Insulina (nmol/L)			
NG	10,6 ± 6,4	8,6 ± 6,6	**0,050[b]**
DM2 Basal	14,5 ± 8,7	12,0 ± 7,7	0,149[b]
DM2 Pós-tratamento	11,1 ± 13,5	9,9 ± 7,5	0,855[b]
DM2 Variação (%)	-4,4 ± 101,5	-4,1 ± 119,4	0,568[b]
Cálcio Ionizado (mmol/L)			
NG	1,17 ± 0,10	1,15 ± 0,10	0,282[a]
DM2 Basal	1,16 ± 0,09	1,14 ± 0,10	0,301[a]
DM2 Pós-tratamento	1,14 ± 0,10	1,17 ± 0,08	0,190[a]
DM2 Variação (%)	-0,78 ± 9,0	3,4 ± 9,3	**0,033[a]**
tACP (U/L)			
NG	3,5 ± 2,0	3,4 ± 1,4	0,831[b]
DM2 Basal	3,1 ± 1,3	3,1 ± 1,5	0,915[a]
DM2 Pós-tratamento	3,7 ± 1,3	3,5 ± 1,7	0,366[b]
DM2 Variação (%)	24,4 ± 67,6	22,1 ± 70,6	0,654[b]
tALP (U/L)			
NG	77,8 ± 25,6	81,2 ± 29,0	0,943[b]
DM2 Basal	75,1 ± 24,4	77,2 ± 20,4	0,673[a]
DM2 Pós-tratamento	71,6 ± 21,1	69,3 ± 18,4	0,593[a]
DM2 Variação (%)	-0,6 ± 23,2	-7,7 ± 21,9	0,145[a]
bALP (U/L)			
NG	20,8 ± 17,9	15,4 ± 8,9	0,559[b]
DM2 Basal	21,8 ± 15,7	20,9 ± 15,1	0,673[b]
DM2 Pós-tratamento	11,7 ± 4,8	12,0 ± 7,3	0,808[b]
DM2 Variação (%)	-31,8 ± 30,0	-29,1 ± 45,4	0,828[b]

Parâmetros	CC + CT	TT	p (CC+CT *vs.* TT)
OC (ng/mL)			
NG	12,0 ± 5,6	11,3 ± 4,1	0,678[a]
DM2 Basal	11,0 ± 8,0	10,4 ± 7,3	0,439[b]
DM2 Pós-tratamento	13,2 ± 9,1	9,6 ± 3,7	0,076[b]
DM2 Variação (%)	26,0 ± 60,7	6,3 ± 52,3	0,103[b]
25(OH)VD (pg/mL)			
NG	26,1 ± 8,3	27,3 ± 11,6	0,786[b]
DM2 Basal	26,6 ± 8,3	30,2 ± 11,1	0,088[a]
DM2 Pós-tratamento	24,9 ± 8,4	24,2 ± 9,7	0,454[b]
DM2 Variação (%)	-2,0 ± 47,6	-5,7 ± 51,2	0,431[b]
IL-6 (pg/mL)			
NG	4,2 ± 3,2	5,9 ± 4,2	0,232[b]
DM2 Basal	7,0 ± 10,6	5,0 ± 3,6	0,401[b]
DM2 Pós-tratamento	6,2 ± 8,0	6,5 ± 8,1	0,953[b]
DM2 Variação (%)	-2,5 ± 87,9	24,8 ± 91,4	0,370[b]
TNF-α (pg/mL)			
NG	7,5 ± 5,2	7,3 ± 4,6	0,652[b]
DM2 Basal	6,6 ± 3,9	5,8 ± 3,4	0,286[b]
DM2 Pós-tratamento	10,1 ± 5,7	10,6 ± 8,0	0,861[b]
DM2 Variação (%)	38,1 ± 69,9	33,4 ± 89,3	0,502[a]

Legenda: Número de indivíduos está entre parênteses. NG: CC+CT (61) e TT (37); DM2: CC+CT (66) e TT (34). tACP: fosfatase ácida total; tALP: fosfatase alcalina total; bALP: fosfatase alcalina óssea específica; OC: osteocalcina; 25(OH)VD: 25, hidróxi-vitamina D. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por Teste-t de *Student*[(a)] e *Mann-Whitney*[(b)]. Variação (%): (Pós-Tratamento-Basal)/Basal x 100. Os portadores do alelo raro (C) foram agrupados para as análises estatísticas.

Tabela 26. Parâmetros Bioquímicos dos indivíduos NG e DM2 antes e após tratamento com pioglitazona de acordo com os genótipos do polimorfismo *RANKL* rs9525641.

Parâmetros	CC	CT	TT	p
Glicemia de jejum (mmol/L)				
NG	5,5 ± 0,7	5,1 ± 0,7	5,2 ± 0,7	0,183[a]
DM2 Basal	6,5 ± 1,2	6,6 ± 1,4	6,2 ± 0,9	0,589[b]
DM2 Pós-tratamento	6,0 ± 1,3	5,8 ± 1,0	5,6 ± 1,2	0,373[b]
DM2 Variação (%)	-7,6 ± 16,4	-9,4 ± 23,5	-8,6 ± 19,8	0,761[b]
Glicemia pós-prandial (mmol/L)				
NG	6,3 ± 1,5	5,5 ± 1,8	6,0 ± 1,3	0,197[a]
DM2 Basal	11,5 ± 3,5	10,6 ± 2,8	10,3 ± 2,7	0,289[a]
DM2 Pós-tratamento	8,4 ± 2,9	7,2 ± 2,5	8,3 ± 2,4	0,062[b]
DM2 Variação (%)	-18,8 ± 29,7[*,#]	-30,1 ± 26,3[*]	-15,1 ± 30,6[#]	**0,041[b]**
Insulina (nmol/L)				
NG	9,2 ± 4,8	8,9 ± 6,1	11,5 ± 7,5	0,223[b]
DM2 Basal	11,9 ± 8,2	13,5 ± 6,3	14,9 ± 10,2	0,339[b]
DM2 Pós-tratamento	8,9 ± 6,0	11,9 ± 16,0	10,2 ± 5,6	0,318[b]
DM2 Variação (%)	-7,2 ± 103,6	-2,1 ± 125,4	-6,5 ± 79,8	0,464[b]
Cálcio Ionizado (mmol/L)				
NG	1,16 ± 0,07	1,15 ± 0,10	1,17 ± 0,11	0,756[a]
DM2 Basal	1,16 ± 0,07	1,15 ± 0,11	1,15 ± 0,07	0,914[a]
DM2 Pós-tratamento	1,14 ± 0,10	1,15 ± 0,10	1,16 ± 0,07	0,586[b]
DM2 Variação (%)	-0,92 ± 8,9	0,98 ± 10,9	1,5 ± 6,6	0,647[a]
tACP (U/L)				
NG	3,1 ± 1,4	3,5 ± 1,9	3,6 ± 1,7	0,536[b]
DM2 Basal	2,6 ± 1,1	3,2 ± 1,4	3,2 ± 1,4	0,145[b]
DM2 Pós-tratamento	3,3 ± 1,4	3,9 ± 1,4	3,5 ± 1,8	0,176[b]
DM2 Variação (%)	38,9 ± 65,9	28,1 ± 75,5	3,3 ± 53,9	0,415[b]
tALP (U/L)				
NG	79,8 ± 31,8	78,0 ± 24,1	80,6 ± 29,6	0,803[b]
DM2 Basal	67,5 ± 19,9	75,5 ± 21,6	82,1 ± 25,8	0,072[a]
DM2 Pós-tratamento	63,8 ± 16,1	72,1 ± 20,1	74,0 ± 22,2	0,164[a]
DM2 Variação (%)	-1,7 ± 20,6	-1,7 ± 23,5	-6,1 ± 24,2	0,682[a]
bALP (U/L)				
NG	14,0 ± 7,4	19,6 ± 13,5	20,3 ± 21,0	0,443[b]
DM2 Basal	22,2 ± 16,6	21,0 ± 15,8	21,8 ± 14,4	0,966[b]
DM2 Pós-tratamento	10,9 ± 4,2	12,3 ± 6,7	11,8 ± 4,9	0,652[a]
DM2 Variação (%)	-36,4 ± 26,0	-27,6 ± 40,3	-31,6 ± 33,6	0,787[b]

Parâmetros	CC	CT	TT	p
OC (ng/mL)				
NG	11,4 ± 4,3	12,2 ± 5,2	11,2 ± 5,3	0,646[a]
DM2 Basal	8,9 ± 2,5	11,3 ± 9,3	11,4 ± 7,7	0,715[b]
DM2 Pós-tratamento	10,1 ± 6,3	12,9 ± 8,8	11,7 ± 7,4	0,277[b]
DM2 Variação (%)	18,1 ± 70,2	33,5 ± 72,0	16,1 ± 64,4	0,470[b]
25(OH)VD (pg/mL)				
NG	28,6 ± 9,5	25,5 ± 9,3	27,1 ± 10,5	0,559[a]
DM2 Basal	24,7 ± 7,2	29,1 ± 10,1	28,0 ± 9,4	0,357[b]
DM2 Pós-tratamento	23,3 ± 8,3	24,5 ± 8,1	25,5 ± 10,1	0,722[a]
DM2 Variação (%)	-4,4 ± 61,0	-8,9 ± 36,0	-7,1 ± 54,8	0,735[b]
IL-6 (pg/mL)				
NG	4,5 ± 4,2	4,7 ± 3,4	4,5 ± 3,9	0,897[b]
DM2 Basal	4,7 ± 3,0	7,0 ± 11,5	6,5 ± 7,4	0,925[b]
DM2 Pós-tratamento	3,5 ± 3,6	7,7 ± 9,9	5,9 ± 5,7	0,241[b]
DM2 Variação (%)	-19,8 ± 75,0	15,0 ± 94,6	-19,6 ± 87,5	0,495[b]
TNFα (pg/mL)				
NG	7,5 ± 5,4	7,6 ± 5,9	7,1 ± 2,7	0,857[b]
DM2 Basal	5,9 ± 3,1	6,4 ± 4,1	6,6 ± 3,7	0,868[b]
DM2 Pós-tratamento	10,8 ± 5,1	10,7 ± 7,2	9,2 ± 6,3	0,417[b]
DM2 Variação (%)	58,9 ± 90,5	62,1 ± 96,4	37,3 ± 89,9	0,485[b]

Legenda: Número de indivíduos está entre parênteses. NG: CC (14), CT (52) e TT (32); DM2: CC (22), CT (46) e TT (32). tACP: fosfatase ácida total; tALP: fosfatase alcalina total; bALP: fosfatase alcalina óssea específica; OC: osteocalcina; 25(OH)VD: 25, hidróxi-vitamina D. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por *One Way* ANOVA[(a)] e *Kruskal-Wallis*[(b)]. *,# símbolos diferentes na mesma linha apontam médias significativamente diferentes (Teste de Tukey). Variação (%): (Pós-Tratamento-Basal)/Basal x 100.

Tabela 27. Parâmetros Bioquímicos dos indivíduos NG e DM2 antes e após tratamento com pioglitazona de acordo com os genótipos do polimorfismo *OPG* rs3102735.

Parâmetros	CC + CT	TT	p (CC+CT *vs.* TT)
Glicemia de jejum (mmol/L)			
NG	5,2 ± 0,7	5,2 ± 0,7	0,937[a]
DM2 Basal	6,5 ± 1,3	6,5 ± 1,2	0,863[b]
DM2 Pós-tratamento	5,5 ± 0,7	5,9 ± 1,2	0,237[b]
DM2 Variação (%)	-12,8 ± 17,2	-7,3 ± 21,8	0,224[b]
Glicemia pós-prandial (mmol/L)			
NG	5,9 ± 1,8	5,7 ± 1,5	0,505[a]
DM2 Basal	10,1 ± 2,4	10,8 ± 3,0	0,373[a]
DM2 Pós-tratamento	7,8 ± 2,9	7,8 ± 2,4	0,707[b]
DM2 Variação (%)	- 25,3 ± 23,8	-21,9 ± 30,8	0,888[b]
Insulina (nmol/L)			
NG	11,1 ± 7,5	9,0 ± 5,7	0,277[b]
DM2 Basal	14,2 ± 9,5	13,4 ± 7,5	0,938[b]
DM2 Pós-tratamento	11,1 ± 8,3	10,5 ± 12,7	0,275[b]
DM2 Variação (%)	-10,7 ± 138,4	-5,5 ± 95,7	0,848[b]
Cálcio Ionizado (mmol/L)			
NG	1,15 ± 0,10	1,16 ± 0,09	0,671[b]
DM2 Basal	1,17 ± 0,08	1,14 ± 0,09	0,180[a]
DM2 Pós-tratamento	1,17 ± 0,09	1,15 ± 0,09	0,184[a]
DM2 Variação (%)	0,23 ± 8,2	0,93 ± 9,7	0,746[a]
tACP (U/L)			
NG	3,4 ± 1,3	3,5 ± 2,1	0,876[b]
DM2 Basal	3,4 ± 1,3	3,0 ± 1,4	0,168[a]
DM2 Pós-tratamento	4,0 ± 1,7	3,5 ± 1,4	0,163[b]
DM2 Variação (%)	24,8 ± 62,6	33,1 ± 89,2	0,989[b]
tALP (U/L)			
NG	77,8 ± 27,4	81,5 ± 25,2	0,399[b]
DM2 Basal	83,6 ± 21,2	73,1 ± 23,2	**0,045[a]**
DM2 Pós-tratamento	74,3 ± 19,6	66,2 ± 16,7	**0,048[a]**
DM2 Variação (%)	-9,1 ± 20,5	-2,0 ± 22,9	0,173[a]
bALP (U/L)			
NG	18,4 ± 13,9	17,8 ± 14,5	0,848[b]
DM2 Basal	23,3 ± 17,0	20,8 ± 14,8	0,325[b]
DM2 Pós-tratamento	15,4 ± 8,2	10,7 ± 4,2	**0,001[a]**
DM2 Variação (%)	-21,6 ± 51,1	-33,9 ± 28,4	0,165[a]

Parâmetros	CC +CT	TT	p (CC+CT *vs.* TT)
OC (ng/mL)			
NG	12,0 ± 5,2	11,6 ± 5,2	0,709[a]
DM2 Basal	11,6 ± 8,4	10,5 ± 7,5	0,936[b]
DM2 Pós-tratamento	12,6 ± 7,6	11,6 ± 8,0	0,411[b]
DM2 Variação (%)	25,6 ± 69,1	24,1 ± 69,5	0,888[b]
25(OH)VD (pg/mL)			
NG	27,9 ± 9,7	25,6 ± 9,8	0,361[b]
DM2 Basal	26,2 ± 9,8	28,3 ± 9,3	0,454[b]
DM2 Pós-tratamento	23,9 ± 10,1	24,8 ± 8,4	0,371[b]
DM2 Variação (%)	-3,5 ± 61,0	-13,2 ± 46,4	0,151[b]
IL-6 (pg/mL)			
NG	3,9 ± 3,1	9,2 ± 25,1	0,078[b]
DM2 Basal	3,9 ± 1,8	7,3 ± 10,3	0,096[b]
DM2 Pós-tratamento	5,3 ± 3,8	6,6 ± 9,0	0,646[b]
DM2 Variação (%)	21,1 ± 100,1	-12,0 ± 93,0	0,490[b]
TNF-α (pg/mL)			
NG	6,7 ± 3,2	8,1 ± 6,1	0,579[b]
DM2 Basal	7,0 ± 4,0	6,1 ± 3,7	0,320[b]
DM2 Pós-tratamento	9,4 ± 5,1	10,6 ± 6,9	0,656[b]
DM2 Variação (%)	42,9 ± 91,8	75,6 ± 110,3	0,210[b]

Legenda: Número de indivíduos está entre parênteses. NG: CC+CT (39) e TT (57); DM2: CC+CT (26) e TT (74). tACP: fosfatase ácida total; tALP: fosfatase alcalina total; bALP: fosfatase alcalina óssea específica; OC: osteocalcina; 25(OH)VD: 25, hidróxi-vitamina D. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por Teste-t de *Student*[(a)] e *Mann-Whitney*[(b)]. Variação (%): (Pós-Tratamento-Basal)/Basal x 100. Portadores do alelo raro (C) foram agrupados para as análises estatísticas.

Tabela 28. Parâmetros bioquímicos dos indivíduos NG e DM2 antes e após tratamento com pioglitazona, de acordo com os genótipos do polimorfismo *OPG* rs2073618.

Parâmetros	CC	CG	GG	p
Glicemia de jejum (mmol/L)				
NG	5,2 ± 0,8	5,2 ± 0,7	5,2 ± 0,6	0,964[a]
DM2 Basal	6,4 ± 1,4	6,5 ± 1,3	6,5 ± 0,9	0,430[b]
DM2 Pós-tratamento	5,8 ± 1,2	5,9 ± 1,3	5,4 ± 0,6	0,437[b]
DM2 Variação (%)	-8,3 ± 17,6	-6,3 ± 26,2	-15,2 ± 11,6	0,282[b]
Glicemia pós-prandial (mmol/L)				
NG	6,3 ± 1,5	5,5 ± 1,6	5,5 ± 1,7	0,138[a]
DM2 Basal	10,5 ± 3,0	10,9 ± 3,0	10,0 ± 2,3	0,535[a]
DM2 Pós-tratamento	7,4 ± 2,5	8,2 ± 2,9	7,5 ± 1,9	0,464[b]
DM2 Variação (%)	-21,9 ± 36,1	-23,9 ± 24,8	-22,1 ± 23,8	0,803[b]
Insulina (nmol/L)				
NG	10,0 ± 6,5	8,9 ± 6,1	11,9 ± 7,5	0,188[b]
DM2 Basal	14,3 ± 8,2	14,1 ± 8,6	11,2 ± 6,3	0,467[b]
DM2 Pós-tratamento	12,2 ± 15,7	9,7 ± 6,6	9,4 ± 9,6	0,446[b]
DM2 Variação (%)	-1,9 ± 108,1	-14,2 ± 101,1	-20,8 ± 123,7	0,687[b]
Cálcio Ionizado (mmol/L)				
NG	1,16 ± 0,08	1,14 ± 0,11	1,20 ± 0,10	0,055[b]
DM2 Basal	1,16 ± 0,09	1,15 ± 0,10	1,13 ± 0,07	0,556[a]
DM2 Pós-tratamento	1,16 ± 0,10	1,15 ± 0,09	1,15 ± 0,09	0,833[a]
DM2 Variação (%)	0,72 ± 9,2	0,16 ± 10,3	2,09 ± 7,4	0,782[a]
tACP (U/L)				
NG	3,5 ± 1,4	3,6 ± 2,1	3,0 ± 1,4	0,436[b]
DM2 Basal	3,2 ± 1,3	3,0 ± 1,4	3,0 ± 1,3	0,754[a]
DM2 Pós-tratamento	3,2 ± 1,3	3,4 ± 1,2	3,4 ± 1,3	0,718[a]
DM2 Variação (%)	19,2 ± 60,9	31,2 ± 91,5	38,5 ± 80,0	0,848[b]
tALP (U/L)				
NG	83,9 ± 28,9	80,0 ± 26,4	72,9 ± 17,8	0,527[b]
DM2 Basal	74,7 ± 19,4	77,2 ± 26,1	75,2 ± 24,4	0,885[a]
DM2 Pós-tratamento	68,5 ± 19,7	71,9 ± 20,8	73,5 ± 20,3	0,625[a]
DM2 Variação (%)	-6,9 ± 19,7	-1,3 ± 24,3	-1,7 ± 26,3	0,349[a]
bALP (U/L)				
NG	18,4 ± 16,2	17,8 ± 13,5	18,9 ± 13,5	0,935[b]
DM2 Basal	19,6 ± 13,5	21,2 ± 15,6	26,6 ± 18,4	0,433[b]
DM2 Pós-tratamento	11,6 ± 6,7	11,6 ± 4,8	12,5 ± 5,2	0,610[b]
DM2 Variação (%)	-29,4 ± 39,5	-29,9 ± 31,9	-36,6 ± 33,3	0,789[b]

Parâmetros	CC	CG	GG	p
OC (ng/mL)				
NG	11,3 ± 3,8	12,2 ± 4,5	11,2 ± 5,8	0,703[a]
DM2 Basal	12,4 ± 10,9	10,4 ± 4,6	8,0 ± 2,4	0,109[b]
DM2 Pós-tratamento	12,4 ± 9,1	12,1 ± 7,0	10,4 ± 6,8	0,469[b]
DM2 Variação (%)	-12,6 ± 50,0	31,6 ± 78,7	35,5 ± 81,9	0,606[b]
25(OH)VD (pg/mL)				
NG	25,0 ± 9,9	28,0 ± 9,6	24,6 ± 9,6	0,397[b]
DM2 Basal	28,9 ± 10,0	27,3 ± 9,2	26,3 ± 8,4	0,653[b]
DM2 Pós-tratamento	25,5 ± 10,4	24,1 ± 8,4	23,8 ± 5,4	0,837[b]
DM2 Variação (%)	-1,8 ± 53,0	-1,4 ± 51,1	-14,1 ± 23,3	0,746[b]
IL-6 (pg/mL)				
NG	12,0 ± 32,6	4,6 ± 3,2	4,1 ± 2,5	0,995[b]
DM2 Basal	4,9 ± 4,2	8,4 ± 12,8	4,6 ± 2,8	0,183[b]
DM2 Pós-tratamento	6,7 ± 7,7	6,0 ± 9,3	5,7 ± 4,4	0,347[b]
DM2 Variação (%)	34,4 ± 91,6	-13,7 ± 74,9	43,2 ± 55,1	0,336[b]
TNF-α (pg/mL)				
NG	8,0 ± 4,2	7,0 ± 6,2	7,3 ± 2,6	0,188[b]
DM2 Basal	6,4 ± 3,9	6,3 ± 3,9	6,3 ± 3,3	0,869[b]
DM2 Pós-tratamento	9,6 ± 7,6	10,8 ± 5,9	10,7 ± 4,7	0,346[b]
DM2 Variação (%)	36,3 ± 93,2	77,8 ± 96,5	67,1 ± 99,1	0,279[b]

Legenda: Número de indivíduos está entre parênteses. NG: CC (29), CG (50) e GG (18); DM2: CC (41), CG (41) e GG (18). tACP: fosfatase ácida total; tALP: fosfatase alcalina total; bALP: fosfatase alcalina óssea específica; OC: osteocalcina; 25(OH)VD: 25, hidróxi-vitamina D. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por *One Way* ANOVA[(a)] e *Kruskal-Wallis*[(b)]. Variação (%): (Pós-Tratamento-Basal)/Basal x 100.

Tabela 29. Parâmetros Bioquímicos dos indivíduos NG e DM2 antes e após tratamento com pioglitazona, de acordo com os genótipos do polimorfismo *PPARG* rs1801282.

Parâmetros	CC	CG + GG	p (CC *vs.* CG+GG)
Glicemia de jejum (mmol/L)			
NG	5,2 ± 0,7	5,2 ± 0,8	0,906[a]
DM2 Basal	6,4 ± 1,1	7,1 ± 1,9	0,576[b]
DM2 Pós-tratamento	5,7 ± 1,2	6,1 ± 0,8	0,074[b]
DM2 Variação (%)	-8,5 ± 21,5	-10,8 ± 15,9	0,820[b]
Glicemia pós-prandial (mmol/L)			
NG	5,8 ± 1,6	5,7 ± 1,2	0,897[a]
DM2 Basal	10,9 ± 2,7	8,5 ± 3,1	**0,004[a]**
DM2 Pós-tratamento	7,8 ± 2,5	8,0 ± 2,8	0,765[b]
DM2 Variação (%)	-27,3 ± 24,2	-3,1 ± 40,7	**0,002[b]**
Insulina (nmol/L)			
NG	9,6 ± 6,0	11,0 ± 8,3	0,978[b]
DM2 Basal	13,5 ± 8,1	14,5 ± 8,3	0,763[b]
DM2 Pós-tratamento	10,6 ± 12,3	11,3 ± 6,8	0,223[b]
DM2 Variação (%)	-2,2 ± 115,8	-22,4 ± 21,5	0,394[b]
Cálcio Ionizado (mmol/L)			
NG	1,16 ± 0,10	1,16 ± 0,10	0,606[b]
DM2 Basal	1,15 ± 0,10	1,13 ± 0,10	0,350[a]
DM2 Pós-tratamento	1,15 ± 0,09	1,16 ± 0,10	0,598[a]
DM2 Variação (%)	0,23 ± 8,8	3,9 ± 12,0	0,180[a]
tACP (U/L)			
NG	3,2 ± 1,5	4,2 ± 3,3	0,112[a]
DM2 Basal	3,0 ± 1,4	3,9 ± 1,0	**0,033[a]**
DM2 Pós-tratamento	3,6 ± 1,5	3,9 ± 1,3	0,314[b]
DM2 Variação (%)	34,5 ± 86,4	7,7 ± 46,6	0,226[b]
tALP (U/L)			
NG	79,5 ± 27,7	73,9 ± 17,9	0,557[b]
DM2 Basal	76,1 ± 24,2	73,8 ± 14,0	0,736[a]
DM2 Pós-tratamento	71,6 ± 20,5	65,3 ± 17,1	0,295[a]
DM2 Variação (%)	-1,9 ± 23,2	-10,5 ± 20,6	0,213[a]
bALP (U/L)			
NG	19,0 ± 15,9	17,8 ± 14,2	0,914[b]
DM2 Basal	21,0 ± 15,5	25,7 ± 14,5	0,163[b]
DM2 Pós-tratamento	11,7 ± 5,9	12,6 ± 4,0	0,284[b]
DM2 Variação (%)	-29,7 ± 35,2	-41,8 ± 34,8	0,226[b]

Parâmetros	CC	CG + GG	p (CC *vs.* CG+GG)
OC (ng/mL)			
NG	12,0 ± 5,0	9,3 ± 5,4	0,085[b]
DM2 Basal	10,5 ± 7,4	13,1 ± 10,6	0,471[b]
DM2 Pós-tratamento	12,2 ± 8,3	10,1 ± 3,8	0,512[b]
DM2 Variação (%)	26,9 ± 68,3	-2,8 ± 74,6	0,090[b]
25(OH)VD (pg/mL)			
NG	26,2 ± 9,5	28,4 ± 11,2	0,509[a]
DM2 Basal	27,8 ± 9,4	27,8 ± 10,0	0,953[b]
DM2 Pós-tratamento	24,8 ± 9,1	22,6 ± 5,6	0,507[a]
DM2 Variação (%)	-0,1 ± 49,8	-10,1 ± 26,4	0,827[b]
IL-6 (pg/mL)			
NG	7,6 ± 19,9	3,0 ± 1,2	0,282[b]
DM2 Basal	5,8 ± 5,7	10,1 ± 20,8	0,908[b]
DM2 Pós-tratamento	6,0 ± 6,5	7,8 ± 14,3	0,396[b]
DM2 Variação (%)	16,6 ± 94,4	-1,2 ± 97,0	0,392[b]
TNF-α (pg/mL)			
NG	7,5 ± 5,3	7,6 ± 1,6	0,367[b]
DM2 Basal	6,4 ± 3,9	5,5 ± 2,5	0,685[b]
DM2 Pós-tratamento	10,0 ± 6,8	11,8 ± 3,7	0,153[b]
DM2 Variação (%)	47,5 ± 93,3	72,5 ± 53,0	0,221[b]

Legenda: Número de indivíduos está entre parênteses. NG: CC (86) e CG+GG (12); DM2: CC (87) e CG+GG (13). tACP: fosfatase ácida total; tALP: fosfatase alcalina total; bALP: fosfatase alcalina óssea específica; OC: osteocalcina; 25(OH)VD: 25, hidróxi-vitamina D. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por Teste-t de *Student*[(a)] e *Mann-Whitney*[(b)]. Variação (%): (Pós-Tratamento-Basal)/Basal x 100. Os portadores do alelo raro (G) foram agrupados para as análises estatísticas.

Tabela 30. Parâmetros Bioquímicos dos indivíduos NG e DM2 antes e após tratamento com pioglitazona, de acordo com os genótipos do polimorfismo *PPARG* rs2972162.

Parâmetros	CC	CT	TT	p
Glicemia de jejum (mmol/L)				
NG	5,2 ± 0,7	5,2 ± 0,7	5,2 ± 0,7	0,893[a]
DM2 Basal	6,7 ± 1,4	6,4 ± 1,1	6,3 ± 1,1	0,391[b]
DM2 Pós-tratamento	5,7 ± 0,7	6,1 ± 1,3	5,4 ± 1,2	0,071[b]
DM2 Variação (%)	-13,7 ± 14,0[*]	-3,7 ± 18,5[#]	-10,6 ± 28,8[*]	**0,019[b]**
Glicemia pós-prandial (mmol/L)				
NG	5,9 ± 1,6	5,3 ± 1,2	6,2 ± 2,1	0,110[a]
DM2 Basal	10,6 ± 3,1	10,4 ± 3,0	11,0 ± 2,3	0,779[a]
DM2 Pós-tratamento	7,3 ± 1,8	7,7 ± 2,6	8,5 ± 3,2	0,407[b]
DM2 Variação (%)	- 23,03 ± 35,1	-21,3 ± 27,4	-25,2 ± 22,7	0,800[b]
Insulina (nmol/L)				
NG	10,2 ± 7,1	8,8 ± 5,8	9,6 ± 4,7	0,533[b]
DM2 Basal	14,8 ± 10,2	13,4 ± 6,6	12,4 ± 7,2	0,809[b]
DM2 Pós-tratamento	16,2 ± 18,4[*]	7,9 ± 4,1[#]	7,9 ± 3,4[#]	**0,017[b]**
DM2 Variação (%)	33,2 ± 149,2	-26,8 ± 64,9	-9,6 ± 82,3	0,071[b]
Cálcio Ionizado (mmol/L)				
NG	1,14 ± 0,10	1,17 ± 0,10	1,17 ± 0,10	0,275[a]
DM2 Basal	1,16 ± 0,10	1,13 ± 0,10	1,17 ± 0,06	0,110[a]
DM2 Pós-tratamento	1,16 ± 0,10	1,14 ± 0,09	1,14 ± 0,08	0,600[b]
DM2 Variação (%)	1,02 ± 9,4	2,3 ± 9,6	-1,91 ± 8,4	0,212[a]
tACP (U/L)				
NG	3,2 ± 1,3	3,8 ± 2,3	3,3 ± 1,5	0,364[a]
DM2 Basal	3,0 ± 1,3	3,0 ± 1,3	3,2 ± 1,5	0,715[b]
DM2 Pós-tratamento	3,8 ± 1,6	3,8 ± 1,4	3,2 ± 1,3	0,236[b]
DM2 Variação (%)	20,7 ± 55,2	27,0 ± 67,3	22,4 ± 84,4	0,571[b]
tALP (U/L)				
NG	74,0 ± 22,7	79,6 ± 28,4	86,5 ± 28,4	0,217[a]
DM2 Basal	76,5 ± 19,4	76,1 ± 27,3	74,6 ± 20,6	0,946[a]
DM2 Pós-tratamento	68,5 ± 17,7	71,3 ± 21,2	72,9 ± 21,7	0,703[a]
DM2 Variação (%)	-8,1 ± 21,9	-1,2 ± 22,9	-0,37 ± 23,9	0,303[a]
bALP (U/L)				
NG	18,3 ± 16,4	17,6 ± 13,0	22,6 ± 18,2	0,397[b]
DM2 Basal	23,5 ± 15,7	20,5 ± 12,9	20,4 ± 18,6	0,302[b]
DM2 Pós-tratamento	12,6 ± 4,3	11,8 ± 6,3	10,8 ± 6,1	0,148[b]
DM2 Variação (%)	-32,7 ± 33,1	-30,2 ± 40,6	-29,8 ± 30,0	0,884[b]

Parâmetros	CC	CT	TT	p
OC (ng/mL)				
NG	11,2 ± 3,8	11,7 ± 5,7	13,1 ± 5,7	0,399[a]
DM2 Basal	10,1 ± 7,0	11,5 ± 9,2	10,5 ± 6,3	0,386[b]
DM2 Pós-tratamento	11,4 ± 6,3	12,0 ± 9,5	12,4 ± 6,9	0,685[b]
DM2 Variação (%)	33,9 ± 71,7	14,7 ± 65,8	30,2 ± 70,7	0,338[b]
25(OH)VD (pg/mL)				
NG	25,7 ± 9,7	26,9 ± 9,8	27,6 ± 10,2	0,798[a]
DM2 Basal	26,6 ± 10,2	29,6 ± 8,4	26,8 ± 9,6	0,197[b]
DM2 Pós-tratamento	23,1 ± 10,5	25,0 ± 9,2	25,7 ± 5,9	0,135[b]
DM2 Variação (%)	-5,2 ± 48,7	-1,9 ± 59,8	-5,2 ± 33,9	0,191[b]
IL-6 (pg/mL)				
NG	5,2 ± 4,2	4,1 ± 3,3	14,0 ± 36,5	0,693[b]
DM2 Basal	7,7 ± 13,9	4,8 ± 3,3	7,3 ± 7,5	0,200[b]
DM2 Pós-tratamento	7,4 ± 10,5	4,2 ± 5,2	7,2 ± 6,0	0,196[b]
DM2 Variação (%)	-22,1 ± 93,6	-16,21 ± 60,0	-11,1 ± 98,9	0,736[b]
TNF-α (pg/mL)				
NG	7,2 ± 3,7	6,5 ± 2,6	9,9 ± 8,2	0,594[b]
DM2 Basal	6,7 ± 4,2	5,5 ± 2,3	7,1 ± 4,9	0,697[b]
DM2 Pós-tratamento	10,0 ± 7,2	9,3 ± 4,5	12,0 ± 7,5	0,416[a]
DM2 Variação (%)	48,8 ± 98,9	62,3 ± 69,5	29,5 ± 112,4	0,481[b]

Legenda: Número de indivíduos está entre parênteses. NG: CC (35), CT (37) e TT (24); DM2: CC (32), CT (41) e TT (27). tACP: fosfatase ácida total; tALP: fosfatase alcalina total; bALP: fosfatase alcalina óssea específica; OC: osteocalcina; 25(OH)VD: 25, hidróxi-vitamina D. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por *One Way* ANOVA[(a)] e *Kruskal-Wallis*[(b)]. *,# símbolos diferentes na mesma linha apontam médias significativamente diferentes (Teste de Tukey). Variação (%): (Pós-Tratamento-Basal)/Basal x 100.

Tabela 31. Parâmetros Bioquímicos dos indivíduos NG e DM2 antes e após tratamento com pioglitazona, de acordo com os genótipos do polimorfismo *VDR* rs11568820.

Parâmetros	**AA+AG**	**GG**	**p (AA+AG *vs.* GG)**
Glicemia de jejum (mmol/L)			
NG	5,2 ± 0,7	5,2 ± 0,7	0,618[a]
DM2 Basal	6,5 ± 1,2	6,4 ± 1,2	0,632[b]
DM2 Pós-tratamento	5,8 ± 1,2	5,8 ± 1,1	0,536[b]
DM2 Variação (%)	-10,0 ± 17,1	-6,7 ± 26,2	0,730[b]
Glicemia pós-prandial (mmol/L)			
NG	5,6 ± 1,6	5,9 ± 1,6	0,471[a]
DM2 Basal	10,9 ± 3,0	10,1 ± 2,6	0,176[a]
DM2 Pós-tratamento	7,8 ± 2,6	7,8 ± 2,5	0,864[b]
DM2 Variação (%)	-24,3 ± 32,5	-20,3 ± 22,0	0,101[b]
Insulina (nmol/L)			
NG	9,1 ± 6,2	10,5 ± 6,9	0,311[b]
DM2 Basal	13,1 ± 7,5	14,4 ± 9,0	0,578[b]
DM2 Pós-tratamento	10,2 ± 8,6	11,5 ± 15,7	0,312[b]
DM2 Variação (%)	-12,6 ± 68,3	-13,1 ± 86,4	0,816[b]
Cálcio Ionizado (mmol/L)			
NG	1,15 ± 0,09	1,17 ± 0,10	0,460[b]
DM2 Basal	1,14 ± 0,09	1,17 ± 0,09	0,090[a]
DM2 Pós-tratamento	1,15 ± 0,09	1,15 ± 0,10	0,832[b]
DM2 Variação (%)	2,0 ± 9,2	-1,3 ± 9,2	0,091[a]
tACP (U/L)			
NG	3,6 ± 2,0	3,2 ± 1,5	0,288[b]
DM2 Basal	3,0 ± 1,4	3,2 ± 1,3	0,419[a]
DM2 Pós-tratamento	3,7 ± 1,6	3,5 ± 1,3	0,565[b]
DM2 Variação (%)	28,0 ± 75,3	16,2 ± 56,1	0,361[b]
tALP (U/L)			
NG	79,6 ± 27,7	80,2 ± 23,9	0,649[b]
DM2 Basal	77,6 ± 23,1	72,8 ± 22,9	0,319[a]
DM2 Pós-tratamento	72,4 ± 20,0	68,1 ± 20,4	0,314[a]
DM2 Variação (%)	-3,9 ± 20,6	-1,6 ± 26,6	0,635[a]
bALP (U/L)			
NG	20,2 ± 15,3	15,8 ± 12,5	0,104[b]
DM2 Basal	22,4 ± 16,1	20,0 ± 14,3	0,684[b]
DM2 Pós-tratamento	11,3 ± 4,4	12,6 ± 7,5	0,300[a]
DM2 Variação (%)	-35,2 ± 27,3	-23,2 ± 45,9	0,128[a]

Parâmetros	AA+AG	GG	p (AA+AG *vs.* GG)
OC (ng/mL)			
NG	11,9 ± 5,3	11,6 ± 5,0	0,763[a]
DM2 Basal	10,9 ± 8,1	10,6 ± 7,2	0,540[b]
DM2 Pós-tratamento	12,5 ± 9,2	10,9 ± 4,8	0,963[b]
DM2 Variação (%)	25,7 ± 64,8	22,6 ± 76,3	0,535[b]
25(OH)VD (pg/mL)			
NG	26,3 ± 10,2	26,8 ± 9,2	0,810[a]
DM2 Basal	28,6 ± 10,6	26,2 ± 6,2	0,469[b]
DM2 Pós-tratamento	24,4 ± 9,8	24,9 ± 6,9	0,379[b]
DM2 Variação (%)	-5,6 ± 46,9	-8,5 ± 51,6	0,249[b]
IL-6 (pg/mL)			
NG	4,3 ± 2,8	4,6 ± 3,8	0,319[b]
DM2 Basal	6,2 ± 6,3	6,6 ± 12,1	0,499[b]
DM2 Pós-tratamento	6,0 ± 6,9	6,7 ± 9,6	0,608[b]
DM2 Variação (%)	-8,8 ± 83,2	3,5 ± 91,9	0,767[b]
TNF-α (pg/mL)			
NG	6,9 ± 4,1	8,0 ± 5,9	0,324[b]
DM2 Basal	6,7 ± 4,2	5,7 ± 2,9	0,427[b]
DM2 Pós-tratamento	9,9 ± 6,9	10,8 ± 5,7	0,337[b]
DM2 Variação (%)	46,8 ± 96,9	76,3 ± 99,3	0,494[b]

Legenda: Número de indivíduos está entre parênteses. NG: AA+AG (52) e GG (45); DM2: AA+AG (63) e GG (37). tACP: fosfatase ácida total; tALP: fosfatase alcalina total; bALP: fosfatase alcalina óssea específica; OC: osteocalcina; 25(OH)VD: 25, hidróxi-vitamina D. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por Teste-t de *Student*[(a)] e *Mann-Whitney*[(b)]. Variação (%): (Pós-Tratamento-Basal)/Basal x 100. Os portadores do alelo raro (A) foram agrupados para as análises estatísticas.

Tabela 32. Parâmetros Bioquímicos dos indivíduos NG e DM2 antes e após tratamento com pioglitazona de acordo com os genótipos do polimorfismo *ESRI* rs9340799.

Parâmetros	AA	AG+GG	p (AA *vs.* AG+GG)
Glicemia de jejum (mmol/L)			
NG	5,3 ± 0,7	5,2 ± 0,7	0,343[a]
DM2 Basal	6,4 ± 1,4	6,6 ± 1,0	0,052[b]
DM2 Pós-tratamento	5,7 ± 1,1	5,9 ± 1,2	0,377[b]
DM2 Variação (%)	-8,1 ± 23,5	-9,0 ± 18,5	0,912[b]
Glicemia pós-prandial (mmol/L)			
NG	6,1 ± 1,6	5,5 ± 1,6	0,084[a]
DM2 Basal	10,2 ± 2,7	11,0 ± 3,1	0,197[a]
DM2 Pós-tratamento	7,6 ± 2,8	8,0 ± 2,4	0,280[b]
DM2 Variação (%)	-24,2 ± 30,2	-21,7 ± 28,6	0,536[b]
Insulina (nmol/L)			
NG	9,0 ± 6,3	10,6 ± 6,7	0,271[b]
DM2 Basal	13,5 ± 7,4	12,8 ± 7,2	0,705[b]
DM2 Pós-tratamento	11,0 ± 9,1	10,3 ± 14,1	0,352[b]
DM2 Variação (%)	-20,7 ± 52,2	-25,5 ± 41,8	0,614[b]
Cálcio Ionizado (mmol/L)			
NG	1,13 ± 0,10	1,17 ± 0,10	**0,040[b]**
DM2 Basal	1,13 ± 0,08	1,17 ± 0,09	**0,038[a]**
DM2 Pós-tratamento	1,15 ± 0,06	1,16 ± 0,11	0,859[b]
DM2 Variação (%)	2,05 ± 8,90	-0,37 ± 9,76	0,213[a]
tACP (U/L)			
NG	3,4 ± 1,4	3,5 ± 2,0	0,973[b]
DM2 Basal	2,9 ± 1,5	3,3 ± 1,2	0,155[a]
DM2 Pós-tratamento	3,7 ± 1,6	3,5 ± 1,4	0,931[b]
DM2 Variação (%)	19,0 ± 56,8	18,6 ± 67,7	0,224[b]
tALP (U/L)			
NG	80,2 ± 29,9	79,6 ± 23,4	0,732[b]
DM2 Basal	81,2 ± 24,4	71,4 ± 21,0	**0,038[a]**
DM2 Pós-tratamento	73,9 ± 19,8	67,6 ± 20,4	0,137[a]
DM2 Variação (%)	-5,7 ± 21,3	-1,6 ± 24,2	0,382[a]
bALP (U/L)			
NG	18,1 ± 15,8	17,3 ± 12,1	0,539[b]
DM2 Basal	20,9 ± 15,5	22,3 ± 15,6	0,660[b]
DM2 Pós-tratamento	11,3 ± 4,7	12,2 ± 6,6	0,584[b]
DM2 Variação (%)	-34,6 ± 26,7	-28,6 ± 40,7	0,756[b]

Parâmetros	AA	AG+GG	p (AA *vs.* AG+GG)
OC (ng/mL)			
NG	11,8 ± 4,8	11,5 ± 5,3	0,736[a]
DM2 Basal	12,1 ± 10,5	9,6 ± 3,1	0,885[b]
DM2 Pós-tratamento	12,2 ± 8,8	11,5 ± 7,1	0,648[b]
DM2 Variação (%)	17,7 ± 58,0	26,5 ± 73,0	0,676[b]
25(OH)VD (pg/mL)			
NG	25,5 ± 10,6	27,0 ± 9,1	0,353[b]
DM2 Basal	26,2 ± 7,8	29,3 ± 10,6	0,121[b]
DM2 Pós-tratamento	24,7 ± 9,1	24,9 ± 8,7	0,918[b]
DM2 Variação (%)	-6,9 ± 49,9	-7,5 ± 48,2	0,131[b]
IL-6 (pg/mL)			
NG	4,4 ± 2,7	4,6 ± 3,7	0,974[b]
DM2 Basal	5,3 ± 3,9	7,4 ± 12,1	0,817[b]
DM2 Pós-tratamento	6,5 ± 7,1	6,4 ± 9,0	0,437[b]
DM2 Variação (%)	14,5 ± 92,9	-12,8 ± 86,1	0,518[b]
TNF-α (pg/mL)			
NG	7,2 ± 4,1	7,4 ± 5,6	0,868[b]
DM2 Basal	6,4 ± 4,2	6,2 ± 3,4	0,907[b]
DM2 Pós-tratamento	9,3 ± 7,4	11,2 ± 5,8	0,053[b]
DM2 Variação (%)	22,2 ± 74,3	47,7 ± 77,6	0,093[b]

Legenda: Número de indivíduos em parênteses. NG: AA (37) e AG+GG (57); DM2: AA (49) e AG+GG (48). tACP: fosfatase ácida total; tALP: fosfatase alcalina total; bALP: fosfatase alcalina óssea específica; OC: osteocalcina; 25(OH)VD: 25, hidróxi-vitamina D. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por Teste-t de *Student*[(a)] e *Mann-Whitney*[(b)]. Variação (%): (Pós-Tratamento-Basal)/Basal x 100. Os portadores do alelo raro (G) foram agrupados para as análises estatísticas.

6.6 Experimentos em Animais

6.6.1 Experimentos ao Final de 16 Semanas

Observou-se nos grupos estudados aumento do peso corporal no grupo DH em comparação ao grupo C ($p<0,05$). Para os demais parâmetros, não foram observadas alterações entre os grupos no período experimental de 16 semanas (**Figura 9**).

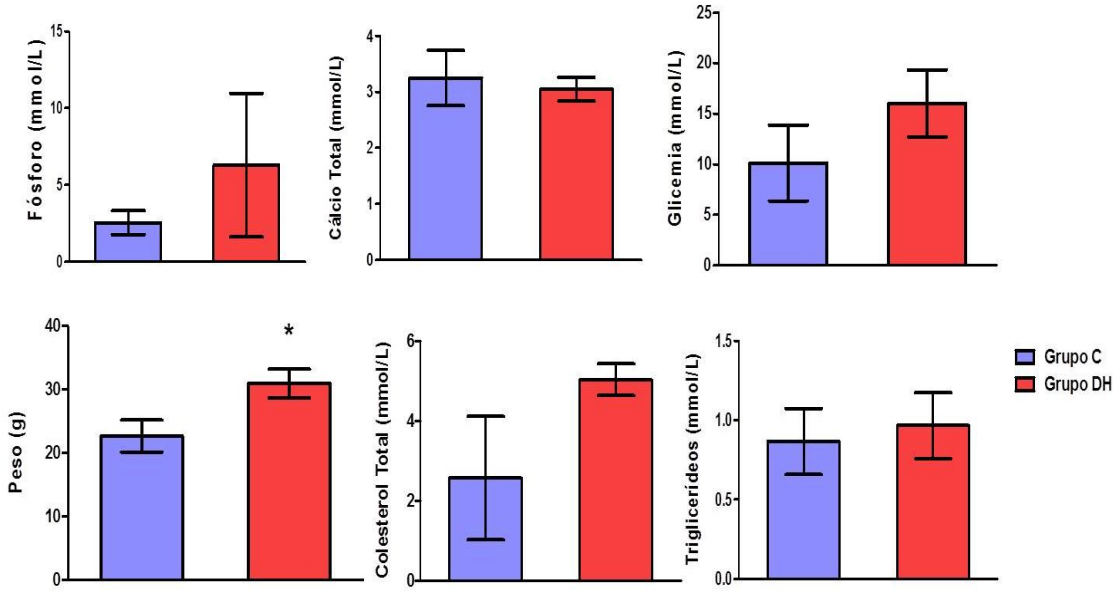


Figura 9. Parâmetros Bioquímicos e Peso dos animais dos grupos C e DH após o período experimental de 16 semanas de dieta. C: controle; DH: dieta hiperlipídica por 16 semanas. Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão e foram comparados pelo Teste-t de *Student*. * $P<0,05$.

6.6.2 Experimentos ao Final de 32 Semanas

Os parâmetros bioquímicos e peso dos animais coletados ao final do período experimental de 32 semanas estão ilustrados na **Figura 10**. Observou-se aumento da concentração sérica de glicose e colesterol total no grupo DH em comparação ao grupo C ($p<0,05$). Também foi observado aumento do peso corporal nos animais do grupo DH quando comparado ao grupo C ($p<0,05$). Para os demais parâmetros não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados.

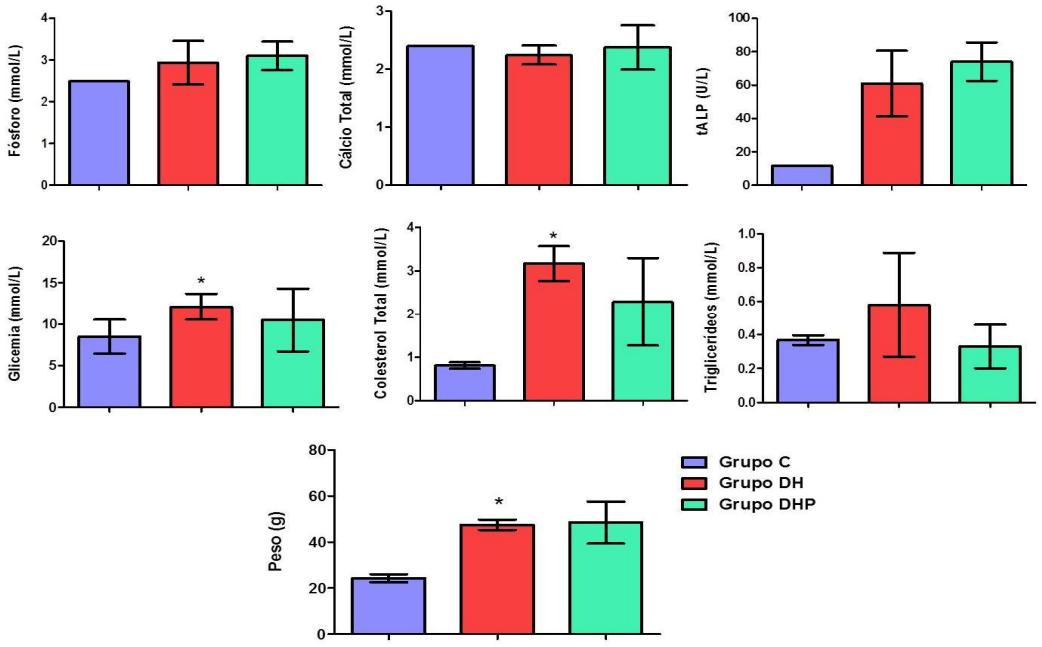


Figura 10. Parâmetros Bioquímicos e Peso dos animais dos grupos C, DH e DHP após o período experimental de 32 semanas de dieta. C: controle; DH: dieta hiperlipídica por 32 semanas; DHP: Dieta hiperlipídica por 16 semanas + 16 semanas de tratamento com pioglitazona. Os dados estão apresentados como média e desvio-padrão e foram comparados pelo Teste-t de *Student*. * $P<0,05$.

6.6.2.1 Efeito da Pioglitazona sobre a Expressão Gênica em Fêmures

Na **Figura 11** estão representados os valores de expressão do mRNA dos genes *RANK*, *RANKL*,*OPG*, *PPARG*, *IL6*, *TNFA*, *VDR* e *PTH* em Fêmures nos grupos C, DH e DHP. Observou-se que a expressão de *RANK*, *RANKL*, *IL6* e *TNFA* no grupo DH está aumentada em comparação ao grupo C ($p<0,05$). Após o tratamento com pioglitazona observou-se expressão diminuída de *TNFA* em relação ao grupo DH. Para os demais genes, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados e as fases de tratamento.

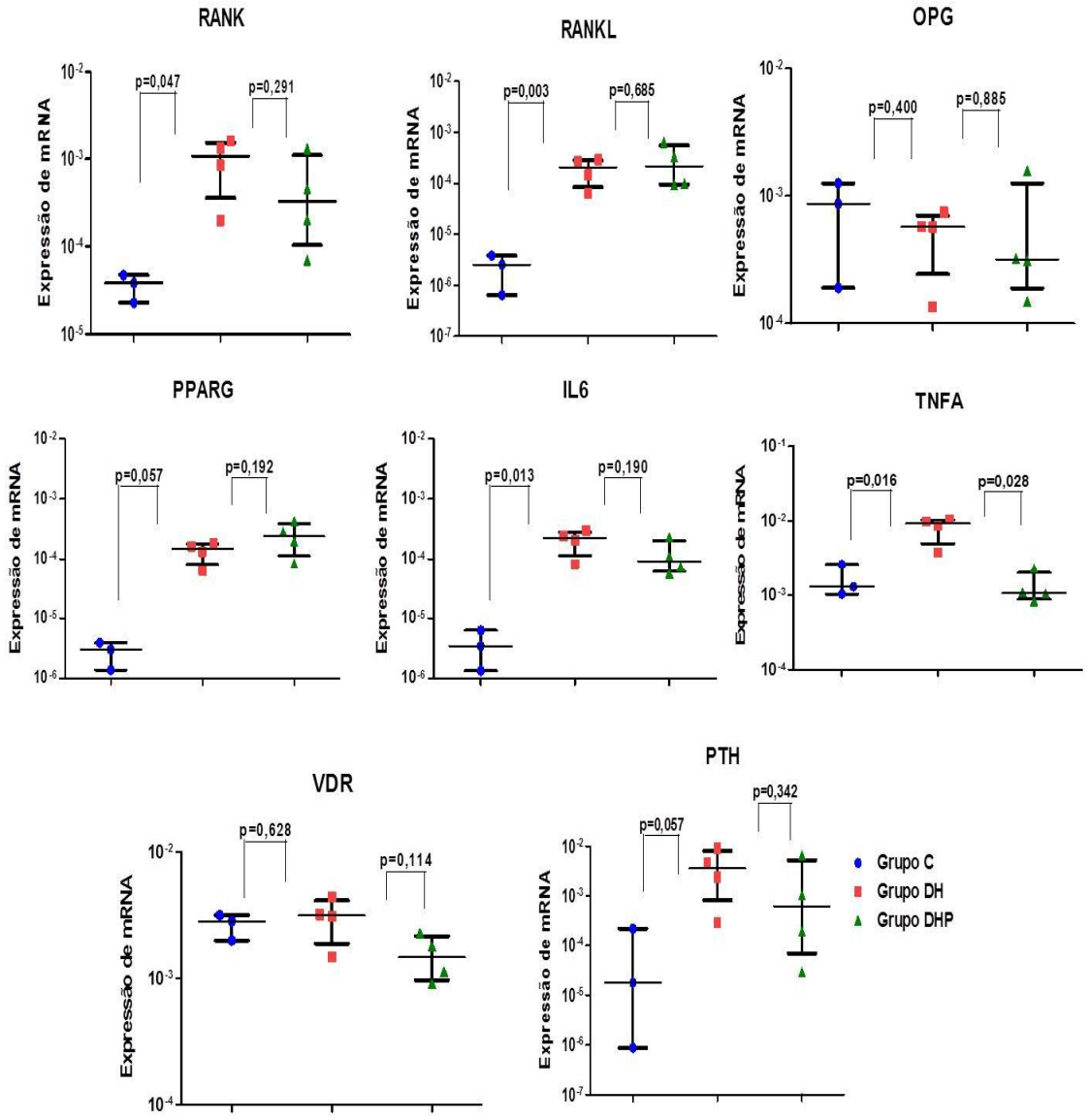


Figura 11. **Expressão do mRNA de *RANK, RANKL, OPG, PPARG, IL6, TNFA, VDR* e *PTH* em Fêmures de camundongos.** C: controle; DH: dieta hiperlipídica por 32 semanas; DHP: Dieta hiperlipídica por 16 semanas + 16 semanas de tratamento com pioglitazona. Os dados estão apresentados como mediana e intervalos interquartílicos através do gráfico Scatter plot e comparados pelo teste *Mann-Whitney*. P<0,05.

6.6.2.2 Análise da Histomorfometria Óssea

A histomorfometria óssea da tíbia mostrou aumento da separação trabecular e diminuição do volume ósseo no grupo DH em comparação ao grupo C ($p<0,05$). Em relação ao tratamento com pioglitazona e a espessura trabecular, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados ($p>0,05$) (**Tabela 33**).

Tabela 33. Variáveis Histomorfométricas da Tíbia.

Variáveis	**C**	**DH**	**DHP**	**P**
Espessura Trabecular (Tb.Th; mm)	0,294 ± 0,144	0,151 ± 0,062	0,137 ± 0,068	0,094
Separação Trabecular (Tb.Sp; mm)	0,165 ± 0,053[a]	0,602 ± 0,379[b]	0,335 ± 0,057	**0,005**
Volume Ósseo (BV/TV; %)	71,35 ± 11,04[a]	35,41 ± 7,93[b]	44,53 ± 24,42	**0,029**

Legenda: C: controle; DH: dieta hiperlipídica por 32 semanas; DHP: dieta hiperlipídica por 16 semanas + 16 semanas de tratamento com pioglitazona. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por *One Way* ANOVA. Letras diferentes na mesma linha apontam médias significativamente diferentes (Teste de Tukey).

7 DISCUSSÃO

Muitos estudos vêm demonstrando associação entre DM2 e o aumento do risco de fraturas (LIEFDE, DE et al., 2005; VESTERGAARD, 2007; RÄKEL et al., 2008). O comprometimento no metabolismo da glicose afeta de maneira prejudicial o metabolismo ósseo, ocasionando diminuição da DMO nestes pacientes (VESTERGAARD, 2007). No presente estudo, observou-se diminuição da osteocalcina plasmática no grupo DM2 em comparação ao grupo NG. Alguns estudos associaram DM2 com diminuição das concentrações séricas de osteocalcina, sugerindo que o controle glicêmico inadequado influencia o remodelamento ósseo, causando diminuição na atividade osteoblástica e supressão de osteocalcina, importante marcador de formação óssea secretado pelos osteoblastos (KANAZAWA et al., 2010; MOTYL et al., 2010).

Além disso, a expressão do mRNA do gene *OPG* foi menor, enquanto a expressão do mRNA do gene *VDR* foi maior no grupo DM2 em relação ao grupo NG. Ao analisar a expressão gênica de acordo com o gênero, constatou-se que a expressão dos mRNAs dos genes *RANKL* e *IL6* foi maior entre as mulheres, enquanto que a expressão do mRNA do gene *PPARG* foi maior entre os homens no grupo DM2 em comparação ao grupo NG. Pesquisas evidenciam que as ações metabólicas da 1,25$(OH)_2$ vitamina D ocorrem através de sua ligação com seu receptor (VDR). O VDR está envolvido na regulação de OPG e RANKL, promovendo a osteoclastogênese através da regulação positiva de RANKL e da regulação negativa de OPG (KONDO et al., 2004; BALDOCK et al., 2006). O PPARγ também está envolvido no processo de osteoclastogênese, promovendo a diferenciação dos osteoclastos através da regulação da expressão de c-fos na via de sinalização de RANKL (WAN et al., 2007). De acordo com Debiais (2009), há fortes indícios de que PPARγ estimula a diferenciação dos adipócitos e suprime a diferenciação dos osteoblastos. Segundo Lee &

Lorenzo (2006), a formação dos osteoclastos também é influenciada por citocinas. A IL-6 está envolvida na regulação das células osteoclásticas progenitoras promovendo a diferenciação em osteoclastos maduros (LEE & LORENZO, 2006).

No presente estudo, a indução da transcrição de *VDR*, *RANKL*, *PPARG* e *IL6* parece desempenhar um importante papel na ativação osteoclástica, enquanto que a inibição de *OPG* provoca diminuição da osteoblastogênese e aumento da osteoclastogênese. Estes achados confirmam que o estado hiperglicêmico não controlado induz a perda óssea nos indivíduos DM2 (SUZUKI et al., 2005; GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2012). Entretanto, a perda óssea parece ser maior entre as mulheres pós-menopausa. Sabe-se que a deficiência de estrógeno ocorre nas mulheres pós-menopausa devido à diminuição na função ovariana, sendo a maior causa de perda óssea (KHALIL et al., 2010). A deficiência de estrógeno aumenta o recrutamento de RANK pelos osteoclastos. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que o estrógeno inibe a produção de RANKL pelos osteoblastos e pelos linfócitos T e B e aumenta a produção de OPG, portanto a deficiência desse hormônio acarreta alterações na razão RANKL/OPG favorecendo a reabsorção óssea (CLOWES et al., 2009).

A possível contribuição da hiperglicemia no remodelamento ósseo também foi demonstrada através da análise da regressão linear múltipla, na qual verificou-se a relação entre a expressão basal de *RANKL*, *OPG*, *PPARG*, *IL6*, *TNFA* e *VDR* e os marcadores ósseos nos indivíduos DM2. Pode-se verificar que o aumento da glicemia e da transcrição do mRNA do gene *IL6* contribuiu com a diminuição sérica do cálcio ionizado, enquanto a transcrição do mRNA do gene *OPG* contribuiu com o aumento sérico do cálcio ionizado. Ativação dos osteoclastos dissolve a matriz mineralizada do osso, liberando cálcio ionizado no líquido extracelular, alterando a homeostase e sinalização do cálcio (LI et al., 2006). A remodelação óssea é parte integrante da redistribuição de cálcio no organismo, o qual é regulado pela absorção do intestino, deposição óssea e excreção renal. O aumento da reabsorção óssea causa

um efluxo de cálcio do osso para o meio extracelular, com aumento compensatório da excreção renal e consequente diminuição sérica do cálcio ionizado (CLARKE & KHOSLA, 2010). Esses resultados sugerem que a relação negativa entre o cálcio ionizado e a glicemia associada à expressão do mRNA da citocina pró-inflamatória *IL6*, talvez possa ser explicada pelo aumento da perda de cálcio pela urina devido ao aumento da reabsorção óssea associado ao aumento do processo inflamatório desenvolvido pelos indivíduos DM2.

A transcrição do mRNA dos genes *TNFA* e *VDR* foi associado com a atividade sérica de bALP em nossos achados. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que o TNF-α induz a formação dos osteoclastos e consequente reabsorção óssea (LEE & LORENZO, 2006; ALBLOWI et al., 2009) e *VDR* atua tanto nas linhagens de osteoclastos como osteoblastos (GOLTZMAN et al., 2004). O marcador ósseo bALP é um importante marcador da atividade osteoblástica, tendo sua atividade máxima entre oito a doze semanas após a fratura óssea e sendo recrutrado frente a um processo de reabsorção óssea (LEUNG et al., 1993). Um estudo mostrou que a hiperglicemia aumenta a expressão de bALP pelos osteoblastos e diminui osteocalcina em homens com DM2 (KANAZAWA et al., 2010). Com base nesses achados, nossos resultados demonstram que a expressão dos genes *OPG*, *IL6*, *TNFA* e *VDR* talvez possa induzir alterações nas concentrações séricas de cálcio ionizado e na atividade enzimática de bALP, contribuindo para o aumento da reabsorção óssea no indivíduos DM2.

O tratamento com pioglitazona reduziu as concentrações séricas de glicose de jejum, de glicose pós-prandial, da insulina, do HOMA-IR, dos triglicerídeos, do VLDL-C e aumentou as concentrações séricas de HDL-C nos indivíduos DM2. Concordante com nossos achados, 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 melhora do perfil lipídico com o aumento de HDL.

Ao avaliarmos os marcadores ósseos após o tratamento com pioglitazona, observou-se aumento na atividade sérica de tACP e diminuição nas atividades séricas de tALP e bALP nos indivíduos DM2. Um estudo randomizado, realizado em 30 pacientes pré-menopausa com síndrome do ovário policístico, após 16 semanas de tratamento com pioglitazona (30 mg /dia), evidenciou reduções significativas na DMO da coluna lombar, do fêmur e redução de tALP, em comparação ao grupo controle (GLINTBORG et al., 2008). Outro ensaio clínico randomizado mostrou que a rosiglitazona (4 mg / dia / 12 semanas) reduziu a atividade plasmática de bALP em mulheres diabéticas pós-menopausa, indicando um efeito inibitório na atividade das células osteoblásticas (BERBEROGLU et al., 2007).

Em culturas celulares de osteoblastos de camundongos, Seth et al. (2012) evidenciaram que o tratamento com pioglitazona e rosiglitazona inibiu a atividade de tALP e a produção de osteocalcina. O tACP é um marcador produzido durante o processo de degradação da matriz orgânica pelos osteoclastos (CHAMBERS & FULLER, 2011) enquanto que tALP e bALP são marcadores de formação óssea produzidos pelos osteoblastos (LEUNG et al., 1993). O aumento de tACP e a diminuição de tALP e de bALP talvez possam indicar uma diminuição no processo de formação óssea induzida pelo tratamento com pioglitazona em nosso estudo.

Sabe-se que o mecanismo de ação das pioglitazonas está relacionado com o aumento da sensibilidade das células à insulina através da ativação do PPARγ. Alguns estudos demonstram que a ativação do PPARγ pelas TZDs talvez possa causar um aumento na adiposidade da medula óssea e diminuição da osteoblastogênese, causando uma redução na formação óssea (SCHWARTZ, 2006; GREY, 2008; BODMER et al., 2009). Evidências recentes sugerem que o uso de TZDs está associado com a aceleração da perda óssea e aumento do risco de fraturas em pacientes DM2 (LI et al., 2010a; SETH et al., 2012).

A pioglitazona de acordo com nossos resultados induziu a transcrição apenas de *OPG* nos indivíduos DM2. Contrapondo nossos achados, Park et al. (2011) evidenciaram redução nas concentrações séricas de OPG em indivíduos DM2, os quais foram tratados com pioglitazona (15mg/dia) durante 24 semanas. Entretanto, Gruntmanis et al. (2010) não observaram alteração nas concentrações séricas de OPG nos indivíduos DM2 tratados com rosiglitazona (8mg/dia) durante seis meses.

Apesar dos efeitos anti-inflamatórios da pioglitazona (SHAND et al., 2007), em nossos resultados o tratamento aumentou a concentração sérica de TNF-α nos indivíduos DM2. An et al. (2007) demonstraram o aumento na expressão de *OPG* e de *RANKL* em adipócitos tratados com TNF-α e a diminuição da expressão de *OPG* e de *RANKL* nos adipócitos tratados com insulina e rosiglitazona, sugerindo que *OPG* e *RANKL* são regulados pelo TNF-α, pela insulina e pela rosiglitazona nos adipócitos. Outro estudo *in vitro* desenvolvido por Takano et al. (2012) evidenciou que o PPARγ reverte a inibição da diferenciação dos osteoblastos causada pelo TNF-α, através da supressão do receptor de TNF. Esses resultados indicam que os efeitos adversos da pioglitazona no metabolismo ósseo possam estar associados com o aumento das concentrações séricas de TNF-α após o tratamento nos indivíduos DM2. Além disso, um estudo previamente publicado por nosso grupo evidenciou redução de tALP em resposta ao tratamento com pioglitazona nos indivíduos DM2 portadores do alelo *TNFA*-308A, demonstrando que o tratamento com a pioglitazona talvez possa influenciar a atividade osteoblástica, refletido pela redução de tALP (HIMELFARB et al., 2011).

No entanto, o tratamento não modificou a expressão do mRNA dos genes do estudo. Esses resultados podem ter ocorrido devido ao curto período de tratamento. Um estudo de meta-análise com 10 diferentes ensaios randomizados controlados envolvendo 13.715 participantes e dois estudos observacionais envolvendo 31.679 participantes confirmou que o

uso prolongado (por mais de um ano) das TZDs dobra o risco de fraturas nas mulheres com DM2 (LOKE et al., 2009).

A influência da expressão gênica basal nos marcadores ósseos em resposta ao tratamento nos indivíduos DM2 também foi observada. O modelo de regressão foi ajustado para idade, gênero, hipertensão, IMC, TNF-α, glicose e insulina. O aumento da expressão basal de *OPG* contribuiu com a redução de tALP, enquanto que o aumento da expressão de *TNFA* e de *IL6* contribuíram com o aumento de tALP em resposta ao tratamento. Também foi visto que o aumento da expressão de *VDR* contribuiu com redução de OC e aumento de bALP em resposta ao tratamento, o aumento da expressão de *TNFA* contribuiu com a redução de tACP em resposta ao tratamento. Esses resultados evidenciam que as expressões gênicas de *OPG*, *TNFA*, *IL6* e *VDR*, apesar da transcrição do mRNA não ter se modificado, contribuíram com o processo de perda óssea, induzindo alterações no metabolismo ósseo dos indivíduos DM2 e o tratamento com pioglitazona talvez possa acentuar a reabsorção óssea desses indivíduos.

Atualmente são empregados na prática clínica diversos exames para diagnosticar perda óssea, 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. Portanto, de acordo com nosso estudo as expressões gênicas de *OPG*, *TNFA*, *IL6* e *VDR* talvez possam ser utilizadas como marcadores precoses de alterações ósseas nos indivíduos DM2 antes do tratamento e nos indivíduos DM2 tratados com pioglitazona.

Neste estudo a frequência do alelo C do polimorfismo rs1805034 do gene *RANK* foi similar entre NG (38,8%) e DM2 (38,0%). Existem poucos trabalhos que avaliam a frequência desse polimorfismo entre a população. De acordo com Zupan et al. (2010), a frequência do alelo C foi de 46,6% em mulheres eslovenas pós-menopausa. Esses resultados

sugerem que a frequênica do alelo C do polimorfismo rs1805034 do gene *RANK* no nosso trabalho é similar à encontrada em outro estudo.

A frequência do alelo C do polimorfismo rs9525641 do gene *RANKL* foi similar entre NG (40,8%) e DM2 (45,0%) no nosso estudo. Mencej et al. (2006) encontraram uma frequência de 49,6% em eslovenas pós-menopausa, Dong et al. (2009) encontraram uma frequência de 42,11% em caucasianos, enquanto que Takács et al. (2010) encontraram uma frequência de 45,9% do alelo C em mulheres pós-menopausa, frequências semelhantes às encontradas no presente estudo.

A frequência do alelo C do polimorfismo rs3102735 do gene *OPG* foi diferente entre NG (21,9%) e DM2 (13,0%) no nosso estudo. Além disso, foi visto que os indivíduos portadores do alelo C apresentam menor risco para DM2. Kim et al. (2007) verificaram que a frequência do alelo C em mulheres coreanas pós-menopausa foi de 9,2%, Eun et al. (2009) encontraram frequência de 9,14% do alelo C em mulheres jovens com escoliose idiopática, enquanto, Takács et al. (2010) evidenciaram uma frequência de 14,6% do alelo C em mulheres pós-menopausa, frequências semelhantes às encontradas no grupo DM2 no presente estudo.

As frequências do alelo G do polimorfismo rs2073618 do gene *OPG* foram similares entre os grupos NG (44,3%) e DM2 (38,5%) no nosso estudo. Kim et al. (2007) verificaram uma frequência de 25,45% do alelo G em coreanas, Dong et al. (2009) publicaram frequência de 47,86% do alelo G em caucasianos. Biscetti et al. (2012) encontram uma frequência de 52,2% do alelo G em diabéticos com eventos de AVC e 31,5% em diabéticos sem eventos de AVC. Com exceção da população coreana, os demais resultados estão similares aos obtidos no presente estudo em caucasianos.

Em relação ao polimorfismo rs1801282 do gene *PPARG* (Pro12Ala), as frequências encontradas para o alelo G foram similares entre os grupos NG (6,6%) e DM2 (7,0%) no

nosso estudo. Um estudo realizado pelo nosso grupo encontrou, neste gene, uma frequência de 9,0% do alelo G em indivíduos DM2 brasileiros (TAVARES et al., 2005a). Em mulheres coreanas a frequência do alelo G foi de 5,0% (RHEE et al., 2007). Esses resultados estão similares aos obtidos no presente estudo.

A frequência do alelo T do polimorfismo rs2972162 do gene *PPARG* foi similar entre os grupos NG (44,3%) e DM2 (47,5%) no nosso estudo. Um estudo realizado pelo nosso grupo evidenciou uma frequência de 10,0% do alelo T em indivíduos DM2 brasileiros (TAVARES et al., 2005b), contudo outro estudo encontrou uma frequência de 41,1% do alelo T em chineses (CHEN et al., 2008). Os diferentes achados encontrados na população brasileira provavelmente deve-se a alta miscigenação que ocorre em nossa população ou seleção aleatória de grupos mais miscigenados (SILBIGER et al., 2012).

A frequência do alelo A do polimorfismo rs11568820 do gene *VDR* foi similar entre os grupos NG (35,1%) e DM2 (36,5%) no nosso estudo. A frequência do alelo A de acordo com Mencej-Bedrac et al. (2009) foi de 19,45% em mulheres pós-menopausa com osteoporose. Para Jain et al (2012), a frequência do alelo A foi de 45,6% em mulheres asiáticas. Esses resultados evidenciam que a frequência do alelo A varia entre as populações.

Em relação ao polimorfismo rs9340799 do gene *ESRI*, a frequência do alelo G no nosso estudo foi similar entre os grupos NG (37,2%) e DM2 (31,9%). Um estudo desenvolvido por Speer et al. (2001), verificou uma frequência de 29,0% do alelo G em DM2 caucasianos. Meshkani et al. (2012) evidenciaram uma frequência do alelo G de 41,7% em homens e de 38,8% em mulheres DM2, mostrando semelhança ao resultado encontrado em nossa pesquisa.

No presente estudo os polimorfismos *RANK* (rs1805034), *RANKL* (rs9525641), *OPG* (rs3102735 e rs2073618), *PPARG* (rs1801282 e rs2972162), *VDR* (rs11568820) e *ESRI*

(rs9340799) também foram analisados de acordo com o gênero, e não foram encontradas diferenças genotípicas entre homens e mulheres.

Este estudo avaliou pela primeira vez a relação entre os polimorfismos dos genes *RANK*, *RANKL*, *OPG*, *PPARG* e *VDR* e a expressão gênica em LTSP. Observou-se que os indivíduos DM2 portadores do alelo C do polimorfismo *RANK* rs1805034 apresentaram redução na transcrição de *RANK* em comparação aos não portadores, entretanto após o tratamento com pioglitazona não houve indução da transcrição gênica. Estes resultados demonstram que este polimorfismo altera a transcrição do gene *RANK*, provavelmente devido a troca do aminoácido alanina para valina no exon 7, demonstranto também que talvez o alelo C tenha uma função protetora no metabolismo ósseo dos indivíduos DM2. Hsu et al. (2006) mostraram que indivíduos portadores deste alelo apresentaram aumento da DMO. Além disso, a expressão aumentada de *RANK* está relacionada com aumento da osteoclastogênese e consequente reabsorção óssea (ATKINS et al., 2006).

Os indivíduos portadores do genótipo CC do polimorfismo *RANKL* rs9525641 apresentaram aumento na transcrição de *RANKL* em comparação aos portadores do genótipo CT e TT no grupo NG e diminuição da expressão de *RANKL* no grupo DM2 basal em comparação ao grupo NG. Um estudo evidenciou diminuição da DMO na espinha e aumento da expressão gênica de *RANKL* em tecido ósseo em mulheres pós-menopausa portadoras do genótipo CC+CT em comparação ao genótipo TT (TAKÁCS et al., 2010). Esses resultados evidenciam o possível envolvimento do alelo C no aumento da transcrição de *RANKL* no grupo NG. Contudo, no grupo DM2, a presença do alelo C parece desempenhar uma função protetora em relação ao aumento da reabsorção óssea. Devido à localização desse polimorfismo na região promotora, talvez o mesmo possa estar envolvido na regulação da transcrição de *RANKL*, independente da hiperglicemia ou do tratamento com pioglitazona (MENCEJ et al., 2006).

Os indivíduos DM2 portadores do genótipo CG para o polimorfismo *OPG* rs2073618 apresentaram diminuição na expressão de *OPG* em relação ao grupo NG e aumento da expressão de *OPG* após o tratamento com pioglitazona. Entretanto, Mencej-Bedrac et al. (2009) verificaram que mulheres pós-menopausa portadoras do genótipo CG apresentaram aumento da DMO na coluna lombar em comparação aos portadores dos genótipos CC e GG. Esses resultados indicam o possível envolvimento do genótipo CG, com a diminuição da formação óssea nos indivíduos DM2 basal, contudo, após o tratamento com pioglitazona, houve aumento da formação óssea, demonstrando que os indivíduos portadores desse genótipo talvez possam apresentar uma proteção contra perda óssea induzida pela pioglitazona.

Para o polimorfismo rs1805034 do gene *RANK*, observou-se associação do alelo C com diminuição nas concentrações do cálcio ionizado em resposta ao tratamento com pioglitazona no grupo DM2. Esses resultados indicam que a presença desse alelo pode estar contribuindo com a redução de cálcio ionizado após o tratamento, porém, não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que avaliou a influência deste polimorfismo em resposta ao tratamento com pioglitazona.

Para o polimorfismo *RANKL* rs9525641, os indivíduos portadores do genótipo CT apresentaram maior redução nas concentrações séricas de glicose pós-prandial em resposta ao tratamento em comparação aos portadores do genótipo TT, evidenciando o possível envolvimento do genótipo CT com a melhora da resposta farmacológica da pioglitazona e possível efeito protetor deste genótipo contra a reabsorção óssea, já que estudos indicam que a hiperglicemia ativa a reabsorção óssea através da supressão da atividade osteoblástica e aumento da atividade osteoclástica (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2012).

Observou-se que, para o polimorfismo *OPG* rs3102735, os indivíduos portadores do alelo C apresentaram aumento nas atividades séricas de tALP antes do tratamento e aumento

nas atividades séricas de tALP e bALP após o tratamento com pioglitazona em comparação aos indivíduos portadores do alelo T. Não foram encontradas na literatura pesquisas que associaram esse polimorfismo com os marcadores ósseos tALP e bALP. Porém, o presente trabalho e outros estudos evidenciaram que as atividades séricas tALP e bALP diminuíram após o tratamento com pioglitazona (GLINTBORG et al., 2008) e rosiglitazona (BERBEROGLU et al., 2007). Hsu et al. (2006) evidenciaram que os indivíduos portadores do genótipo CC do polimorfismo *OPG* rs3102735 apresentaram menor risco de fraturas no quadril comparadas aos outros genótipos (HSU et al., 2006). Estes resultados indicam uma possível associação do alelo C com o aumento da formação óssea nos indivíduos DM2 antes e após o tratamento.

Observou-se que, para o polimorfismo *PPARG* rs1801282 (Pro12Ala), os indivíduos portadores do alelo G apresentaram redução nas concentrações séricas de glicose pós-prandial antes e em resposta ao tratamento. Diversos trabalhos associaram o alelo G com menor risco para o desenvolvimento de diabetes (ALTSHULER et al., 2000; MEMISOGLU et al., 2003; FLOREZ et al., 2007). Entretanto, a presença do alelo G parece não afetar o tratamento com pioglitazona, resultados semelhantes foram reportados por Blüher et al. (2003).

Para o polimorfismo *PPARG* rs2972162, observou-se que os indivíduos portadores do genótipo CT e TT apresentaram redução nas concentrações séricas de insulina após o tratamento com pioglitazona em comparação aos indivíduos portadores do genótipo CC. Tavares et al. (2005b) associaram o alelo T do polimorfismo *PPARG* rs2972162 com redução nas concentrações séricas de triglicerídeos e redução no índice aterogênico plasmático. Esses resultados sugerem que o alelo T possa estar envolvido na melhora da resistência insulínica nos indivíduos DM2 tratados com pioglitazona.

Para o polimorfismo *ESRI* rs9340799, observou-se que os indivíduos portadores do alelo G apresentaram aumento nas concentrações séricas de cálcio ionizado no grupo NG e

DM2 basal e redução na atividade sérica de tALP no grupo DM2 basal. Um estudo de meta-análise envolvendo 27 trabalhos verificou um efeito protetor do alelo A em relação à diminuição da DMO em comparação aos indivíduos portadores do alelo G (WANG et al., 2012), evidenciando que o alelo G em nosso estudo possa estar relacionado com diminuição da formação óssea nos indivíduos NG e principalmente nos indivíduos DM2.

Estes resultados sugerem que os polimorfismos estudados estão pouco envolvidos com a determinação da resposta farmacológica a pioglitazona. Adicionalmente, diferenças na farmacocinética da pioglitazona e no estado metabólico do paciente podem também contribuir para a variação da resposta terapêutica entre os portadores dos diferentes genótipos desses polimorfismos.

Ao analisarmos os experimentos em camundongos C57BL/J6, observou-se aumento do peso e das concentrações séricas de glicose e de colesterol total no grupo submetido à indução de diabetes em comparação ao grupo controle, demonstrando possível aumento da resistência insulínica nesse modelo experimental. Um estudo desenvolvido por Fraulob et al. (2010), semelhante ao nosso modelo, evidenciou que camundongos C57BL/J6, os quais receberam dieta hiperlipídica, desenvolveram síndrome metabólica e resistência insulínica.

Verificou-se neste estudo aumento da expressão do mRNA dos genes *RANK* e *RANKL* associado ao aumento da expressão do mRNA das citocinas pró-inflamatórias *IL6* e *TNFA* no grupo DH em comparação ao grupo controle em fêmures de camundongos. Também foi observado aumento da separação trabecular (Tb.Sp) e diminuição do volume ósseo (BV/TV) no grupo DH em comparação ao grupo controle. Esses resultados sugerem que o aumento do peso, das concentrações séricas de glicose e de colesterol total, devido à dieta hiperlipídica, possam ter ocasionado aumento do processo inflamatório e, consequentemente, resistência insulínica, provocando alterações metabólicas que contribuíram para o aumento da reabsorção óssea nesse modelo. Algumas pesquisas evidenciam a relação entre diabetes e a reabsorção

óssea em modelos animais. Um estudo evidenciou aumento na razão do mRNA de *RANKL*/*OPG* em tíbias de ratos diabéticos em comparação ao grupo controle, sugerindo aumento no processo de reabsorção óssea nesses animais (AMORIM, DE et al., 2008). Botolin & Mccabe (2006) também evidenciaram que a hiperglicemia crônica pode contribuir para a supressão da diferenciação dos osteoblastos e para a perda óssea em camundongos diabéticos. Liu et al. (2007), constataram, através de análises histológicas, redução da quantidade de fibras de colágeno, demonstrando diminuição na formação da matriz óssea em ratos diabéticos em comparação ao grupo controle.

Muitos estudos vêm demonstrando que as células sanguíneas periféricas expressam aproximadamente 80% dos genes codificados pelo genoma humano e que esses genes respondem por alterações que ocorrem no “macro e micro-ambiente” do corpo humano. Através da continua interação entre as células sanguíneas e os compartimentos sistêmicos, associados à rápida mobilização dessas células, torna-se possível extrapolar que alterações que ocorram nos tecidos em resposta à injúria ou doença, induzindo alterações na expressão gênica, talvez possam ser refletidas nas células sanguíneas periféricas (LIEW et al., 2006). Nossos resultados em modelo animal confirmam nossos resultados em humanos, demonstrando aumento da expressão de genes envolvidos no processo de reabsorção óssea, tanto em fêmures quanto em LTSP no estado de hiperglicemia não controlado. Podendo-se deduzir que as células sanguíneas periféricas podem refletir alterações que ocorram nos tecidos.

Os experimentos em camundongos C57BL/J6 realizados neste estudo demonstraram que após 16 semanas de tratamento com pioglitazona não houve alterações nos parâmetros bioquímicos e histomorfométricos em comparação ao grupo DH. No entanto, observou-se diminuição apenas da expressão de *TNFA* no fêmur em comparação ao grupo DH. Um estudo desenvolvido por Sorocéanu et al. (2004) evidenciou que camundongos não diabéticos

(n=27), tratados com rosiglitazona (3mg/Kg/dia) por 12 semanas, apresentaram diminuição da DMO, do volume trabecular ósseo (BV/TV), do número trabecular (Tb.N), da espessura trabecular (Tb.Th) e aumento da separação trabecular (Tb.Sp), entretanto, as concentrações séricas de OC e de tALP não se alteraram. Syversen et al. (2009) mostraram que ratos (n=8) tratados com pioglitazona (35mg/Kg/dia) por 16 semanas apresentaram diminuição da DMO, do conteúdo mineral ósseo e do volume trabecular (BV/TV). Não foram observadas diferenças nas concentrações séricas de insulina e de OC, contudo, as concentrações séricas de OPG diminuíram após o tratamento. Os ensaios *in vitro* não evidenciaram alteração da expressão de *PPARG* após o tratamento com pioglitazona (SYVERSEN et al., 2009). Esses resultados divergentes devem-se, provavelmente, ao pequeno número amostral e a falta de marcadores ósseos mais específicos, como OC e bALP, para avaliação de possíveis correlações com a expressão do mRNA em fêmures. Contudo, não foi visto na literatura nenhum trabalho avaliando a expressão do mRNA de *RANK*, *RANKL*, *OPG*, *PPARG*, *IL6*, *TNFA*, *VDR* e *PTH* em fêmures de camundongos em resposta ao tratamento com pioglitazona.

Coletivamente, pode-se sugerir que houve aumento do processo de reabsorção óssea nos pacientes DM2 e nos modelos animais submetidos à dieta hiperlipídica e o tratamento com pioglitazona talvez possa agravar a perda óssea no DM2.

CONCLUSÕES

A diminuição das concentrações séricas de OC e da expressão de *OPG* e aumento da expressão de *VDR*, sugerem aumento do processo de reabsorção óssea nos DM2 antes do tratamento.

O aumento da expressão de *OPG* foi associado positivamente com cálcio ionizado, enquanto que o aumento da expressão de *VDR* foi associado negativamente com bALP, sugerindo aumento do processo de reconstrução óssea nos DM2 antes do tratamento.

O tratamento com pioglitazona aumentou a reabsorção óssea, através da diminuição de tALP, bALP e aumento de tACP e TNF-α sérico.

O aumento da expressão de *OPG* e *VDR*, foi associado negativamente com tALP e OC respectivamente em resposta ao tratamento com pioglitazona, sugerindo indução da perda óssea.

Nos indivíduos DM2 antes do tratamento, o alelo C do SNP *RANK* rs1805034 foi associado com proteção óssea, através da diminuição da expressão de *RANK*.

Nos indivíduos DM2, o alelo C do SNP *RANKL* rs9525641 foi associado com melhora da resposta farmacológica, através da diminuição da glicemia em resposta ao tratamento.

O alelo C do SNP *OPG* rs3102735 foi associado com o aumento da formação óssea, através do aumento de tALP e bALP nos indivíduos DM2 antes e após o tratamento.

O genótipo CG do SNP *OPG* rs2073618 foi associado com aumento da transcrição de *OPG*, sugerindo efeito protetor contra perda óssea nos indivíduos DM2 após o tratamento.

O alelo G do SNP *PPARG* rs1801282 foi associado menor risco para o desenvolvimento de diabetes.

O alelo T do SNP *PPARG* rs2972162 foi associado com a melhora da resposta insulínica nos pacientes DM2 tratados com pioglitazona.

Nos indivíduos DM2, o alelo G do SNP *ESRI* rs9340799 foi associado com redução da formação, através do aumento de cálcio ionizado e diminuição de tALP.

A indução da dieta hiperlipídica nos camundongos mostrou-se um bom modelo de processo inflamatório demonstrado pelo aumento da expressão de *TNFA* e *IL6*.

O aumento da reabsorção óssea no modelo experimental foi comprovada pelo aumento da expressão de *RANK* e *RANKL*, e histomorfometricamente com aumento da separação trabecular e diminuição do volume ósseo em tíbias.

Este estudo demonstra que a hiperglicemia altera expressão dos genes envolvidos no remodelamento ósseo, tanto em LTSP em humanos, como em tecido ósseo de camundongos; o tratamento com pioglitazona talvez possa acentuar o quadro de reabsorção óssea. Além disso, pode-se constatar associação entre os polimorfismos genéticos, a expressão gênica e os marcadores ósseos e metabólicos nos indivíduos DM2, reforçando que as relações entre DM2 e a perda óssea são muito complexas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBLOWI, J.; KAYAL, R. A; SIQUERIA, M. et al. High levels of tumor necrosis factor-alpha contribute to accelerated loss of cartilage in diabetic fracture healing. **The American Journal of Pathology**, v. 175, n. 4, p. 1574–85, 2009.

ALBRIGHT, F.; REIFENSTEIN, E. **Parathyroid Glands and Metabolic Bone Disease: Selected Studies**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1948.

ALTSHULER, D.; HIRSCHHORN, J.; KLANNEMARK, M. et al. The common PPARG Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. **Nature Genetics**, v. 26, n. september, p. 76–80, 2000.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Standards of medical care in diabetes--2012. **Diabetes Care**, v. 35 Suppl 1, n. October 2011, p. S11–63, 2012.

AMORIM, F. P. L. G. DE; ORNELAS, S. S.; DINIZ, S. F. et al. Imbalance of RANK, RANKL and OPG expression during tibial fracture repair in diabetic rats. **Journal of Molecular Histology**, v. 39, n. 4, p. 401–8, 2008.

AN, J. J.; HAN, D. H.; KIM, D. M. et al. Expression and regulation of osteoprotegerin in adipose tissue. **Yonsei Medical Journal**, v. 48, n. 5, p. 765–72, 2007.

ANDERSON, D.M.; MARASKOVSKY, E.; BILLINGSLEY, W. 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.

ARKO, B.; PREZELJ, J.; KOCIJANCIC, A. Association of the osteoprotegerin gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. **Maturitas**, v. 51, n. 3, p. 270–9, 2005.

ATKINS, G.; KOSTAKIS, P.; VINCENT, C. et al. RANK expression as a cell surface marker of human osteoclast precursors in peripheral blood, bone marrow, and giant cell tumors of bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 21, n. 9, 2006.

BABSON, A.L.; OLSON, D.R.; PALMIERI, T. et al. The IMMULITE assay tube: a new approach to heterogeneous ligand assay. **Clinical Chemistry**, v. 37, n. 9, p. 1521–1522, 1991.

BALDOCK, P. A.; THOMAS, G. P.; HODGE, J. M. et al. Vitamin D Action and Regulation of Bone Remodeling: Suppression of Osteoclastogenesis by the Mature Osteoblast. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 21, n. 10, p. 1618–1626, 2006.

BAUD'HUIN, M.; LAMOUREUX, F.; DUPLOMB, L. et al. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 18, p. 2334–50, 2007.

BECK, G. R.; KHAZAI, N. B.; BOULOUX, G. F. et al. The effects of thiazolidinediones on human bone marrow stromal cell differentiation in vitro and in thiazolidinedione-treated patients with type 2 diabetes. **Translational Research**, p. 1–11, 2012.

BERBEROGLU, Z.; GURSOY, A.; BAYRAKTAR, N. et al. Rosiglitazone decreases serum bone-specific alkaline phosphatase activity in postmenopausal diabetic women. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 9, p. 3523–30, 2007.

BISCETTI, F.; STRAFACE, G.; GIOVANNINI, S. et al. Association between TNFRSF11B gene polymorphisms and history of ischemic stroke in Italian diabetic patients. **Human Genetics**, 2012.

BLÜHER, M.; LÜBBEN, G.; PASCHKE, R. Analysis of the Relationship Between the Pro12Ala Variant in the PPARG-2 Gene and the Response Rate to Therapy With Pioglitazone in Patients With Type 2. **Diabetes Care**, v. 26, n. 3, p. 825–831, 2003.

BODMER, M.; MEIER, C.; KRAENZLIN, M. E. et al. Risk of fractures with glitazones: a critical review of the evidence to date. **Drug Safety**, v. 32, n. 7, p. 539–47, 2009.

BONORA, E.; TARGHER, G.; ALBERICHE, M. et al. Homeostasis Model Assessment Closely Mirrors the Glucose Clamp Technique in the Assessment of Insulin Sesitivity. **Diabetes Care**, v. 23, n. 1, p. 57–63, 2000.

BOTOLIN, S.; MCCABE, L. R. Chronic hyperglycemia modulates osteoblast gene expression through osmotic and non-osmotic pathways. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 99, n. 2, p. 411–24, 2006.

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

BUCK, D. W.; DUMANIAN, G. A. Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 129, n. 6, p. 1314–20, 2012.

CANALIS, E.; GIUSTINA, A.; BILEZIKIAN, J. P. Mechanisms of Anabolic Therapies or Osteoporosis. **Bone**, p. 905–916, 2007.

CARIOU, B.; CHARBONNEL, B.; STAELS, B. Thiazolidinediones and PPARγ agonists: time for a reassessment. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 23, n. 5, p. 205–15, 2012.

CAROLINO, I. D. R.; MOLENA-FERNANDES, C. A.; TASCA, R. S. et al. Risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 16, n. 2, p. 238–244, 2008.

CAULEY, J. A.; SEELEY, D. G.; ENSRUD, K. et al. Estrogen Replacement Therapy and Fractures in Older Women. **Annals of Internal Medicine**, v. 122, n. 1, p. 9–16, 1995.

CHAMBERS, T. J.; FULLER, K. How are osteoclasts induced to resorb bone? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1240, p. 1–6, 2011.

CHEN, DAN; JIN, G.; WANG, Y. et al. Genetic variants in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene are associated with risk of lung cancer in a Chinese population. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 2, p. 342–50, 2008.

CHOI, J. Y.; SHIN, A.; PARK, S. K. et al. Genetic polymorphisms of OPG, RANK, and ESR1 and bone mineral density in Korean postmenopausal women. **Calcified Tissue International**, v. 77, n. 3, p. 152–9, 2005.

CLARKE, B. L.; KHOSLA, S. Physiology of bone loss. **Radiologic Clinics of North America**, v. 48, n. 3, p. 483–95, 2010.

CLOWES, J. A; EGHBALI-FATOURECHI, G. Z.; MCCREADY, L. et al. Estrogen action on bone marrow osteoclast lineage cells of postmenopausal women in vivo. **Osteoporosis International**, v. 20, n. 5, p. 761–9, 2009.

COLEMAN, C.M.; STROJE, R. **Clinica Chimica Acta**, v. 13, p. 401, 1966.

CONFAVREUX, C. B. Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism. **Kidney International**, v. 79, n. 121, p. S14–9, 2011.

CONNERTY, H. V.; BRIGGS, A. Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 3, p. 290–296, 1966.

CROCKETT, J. C.; MELLIS, D. J.; SCOTT, D. I. et al. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. **Osteoporosis International**, v. 22, n. 1, p. 1–20, 2011.

DAILY, J.A.; ERTINGSHAUSEN, G. Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the “Centrifichem”. **Clinical Chemistry**, v. 18, p. 263, 1972.

DASTANI, Z.; LI, R.; RICHARDS, B. Genetic Regulation of Vitamin D Levels. **Calcified Tissue International**, 2012.

DATTA, N. S.; ABOU-SAMRA, A. B. PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. **Cellular Signalling**, v. 21, n. 8, p. 1245–54, 2009.

DEBIAIS, F. Thiazolidinediones: antidiabetic agents with effects on bone. **Joint Bone Spine**, v. 76, n. 3, p. 221–3, 2009.

DISTEFANO, J. K.; WATANABE, R. M. Pharmacogenetics of Anti-Diabetes Drugs. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 3, n. 8, p. 2610–2646, 2010.

DONG, S.-S.; LIU, X.-G.; CHEN, Y. et al. Association analyses of RANKL/RANK/OPG gene polymorphisms with femoral neck compression strength index variation in Caucasians. **Calcified Tissue International**, v. 85, n. 2, p. 104–12, 2009.

DUARTE, V. M. G.; RAMOS, A. M. O.; REZENDE, L. A; et al. Osteopenia: a bone disorder associated with diabetes mellitus. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 23, n. 1, p. 58–68, 2005.

EUN, I.-S.; PARK, W. W.; SUH, K. T. et al. Association between osteoprotegerin gene polymorphism and bone mineral density in patients with adolescent idiopathic scoliosis. **European Spine Journal**, v. 18, n. 12, p. 1936–40, 2009.

FELSON, D.; ZHANG, Y.; HANNAN, M. The effect of postmenopausal estrogen therapy on bone density in elderly women. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 16, p. 1141–1146, 1993.

FIELDS, A. J.; KEAVENY, T. M. Trabecular architecture and vertebral fragility in osteoporosis. **Current Osteoporosis Reports**, v. 10, n. 2, p. 132–40, 2012.

FLOREZ, J. C.; JABLONSKI, K. A; SUN, M. W. et al. Effects of the type 2 diabetes-associated PPARG P12A polymorphism on progression to diabetes and response to troglitazone. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 4, p. 1502–9, 2007.

FRAULOB, J. C.; OGG-DIAMANTINO, R.; FERNANDES-SANTOS, C. et al. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 46, n. 3, p. 212–23, 2010.

FRIEDWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D. . Estimation of the concentration of low-density lipoprotein – an integrated approach to mechanisms and disorders. **The New England Journal of Medicine**, v. 276, n. 32, 1967.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, A.; ARZATE, H.; GIL-CHAVARRÍA, I.; et al. High glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells. **Bone**, v. 50, n. 1, p. 276–288, 2012.

GLINTBORG, D.; ANDERSEN, M.; HAGEN, C. et al. Association of pioglitazone treatment with decreased bone mineral density in obese premenopausal patients with polycystic ovary syndrome: a randomized, placebo-controlled trial. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 5, p. 1696–701, 2008.

GOLTZMAN, D.; MIAO, D.; PANDA, D. K. et al. Effects of calcium and of the Vitamin D system on skeletal and calcium homeostasis: lessons from genetic models. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 89-90, n. 1-5, p. 485–9, 2004.

GOPALAKRISHNAN, V.; VIGNESH, R.; ARUNAKARAN, J. et al. Effects of glucose and its modulation by insulin and estradiol on BMSC differentiation into osteoblastic lineages. **Biochemical Cell Biology**, v. 84, p. 93–101, 2006.

GREY, A. Skeletal consequences of thiazolidinedione therapy. **Osteoporosis International**, v. 19, n. 2, p. 129–37, 2008.

GREY, A. Thiazolidinedione-induced skeletal fragility--mechanisms and implications. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 11, n. 4, p. 275–84, 2009.

GRUNTMANIS, U.; FORDAN, S.; GHAYEE, H. K. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone increases bone resorption in women with type 2 diabetes: a randomized, controlled trial. **Calcified Tissue International**, v. 86, n. 5, p. 343–9, 2010.

HIMELFARB, S. T.; SILVA, F. A; ARAZI, S. S. et al. Tumor necrosis factor-α and interleukin-6 expression in leukocytes and their association with polymorphisms and bone markers in diabetic individuals treated with pioglitazone. **Drug Metabolism and Drug Interactions**, v. 26, n. 1, p. 37–40, 2011.

HOLICK, M. F. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. **Annals of Epidemiology**, v. 19, n. 2, p. 73–8, 2009.

HSU, Y.-H.; NIU, T.; TERWEDOW, H. A. et al. Variation in genes involved in the RANKL/RANK/OPG bone remodeling pathway are associated with bone mineral density at different skeletal sites in men. **Human Genetics**, v. 118, n. 5, p. 568–77, 2006.

HUANG, J. C.; SAKATA, T.; PFLEGER, L. L. et al. PTH Differentially Regulates Expression of RANKL and OPG. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19, n. 2, 2004.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Global guideline for Type 2 diabetes. 2012.

INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM. [International HapMap project]. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 789–96, 2003.

ISMAIL-BEIGI, F. Pathogenesis and Glycemic Management of Type 2 Diabetes. **Archives of Iranian Medicine**, v. 15, n. 4, p. 239–246, 2012.

JAFFE, M. **Physiology Chemistry**, v. 10, p. 391–400, 1866.

JAIN, R.; HURST, P. VON; STONEHOUSE, W. Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with insulin resistance and response to vitamin D. **Metabolism**, v. 61, n. 3, p. 293–301, 2012.

KANAZAWA, I.; YAMAGUCHI, T.; YAMAUCHI, M. et al. Serum undercarboxylated osteocalcin was inversely associated with plasma glucose level and fat mass in type 2 diabetes mellitus. **Osteoporosis Iternational**, 2010.

KANIS, J A; ODÉN, A.; MCCLOSKEY, E. V. et al. A systematic review of hip fracture incidence and probability of fracture worldwide. **Osteoporosis International**, v. 23, n. 9, p. 2239–56, 2012.

KAPINAS, K.; DELANY, A. M. MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. **Arthritis Research & Therapy**, v. 13, n. 3, p. 220, 2011.

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

KEARNS, A. E.; KHOSLA, S.; KOSTENUIK, P. J. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 2, p. 155–92, 2008.

KHALIL, N.; SUTTON-TYRRELL, K.; STROTMEYER, E. S. et al. Menopausal bone changes and incident fractures in diabetic women: a cohort study. **Osteoporosis International**, 2010.

KHOSLA, S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. **Endocrinology**, v. 142, n. 12, p. 5050–5, 2001.

KIM, J. G.; KIM, J. H.; KIM, J. Y. et al. Association between osteoprotegerin (OPG), receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK), and RANK ligand (RANKL) gene polymorphisms and circulating OPG, soluble RANKL levels, and bone mineral density in Korean postmenopausal women. **Menopause**, v. 14, n. 5, p. 913–8, 2007.

KONDO, T.; KITAZAWA, R.; MAEDA, S.; KITAZAWA, S. 1 alpha,25 dihydroxyvitamin D3 rapidly regulates the mouse osteoprotegerin gene through dual pathways. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 19, n. 9, p. 1411–9, 2004.

LANE, N. E. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 194, n. 2 Suppl, p. S3–11, 2006.

LEE, S.-K.; LORENZO, J. A. Regulation of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin mRNA expression by parathyroid hormone is predominantly mediated by the protein kinase a pathway in murine bone marrow cultures. **Bone**, v. 31, n. 1, p. 252–9, 2002.

LEE, S.-K.; LORENZO, J. A. Cytokines regulating osteoclast formation and function. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 18, n. 4, p. 411–8, 2006.

LEE, Y. H.; WOO, J.-H.; CHOI, S. J. et al. Associations between osteoprotegerin polymorphisms and bone mineral density: a meta-analysis. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 1, p. 227–34, 2010.

LESLIE, W. D.; RUBIN, M. R.; SCHWARTZ, A. V. et al. Type 2 diabetes and bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 11, p. 2231–7, 2012.

LEUNG, K.; FUNG, K.; SHER, A. et al. Plasma Bone-Specific Alkaline Phosphatase as an Indicator os Osteblastic Activity. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 75, n. B, p. 288–292, 1993.

LI, H.; CUI, R.; CAI, H. et al. The effect of thiazolidinediones on bone mineral density in Chinese older patients with type 2 diabetes. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 28, n. 1, p. 77–81, 2010a.

LI, W.-F.; HOU, S.-X.; YU, B. et al. Genetics of osteoporosis: accelerating pace in gene identification and validation. **Human Genetics**, v. 127, n. 3, p. 249–85, 2010b.

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, n. 2, p. 345–50, 2006.

LIEFDE, I. I. DE; KLIFT, M. V. D.; LAET, C. E. D. H. DE. et al. Bone mineral density and fracture risk in type-2 diabetes mellitus: the Rotterdam Study. **Osteoporosis International**, v. 16, n. 12, p. 1713–20, 2005.

LIEW, C.-C.; MA, J.; TANG, H.-C.; ZHENG, R.; DEMPSEY, A. A. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 147, n. 3, p. 126–32, 2006.

LIU, Z.; ARONSON, J.; WAHL, E. C. et al. A novel rat model for the study of deficits in bone formation in type-2 diabetes. **Acta Orthopaedica**, v. 78, n. 1, p. 46–55, 2007.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 - delta delta CT Method. **Gene Expression**, v. 408, p. 402–408, 2001.

LOKE, Y.; SINGH, S.; FURBER, C. Long-term use of thiazolidinediones and fractures in type 2 diabetes: a meta-analysis. **Canadian Medical Association Journal**, v. 180, n. 1, p. 32–9, 2009.

MATTHEWS, D.; HOSKER, J.; RUDENSKI, A. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412–9, 1985.

MEMISOGLU, A.; HU, F. B.; HANKINSON, S. E. et al. Prospective Study of the Association Between the Proline to Alanine Codon 12 Polymorphism in the PPAR Gene and Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, n. 10, p. 2915–2917, 2003.

MENCEJ, S.; PREZELJ, J.; KOCIJANCIC, A. et al. Association of TNFSF11 gene promoter polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women. **Maturitas**, v. 55, n. 3, p. 219–26, 2006.

MENCEJ-B, S.; PREZELJ, J.; KOCJAN, T. et al. The combinations of polymorphisms in vitamin D receptor, osteoprotegerin and tumour necrosis factor superfamily member 11 genes are associated with bone mineral density. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 42, n. 3, p. 239–47, 2009.

MESHKANI, R.; SABERI, H.; MOHAMMADTAGHVAEI, N. et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with type 2 diabetes and fasting glucose in male subjects. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 359, n. 1-2, p. 225–33, 2012.

MOORE, A. F.; FLOREZ, J. C. Genetic susceptibility to type 2 diabetes and implications for antidiabetic therapy. **Annual Review of Medicine**, v. 59, p. 95–111, 2008.

MORINGA, T.; NAKAGAWA, N.; YASUDA, H. et al. Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor. **European Journal of Biochemistry**, v. 254, p. 685–691, 1998.

MOTYL, K. J.; MCCABE, L. R.; SCHWARTZ, A. V. Bone and glucose metabolism: a two-way street. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 503, n. 1, p. 2–10, 2010.

NAKASHIMA, T.; TAKAYANAGI, H. Osteoclasts and the immune system. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 27, n. 5, p. 519–29, 2009.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**, 1996. Washington D.C: Natl Academy Press.

NELSON, M. R.; BACANU, S.; MOSTELLER, M. et al. Genome-wide approaches to identify pharmacogenetic contributions to adverse drug reactions. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 9, n. 1, p. 23–33, 2009.

NGUYEN, T. V; CENTER, J. R.; EISMAN, J. A. Pharmacogenetics of osteoporosis and the prospect of individualized prognosis and individualized therapy. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity**, v. 15, n. 6, p. 481–8, 2008.

NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey III. Disponível em: <www.cdc.gov./nchs/nhanes/nh3data.htm>.

OLOKOBA, A. B.; OBATERU, O. A; OLOKOBA, L. B. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. **Oman Medical Journal**, v. 27, n. 4, p. 269–73, 2012.

PARK, J. S.; CHO, M. H.; NAM, J. S. et al. Effect of pioglitazone on serum concentrations of osteoprotegerin in patients with type 2 diabetes mellitus. **European Journal of Endocrinology**, v. 164, n. 1, p. 69–74, 2011.

PFAFFL, M. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 16–21, 2001.

RÄKEL, A; SHEEHY, O.; RAHME, E. et al. Osteoporosis among patients with type 1 and type 2 diabetes. **Diabetes & Metabolism**, v. 34, n. 3, p. 193–205, 2008.

RHEE, E.-J.; OH, K.-W.; YUN, E.-J. et al. The association of Pro12Ala polymorphism of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene with serum osteoprotegerin levels in healthy Korean women. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 39, n. 6, p. 696–704, 2007.

ROSZER, T. Inflammation as death or life signal in diabetic fracture healing. **Inflammation Research**, v. 60, n. 1, p. 3–10, 2011.

RZONCA, S. O.; SUVA, L. J.; GADDY, D. et al. Bone is a target for the antidiabetic compound rosiglitazone. **Endocrinology**, v. 145, n. 1, p. 401–6, 2004.

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

SBD 2012-2013. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2012-2013.

SCHOPPET, M. RANK Ligand and Osteoprotegerin: Paracrine Regulators of Bone Metabolism and Vascular Function. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, n. 4, p. 549–553, 2002.

SCHWARTZ, A. V. Diabetes, TZDs, and Bone: A Review of the Clinical Evidence. **PPAR Research**, v. 2006, p. 24502, 2006.

SCHWARTZ, A. V; SELLMEYER, D. E. Thiazolidinediones: new evidence of bone loss. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 4, p. 1232–4, 2007.

SETH, A.; SY, V.; PAREEK, A. Thiazolidinediones (TZDs) Affect Osteoblast Viability and Biomarkers Independently of the TZD Effects on Aromatase. **Hormone and Metabolic Research**, 2012.

SHAND, B.; SCOTT, R.; CONNOLLY, S. et al. Comparative study on the efficacy of pioglitazone in Caucasian and Maori-Polynesian patients with poorly controlled type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity & Metabolism**, v. 9, n. 4, p. 540–7, 2007.

SILBIGER, V.; HIRATA, M.; LUCHESSI, A. et al. Differentiation of African components of ancestry to stratify groups in a case-control study of a Brazilian urban population. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 16, n. 6, p. 524–30, 2012.

SILVA, I.; BRANCO, J. RANK/RANKL/OPG: Literature Review. **Acta Reumatologia Portuguesa**, v. 36, p. 209–218, 2011.

SLATTERY, M. L.; HERRICK, J.; WOLFF, R. K. et al. CDX2 VDR polymorphism and colorectal cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 16, n. 12, p. 2752–5, 2007.

SOROCÉANU, M. A.; MIAO, D.; BAI, X.-Y. et al. Rosiglitazone impacts negatively on bone by promoting osteoblast/osteocyte apoptosis. **The Journal of Endocrinology**, v. 183, n. 1, p. 203–16, 2004.

SPEER, G; CSEH, K.; WINKLER, G. et al. Vitamin D and estrogen receptor gene polymorphisms in type 2 diabetes mellitus and in android type obesity. **European Journal of Endocrinology**, v. 144, n. 4, p. 385–9, 2001.

ST-ARNAUD, R. The direct role of vitamin D on bone homeostasis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, p. 1–6, 2008.

STUMVOLL, M.; GOLDSTEIN, B. J.; HAEFTEN, T. W. VAN. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. **Lancet**, v. 365, n. 9467, p. 1333–46, 2005.

STUMVOLL, M.; GOLDSTEIN, B. J.; HAEFTEN, T. W. VAN. Type 2 diabetes: pathogenesis and treatment. **Lancet**, v. 371, n. 9631, p. 2153–6, 2008.

SUGIUCHI H.; UJI Y.; OKABE, H. . I. T. Direct measurement of high-density lipoprotein cholestrol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated -ciclodextrin. **Clinical Chemistry**, v. 41, p. 717–723, 1995.

SURAMPUDI, P.; JOHN-KALARICKAL, J.; FONSECA, V. Emerging concepts in the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. **Mount Sinai Journal of Medicine**, p. 216–226, 2009.

SUZUKI, K.; KUROSE, T.; TAKIZAWA, M. et al. Osteoclastic 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, n. 2, p. 117–25, 2005.

SYVERSEN, U.; STUNES, A. K.; GUSTAFSSON, B. I. et al. Different skeletal effects of the peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)alpha agonist fenofibrate and the PPARgamma agonist pioglitazone. **BMC Endocrine Disorders**, v. 9, p. 10, 2009.

TAKÁCS, I.; LAZÁRY, A.; KÓSA, J. P. et al. Allelic variations of RANKL/OPG signaling system are related to bone mineral density and in vivo gene expression. **European Journal of Endocrinology**, v. 162, n. 2, p. 423–31, 2010.

TAKANO, M.; OTSUKA, F.; MATSUMOTO, Y. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activity is involved in the osteoblastic differentiation regulated by bone morphogenetic proteins and tumor necrosis factor-α. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 348, n. 1, p. 224–32, 2012.

TALKE, H.; SHUBERT, G. . Enzymatic urea determination in blood and serum in the Warburg optical test. **Klin Wochenschr**, v. 43, n. 1, p. 174–175, 1965.

TAVARES, V.; HIRATA, R. D. C; RODRIGUES, A. . et al. Effect of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma C161T polymorphism on lipid profile in Brazilian patients with Type 2 diabetes mellitus. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 28, n. 2, p. 129–36, 2005a.

TAVARES, V.; HIRATA, RDC; RODRIGUES, A. et al. Association between Pro12Ala polymorphism of the PPARG2 gene and insulin sensitivity in Brazilian patients with type 2 diabetes mellitus. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 7, p. 605–611, 2005b.

TENNE, M.; MCGUIGAN, F.; JANSSON, L. et al. Genetic variation in the PTH pathway and bone phenotypes in elderly women: evaluation of PTH, PTHLH, PTHR1 and PTHR2 genes. **Bone**, v. 42, n. 4, p. 719–27, 2008.

THEILL, L. E.; BOYLE, W. J.; PENNINGER, J. M. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. **Annual Review of Immunology**, v. 20, n. 4, p. 795–823, 2002.

THEOLEYRE, S.; WITTRANT, Y.; TAT, S. K. et al. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 15, n. 6, p. 457–75, 2004.

THRAILKILL, K. M.; LUMPKIN, C. K.; BUNN, R. C. et al. Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 289, n. 5, p. E735–45, 2005.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using 4-amino phenazone as oxygen acceptor. **Journal Clinical Pathology**, v. 22, n. 2, p. 246, 1969.

VANDESOMPELE, J.; PRETER, K. DE; PATTYN, F. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. 0034.1–0034.11, 2002.

VESTERGAARD, P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes--a meta-analysis. **Osteoporosis International**, v. 18, n. 4, p. 427–44, 2007.

WAN, Y.; CHONG, L.-W.; EVANS, R. M. PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice. **Nature Medicine**, v. 13, n. 12, p. 1496–503, 2007.

WANG, K.; SHI, D.; SUN, L. et al. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density: Meta analysis. **Chinese Medical Journal**, v. 125, n. 14, p. 2589–2597, 2012.

WANG, W. Y. S.; BARRATT, B. J.; CLAYTON, D. G.; et al. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. **Nature Reviews - Genetics**, v. 6, n. 2, p. 109–18, 2005.

WEIBEL, E. R. Pratical Sterological Methods for Morphometric Cytology. **The Journal of Cell Biology**, v. 30, n. 1, p. 23–38, 1966.

WENNBERG, P. TNF-alpha gene polymorphism and plasma TNF-alpha levels are related to lumbar spine bone area in healthy female Caucasian adolescents. **European Journal of Endocrinology**, v. 146, n. 5, p. 629–634, 2002.

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

WHO. **World Health Organization. Prevention and Management of Osteoporosis.** Geneva: WHO Marketing and Dissemination, 2003.

WHO 2012. World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html#>. Acesso em: 9/11/2012.

WONGDEE, K.; CHAROENPHANDHU, N. Osteoporosis in diabetes mellitus: Possible cellular and molecular mechanisms. **World Journal of Diabetes**, v. 2, n. 3, p. 41–8, 2011.

YILMAZ-AYDOGAN, H.; KURNAZ, O.; KURT, O. et al. Effects of the PPARG P12A and C161T gene variants on serum lipids in coronary heart disease patients with and without Type 2 diabetes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 358, n. 1-2, p. 355–63, 2011.

YKI-J, H. Thiazolidinediones. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, p. 1106–1118, 2004.

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

ZUPAN, J.; MENCEJ-BEDRAC, S.; JURKOVIĆ-MLAKAR, S. et al. Gene-gene interactions in RANK/RANKL/OPG system influence bone mineral density in postmenopausal women. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 118, n. 1-2, p. 102–6, 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A

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.

APÊNDICE B

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 freqüência?……**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)		
Fosfatase Alcalina (U/L)		
Fosfatase Acida Total (U/L)		

APÊNDICE C

AUTHOR'S COPY | AUTORENEXEMPLAR

Drug Metab Drug Interact 2011;26(1):37–40 © 2011 by Walter de Gruyter • Berlin • New York. DOI 10.1515/DMDI.2011.100

Short Communication

Tumor necrosis factor-α and interleukin-6 expression in leukocytes and their association with polymorphisms and bone markers in diabetic individuals treated with pioglitazone

Silvia T. Himelfarb[1,*], Fernanda A. Silva[1], Simone S. Arazi[2], Cristina M. Farjado[1], Adriana Garofalo[2], Marcelo C. Bertolami[2], Adriana Bertolami[2], Andre Faludi[2], Marcelo F. Sampaio[2], Adriana A. Rezende[3], Rosario D.C. Hirata[1] and Mario H. Hirata[1]

[1] Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Sao Paulo, Brazil
[2] Dante Pazzanese Institute of Cardiology, São Paulo, Brazil
[3] Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

Abstract

Background: Pioglitazone is a peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) activator used in the treatment of type 2 diabetes (DM2) patients and it has been suggested that can induce bone loss. Tumor necrosis factor-α (TNFα) and interleukin-6 (IL-6) mRNA expression in blood leukocytes and the relationship with polymorphisms and bone markers in DM2 treated with pioglitazone were investigated.

Methods: DM2 (n=53) and normoglycemic (NG, n=52) individuals were included. DM2 patients were treated with pioglitazone (45 mg/day/16 weeks). mRNA expression was evaluated by real-time polymerase chain reaction (PCR). *TNFA* −308G>A and *IL6* −174G>C polymorphisms were detected by PCR-RFLP and high resolution melting polymerase chain reaction (HRM-PCR).

Results: Pioglitazone reduced bone specific alkaline phosphatase (bALP) and increased TNFα in DM2 group ($p<0.001$). DM2 or pioglitazone did not influence TNFα and IL-6 expression ($p>0.05$). *TNFA* −308A allele was associated with reduced basal TNFα mRNA levels in NG and DM2 and reduced alkaline phosphatase (tALP) after treatment ($p<0.05$). *IL6* −174C allele was associated with decreased oral glucose tolerance test (OGTT)−2 h in DM2 individuals ($p<0.05$).

Conclusions: *TNFA −308G>A* polymorphism appear to be involved in regulation of gene expression independently of hyperglycemia and its interaction with pioglitazone may modify tALP, a important bone marker. *IL6* −174G>C variant is related with reduced risk of postprandial hyperglycemia but not with mRNA expression or bone markers.

Keywords: IL-6; pioglitazone; TNFα; type 2 diabetes.

Diabetes has been shown to enhance expression of tumor necrosis factor-α (TNFα) that stimulate formation of osteoclasts and are responsible for resorption of mineralized cartilage and bone (1). Insulin insufficiency, hyperglycemia and oxidative stress, hallmarks type 2 diabetes (DM2), reduce osteoblast differentiation, increase osteoclast activity, alter apoptosis of chondrocytes and osteoblasts leading to impaired fracture healing in diabetic patients (1). In diabetes mice model, it was shown that high level expression of pro-osteoclastogenic factors in chondrocytes is mediated at least in part by TNFα dysregulation in diabetic fracture healing, showing that TNFα is particularly important in enhancing osteoclastogenesis (2). Data indicate that peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) agonists such as pioglitazone increase insulin sensitivity. Activation of PPARγ has been shown to play an important role in bone morphogenesis favoring osteoclastogenesis. PPARγ promotes osteoclast differentiation by regulating c-fos expression in RANKL signaling pathways that control lineage commitment and osteoclast activation (3). Additionally, there is strong evidence that PPARγ stimulates adipocyte differentiation and suppresses osteoblast differentiation (4). In culture of mononuclear cells, was shown that TNFα could differentiate human peripheral monocytes into activated osteoclasts, and PPARγ agonists may inhibited the TNFα mediated osteoclastogenesis (5). These findings prompted us to examine the effect of PPARγ agonists on TNFα and interleukin-6 (IL-6) mediated osteoclastogenesis in DM2 patients.

The aim of this study was to investigate the mRNA expression of TNFα and IL-6 in peripheral blood leukocytes (PBL) and their association with gene polymorphisms and alterations bone markers levels in DM2 patients treated with pioglitazone.

Fifty-three DM2 and 52 normoglicemic (NG) individuals, aged 30–70 years, were recruited from outpatients at the

*Corresponding author: Silvia T. Himelfarb, Av. Prof. Lineu Prestes 580, B17, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil
Phone: +55 11 30913660, Fax: +55 11 38132197,
E-mail: sthimelfarb@usp.br
Received December 2, 2010; accepted February 15, 2011; previously published online April 12, 2011

AUTHOR'S COPY | AUTORENEXEMPLAR

AUTHOR'S COPY | AUTORENEXEMPLAR

Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC), Sao Paulo, SP, Brazil. DM2 was diagnosed according to American diabetes association criteria (ADA) (6). Individuals with thyroid, liver or renal disease, pregnant women, or under therapy with β-adrenergic blockers, angiotensin converter enzyme inhibitors, thiazide diuretics, adrenal steroid hormones, fibrates and oral hypoglycemic agents (metformin, repaglinide and acarbose), or insulin were not included in this study. DM2 subjects (never treated) were treated with increasing doses of oral pioglitazone during 16 weeks (15, 30, 45 and 45 mg each 4 weeks once daily). The study protocol was approved by the Ethics Committee of IDPC, Sao Paulo, SP, Brazil. All participants gave written informed consents.

DM2 patients had higher baseline concentrations of fasting and oral glucose tolerance test (OGTT)–2 h glucose, glycohemoglobin (HbA1c), insulin and HOMA-IR [homeostasis model assessment-(insulin resistance)], and lower ionized calcium compared with NG individuals ($p<0.05$) (Table 1). Lower levels of ionized calcium found may result from increasing bone resorption in DM2 individuals. Activation of osteoclasts removes the mineralized matrix of bone, releasing ionized calcium into extracellular fluid and altering calcium homeostasis and signaling (7).

Reduction of fasting and OGTT–2 h glucose, HbA1c, fasting insulin and HOMA-IR, after treatment of DM2 patients (Table 1) demonstrates the hypoglycemic and insulin sensitizer effects of pioglitazone (8). Pioglitazone also showed an inhibitory effect on bone-specific alkaline phosphatase (bALP) levels in DM2 patients. A randomized controlled trial has shown that rosiglitazone (4 mg) reduces plasma bALP in diabetic postmenopausal women, indicating an inhibitory effect on activity of osteoblasts cells (9). DM2 did not influence TNFα and IL-6 serum levels, while serum TNFα was increased by pioglitazone ($p=0.001$). Treatment of DM2 patients with pioglitazone (30 mg) plus sitagliptin (100 mg) for 12 months was shown to decrease TNFα in serum (10). These differential

Table 1 Clinical and laboratory data of DM2 and normoglycemic individuals.

Variables	NG (52)	DM2 (53)		DM2 (53)	
		Basal	p^1	Pioglitazone	p^2
Age, years	55.6±10.2	60.2±8.9	0.015[b]		
Women, %	69.8 (37)	34.0 (18)	0.001[a]		
Arterial hypertension, %	45.3 (24)	35.8 (19)	0.429[a]		
Obesity, %	37.7 (20)	45.3 (24)	0.554[a]		
BMI, kg/m^2	28.9±7.0	30.7±4.8	0.129[b]		
Hypercholesterolemia, %	5.8 (3)	15.1 (8)	0.214[a]		
Menopause, %	67.6 (25)	66.7 (12)	0.811[a]		
Tobacco consumption, %	7.7 (4)	9.4 (5)	0.927[a]		
Alcohol consumption, %	9.6 (5)	5.7 (3)	0.650[a]		
Physical activity, %	34.6 (18)	34.0 (18)	0.894[a]		
Family history of CAD, %	48.1 (25)	32.1 (17)	0.099[a]		
Fasting glucose, mmol/L	5.1±0.7	6.7±1.3	0.001[b]	5.9±1.1	0.001[d]
OGTT–2 h glucose, mmol/L	5.8±1.9	10.3±3.2	0.001[b]	8.4±2.5	0.001[d]
Hb1Ac, %	5.8±0.4	6.5±1.0	0.001[c]	6.3±1.4	0.019[c]
Fasting insulin, mol/L	8.7±5.8	13.9±9.2	0.001[c]	10.4±6.5	0.002[d]
HOMA-IR, %	2.1±1.5	4.1±2.6	0.001[b]	2.7±1.7	0.001[d]
HOMA-β, %	119.8±83.1	100.6±80.8	0.151[c]	104.4±104.8	0.959[c]
Total calcium, mmol/L	2.3±0.3	2.3±0.1	0.578[c]	2.3±0.1	0.541[c]
Ionized calcium, mmol/L	1.2±0.1	1.1±0.1	0.002[b]	1.16±0.11	0.319[d]
Phosphate, mmol/L	1.11±0.2	0.17±0.2	0.426[c]	1.1±0.2	0.897[d]
tACP, U/L	3.5±1.9	3.3±1.7	0.561[b]	3.2±0.8	0.643[d]
tALP, U/L	74.9±27.1	70.9±22.6	0.415[b]	67.2±21	0.224[d]
bALP, U/L	30.4±15.4	29.0±17.3	0.660[b]	13.6±6.6	0.001[d]
TNFα, pg/mL	6.5±2.2	6.4±3.0	0.902[c]	13.0±6.0	0.001[d]
IL-6, pg/mL	4.8±3.7	6.8±11.6	0.826[c]	6.8±9.5	0.500[c]
Minor allele frequency, %					
TNFA −308G>A, %	11.3 (11)	16.4 (17)	0.570[a]		
IL6 −174G/C, %	26.9 (28)	34.9 (37)	0.006[a]		

Number of individuals is in parenthesis. Obesity (BMI>30 kg/m^2), hypertension (blood pressure >140/90 mm Hg or use of anti-hypertensives), hypercholesterolemia (LDL cholesterol >4.14 mmol/L), current cigarette smoking (daily intake ≥1 cigarettes), alcohol consumption (intake of beer, wine, and distilled spirits of ≥1 g/day), physical activity (practice of sports, for at least 2 h/week). [a]Categorical variables were compared by χ^2-test; [b]continuous variables are presented as mean±SD and compared by t-test; [c]Mann-Whitney; [d]paired t-test or [e]Wilcoxon signed rank test. p^1, DM2 compared with NG; p^2, pioglitazone compared with basal; BMI, body mass index; CAD, coronary artery disease; OGTT, oral glucose tolerance test; Hb1Ac, glycohemoglobin; HOMA-beta, homeostasis model assessment for beta cell function; HOMA-IR, homeostasis model assessment-(insulin resistance); tACP, total acid phosphatase; tALP, alkaline phosphatase; bALP, bone specific alkaline phosphatase; IL6, interleukin-6; TNFα, tumor necrosis factor-α.

AUTHOR'S COPY | AUTORENEXEMPLAR

AUTHOR'S COPY | AUTORENEXEMPLAR

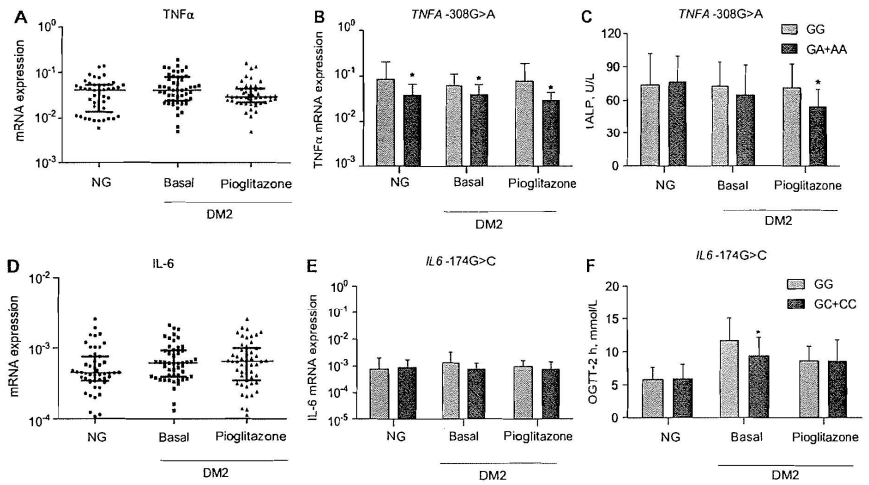


Figure 1 TNFα mRNA expression (A), influence of *TNFA* −308G>A variant on TNFα mRNA expression (B) and tALP (C) and IL-6 mRNA expression (D), influence of *IL6* −174G>C variant on IL-6 mRNA expression (E) and OGTT−2 h (F) of NG and DM2 before and after pioglitazone therapy.

Data are shown as median and interquartile ranges (A, D) and as mean ± SE (B, C, E, F) of values compared by Mann-Whitney test and Wilcoxon signed rank test. Chi-square analysis was used to test the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). For *TNFA* −308G>A polymorphism, individuals carrying GG genotype were compared with the GA+AA genotypes carriers. For *IL6* −174G>C variant, GG genotype carriers were compared with those carrying CG+CC genotypes. *TNFA* −308G>A (rs 11800629) and *IL6* −174G>C (rs 1800795) polymorphisms were determined by HRM-PCR and PCR-RFLP respectively, using the sequences of primers previously described (13, 14). *$p<0.05$. TNFα, tumor necrosis factor-α; IL-6, interleukin-6; OGTT, oral glucose tolerance test.

results may be influenced by time, dosage and combination of the pioglitazone treatment that remains to be investigated.

The distribution of *TNFA* −308A and *IL6* −174C genotypes was as expected from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) in both groups (data not shown). *TNFA* −308G>A variant had similar genotype and allele frequencies between DM2 (A allele: 16.4%) and NG (A allele: 11.3%) groups ($p>0.05$), suggesting lack of relationship with DM2, as previously reported (11). *IL6* −174C allele was more frequent in DM2 (34.9%) than in NG (26.9%, $p<0.05$). Moreover, individuals carrying C allele (GC+CC genotypes) had two times higher risk for DM2 (OR: 2.43, 95% CI: 1.11–5.34, $p=0.032$) than noncarriers. In a previous study, the frequency of the C allele was significantly higher in DM2 individuals with metabolic syndrome compared to those without this metabolic disease (12) suggesting a relationship of this allele with worst metabolic control in DM2 patients.

Global TNFα and IL-6 mRNA levels in PBL were not influenced neither by hyperglycemic status (DM2) nor by treatment ($p>0.05$) (Figure 1A and D, respectively). *TNFA* −308A allele carriers had decreased TNFα mRNA expression than those carrying GG genotypes, in both NG and DM2 before and after treatment ($p<0.05$, Figure 1B). *IL6* −174G>C polymorphism did not influence gene expression in NG and DM2 (Figure 1E). This is the first evidence that there is a relationship between *TNFA −308G>A* polymorphism and TNFα mRNA expression in leukocytes in both DM2 and NG individuals. It has been suggested that the *TNFA −308G>A* region may play a role in TNFα transcription in human T cell model (15).

Reduction of alkaline phosphatase (tALP) in response to pioglitazone was found in *TNFA* −308A allele carriers ($p=0.017$) (Figure 1C). This result suggests that the interaction of *TNFA* −308A allele and pioglitazone treatment may influence the osteoblastic activity, that is reflected by the reduction of the bone marker tALP (9). A multivariate analysis model was performed in order to identify significant differences in sex and other variables, with mRNA expression and genotypes. However, there were no statistically significant differences between groups (data not shown).

IL6 −174C allele was associated with decreased OGTT−2 h in DM2 individuals ($p<0.05$) (Figure 1F) but not to other metabolic markers (data not shown). It was previously shown that *IL6* −174C allele is associated with higher plasma levels of IL-6, particularly in inflammatory situations, showing that IL-6 might have an aetiological role in insulin signaling (16). These findings may explain the results obtained in this study,

AUTHOR'S COPY | AUTORENEXEMPLAR

AUTHOR'S COPY | AUTORENEXEMPLAR

demonstrating the insulin influence, decreasing OGTT–2 h in *IL6* –174C allele carriers.

In conclusion, the *TNFA –308G>A* polymorphism appear to be involved in regulation of gene expression in PBL independently of the hyperglycemic status and its interaction with pioglitazone may modulate bone markers such as tALP. *IL6* –174G>C variant is related with reduced risk of postprandial hyperglycemia but not with mRNA expression nor bone markers.

Conflict of interest statement

Authors' conflict of interest disclosure: The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

Research funding: None declared.
Employment or leadership: None declared.
Honorarium: None declared.

References

1. Roszer T. Inflammation as death or life signal in diabetic fracture healing. Inflamm Res 2011;60:3–10.
2. Alblowi J, Kayal RA, Siqueira M, McKenzie E, Krothapalli N, McLean J, et al. High levels of tumor necrosis factor-alpha contribute to accelerated loss of cartilage in diabetic fracture healing. Am J Pathol 2009;175:1574–85.
3. Wan Y, Chong LW, Evans RM. PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice. Nat Med 2007;13:1496–503.
4. Wan Y. PPARgamma in bone homeostasis. Trends Endocrinol Metab 2010.
5. Hounoki H, Sugiyama E, Mohamed SG, Shinoda K, Taki H, Abdel-Aziz HO, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits TNF-alpha-mediated osteoclast differentiation in human peripheral monocytes in part via suppression of monocyte chemoattractant protein-1 expression. Bone 2008;42:765–74.
6. Standards of medical care in diabetes–2009. Diabetes Care 2009; 32(Suppl 1):S13–61.
7. Duarte VM, Ramos AM, Rezende LA, Macedo UB, Brandao-Neto J, Almeida MG, et al. Osteopenia: a bone disorder associated with diabetes mellitus. J Bone Miner Metab 2005:23: 58–68.
8. Marchetti P, Lupi R, Del Guerra S, Bugliani M, D'Aleo V, Occhipinti M, et al. Goals of treatment for type 2 diabetes: beta-cell preservation for glycemic control. Diabetes Care 2009;32(Suppl 2):S178–83.
9. da Silva AG, Lazaretti-Castro M. Diabetes mellitus, thiazolidinediones and fractures: an unfinished story. Arq Bras Endocrinol Metabol 2010;54:345–51.
10. Derosa G, Maffioli P, Salvadeo SA, Ferrari I, Ragonesi PD, Querci F, et al. Effects of sitagliptin or metformin added to pioglitazone monotherapy in poorly controlled type 2 diabetes mellitus patients. Metabolism 2010;59:887–95.
11. Liu HL, Lin YG, Wu J, Sun H, Gong ZC, Hu PC, et al. Impact of genetic polymorphisms of leptin and TNF-alpha on rosiglitazone response in Chinese patients with type 2 diabetes. Eur J Clin Pharmacol 2008:64:663–71.
12. Stephens JW, Hurel SJ, Lowe GDO, Rumley A, Humphries SE. Association between plasma IL-6, the IL6-174G > C gene variant and the metabolic syndrome in type 2 diabetes mellitus. Mol Genet Metab 2007:90:422–8.
13. Perrey C, Turner SJ, Pravica V, Howell WM, Hutchinson IV. ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta and TGF-beta 1 gene polymorphisms. Transpl Immunol 1999;7:127–8.
14. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. J Clin Invest 1998:102:1369–76.
15. Elahi MM, Asotra K, Matata BM, Mastana SS. Tumor necrosis factor alpha -308 gene locus promoter polymorphism: an analysis of association with health and disease. Biochim Biophys Acta 2009;1792:163–72.
16. Brull DJ, Montgomery HE, Sanders J, Dhamrait S, Luong L, Rumley A, et al. Interleukin-6 gene –174g>c and –572g>c promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2001:21:1458–63.

AUTHOR'S COPY | AUTORENEXEMPLAR

ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO CEP FCF

Oficio 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 osteoblastica e osteoclastica em diabeticos 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, devera ser apresentado um relat6rio parcial, de acordo com 0 Artigo 18 - item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

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

Av. Prof. LIneu Prestes. n8 580. Bloco 13 A - CIdade UnIversIUIrIa - CEP 05508-900 - 5.\0 Paulo - SP Fone 1 Fax: (11) 3091-3677 -
MIlall: cepfc:f@!usp.br

ANEXO B – APROVAÇÃO CEP INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA

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: "Avaliaçâo da Atividade Osteoblastica e OsteocJastica 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) 0 projeto preenche os requisitos fundamentais das resoluções CNS 196196, 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 Praticas de Pesquisa Clinica do ICH-GCP.
c) 0 Comitê de Ética em Pesquisa avaliou 0 Protocolo de Estudo e 0 Termo de Consentimento livre e Esdarecido.
d) 0 Comitê de Ética em Pesquisa segue os preceitos das resoluções CNS196196, 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 Clinica 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 C – APROVAÇÃO CEP UFRN

Universidade Federal do Rio Grande do Norte
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Natal (RN), 19 de agosto de 2009.

Prezada Professora Dra. Adriana Augusto de Rezende,

Vimos, através deste documento, informar que o projeto "PADRONIZAÇÃO DE UMA DIETA HIPERLIPÍDICA PARA INDUÇÃO DO *DIABETES MELLITUS* TIPO 2 EM MODELO ANIMAL E ESTUDO DE FORMAÇÃO GENÔMICA ENVOLVENDO O EFEITO DE ANTIDIABÉTICOS", **protocolo n° 022/2009**, após análise das adequações, foi considerado **APROVADO** por esta Comissão.

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13 do Regimento, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório(s) de acompanhamento que deverá(ão) ser entregue(s) dentro do(s) prazo(s) estabelecido(s) abaixo:

- Relatório Final: **Dezembro de 2010** (30 dias após a conclusão do projeto).

Agradecemos a sua atenção e nos colocamos a disposição para eventuais esclarecimentos.

Cordialmente,

Elaine C. Gavioli
Presidente da CEUA

UFRN – Campus Universitário – Centro de Biociências
Av. Salgado Filho, S/N – CEP: 59072-970 – Natal/RN
Telefone: (84) 3215-3419 ramal 210
e-mail: ceua@reitoria.ufrn.br

ANEXO D - FICHA DO ALUNO

Janus Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 5576089/2 - Silvia Tchernin Himelfarb

Email:	sthimelfarb@usp.br
Data de Nascimento:	06/08/1977
Cédula de Identidade:	RG - 1064547456 - RS
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico - Universidade Luterana do Brasil - Rio Grande do Sul - Brasil - 2001
Mestrado:	Mestre em Farmácia - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2008

Curso:	Doutorado
Programa:	Farmácia (Análises Clínicas)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	26/08/2008
Início da Contagem de Prazo:	26/08/2008
Data Limite:	22/02/2013
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Mario Hiroyuki Hirata - 26/08/2008 a 25/02/2013 E.Mail: mhhirata@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 21/10/2010
Licença(s) Maternidade:	180 dias (Licença Maternidade) Período de 17/03/2012 a 12/09/2012
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 13/05/2011
Data do Depósito do Trabalho:	15/01/2013
Título do Trabalho:	"Efeito da pioglitazona sobre o remodelamento ósseo em diabetes tipo 2"
Data Máxima para Aprovação da Banca:	18/03/2013
Data de Aprovação da Banca:	16/01/2013
Data Máxima para Defesa:	16/04/2013
Data da Defesa:	25/02/2013
Resultado da Defesa:	Aprovado

Acessar a tese no 'Banco de Teses' **da USP**

Histórico de Ocorrências: Ingressou no Doutorado em 26/08/2008
Trancado de 17/03/2012 até 12/09/2012
Titulado em 25/02/2013

Última ocorrência: Titulado em 25/02/2013

9136 - 5576089/2 - Silvia Tchernin Himelfarb

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0512 Bioquímica Clínica, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sao Paulo (1)	02/02/2009	30/06/2009	-	3	0	-	-	-
BIO5713-3/1	O Mundo dos RNAs (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	06/03/2009	03/07/2009	120	8	86	B	N	Concluída
MCP5848-1/1	Publicação de Trabalhos Científicos em Medicina: Manual de Sobrevivência para Futuros Autores (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	01/04/2009	21/04/2009	45	3	100	A	N	Concluída
BIF5707-2/5	Regulação da Expressão Gênica em Processos Fisiológicos (Instituto de Biociências	04/05/2009	15/06/2009	120	8	95	A	N	Concluída

Universidade de São Paulo)

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	20	20	22
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	20	20	22

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 08/03/2010.

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

9136 - 5576089/2 - Silvia Tchernin Himelfarb

Comissão julgadora da tese de doutorado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
72297	Mario Hiroyuki Hirata	FCF - USP	Presidente
1298811	Marcelo Chiara Bertolami	IDPC - Externo	Membro
1324427	Marisa Passarelli	Docente Externo	Membro
3098242	Alice Cristina Rodrigues	Externo	Membro
7537356	Maria Jose Brion Martinez	SANTIAGO - Externo	Membro

Última ocorrência: Titulado em 25/02/2013

Impresso em: 18/04/13 16:15:52

ANEXO E – CURRÍCULO LATTES DO ALUNO

Silvia Tchernin Himelfarb

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Silvia Tchernin Himelfarb
Nome em citações bibliográficas HIMELFARB, Silvia Tchernin;Himelfarb, Silvia T.
Sexo Feminino

Filiação Luiz Himelfarb e Frida Tchernin Himelfarb
Nascimento 06/08/1977 - São Paulo/SP - Brasil
Carteira de Identidade 1064547456 SSP - RS - 23/10/1991
CPF 924.134.040-15

Endereço residencial Estrada da Aldeia 369, casa 58
Granja Viana - Cotia
06709-300, SP - Brasil
Telefone: 11 47020866

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Av. Professor Lineu Prestes 580
Butantan - Sao Paulo
05315-970, SP - Brasil
Telefone: 11 30913660

Endereço eletrônico
E-mail para contato : sthimelfarb@yahoo.com.br
e-mail alternativo : sthimelfarb@usp.br

Formação acadêmica/titulação

2008 Doutorado em Ciências Farmacêuticas.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Efeito da Pioglitazona sobre o Remodelamento Ósseo em Diabetes Tipo 2, Ano de obtenção: 2013
Orientador: Mario Hiroyuki Hirata
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2006 - 2008 Mestrado em Farmácia (Análises Clínicas).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Avaliação da atividade osteoblástica e osteoclástica em pacientes em diabéticos tipo 2 em tratamento com pioglitazonas, Ano de obtenção: 2008
Orientador: Mário Hiroyuki Hirata
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2003 - 2004 Especialização em Diagnóstico Genético E Molecular.
Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, Brasil
Título: Regulação Neuroendócrina no Traumatismo crânio-encefálico
Orientador: Andréa Regner

2003 - 2003 Especialização em Administração Hospitalar e Negócios Em Saúde.
Instituto de Administração Hospitalar e Ciências da Saúde, IAHCS, Brasil
Título: Implementação de um Programa de satisfação do Cliente no laboratório Bioclínico

1997 - 2001 Graduação em Farmácia e Bioquímica.
Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, Brasil

Formação complementar

2011 - 2011 Curso de curta duração em Next Generation Sequencing.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, FCF/USP, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em 66 º Curso Intensivo de Cardiologia.
Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, IDPC, Sao Paulo, Brasil

2008 - 2008 Curso de curta duração em Treinamento de PCR em Tempo Real.
Life Tecnologies , LIFE TEC, Sao Paulo, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em II Curso de Biologia Molecular e Celular.
Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, IDPC, Sao Paulo, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em Real Time PCR: Users Meeting 2007.
Life Tecnologies , LIFE TEC, Sao Paulo, Brasil

2007 - 2007 Curso de curta duração em 65 º Curso Intensivo de Cardiologia.
Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, IDPC, Sao Paulo, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Bionumerics.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em I curso de atualização em biologia molecular aplic.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Real Time PCR: Users Meeting 2006.
Life Tecnologies , LIFE TEC, Sao Paulo, Brasil

2002 - 2002 Curso de curta duração em Bioquímica Clínica.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

2002 - 2002 Curso de curta duração em Biologia Molecular.
Famapólis, SINDIFAR-SC, Brasil

2002 - 2002 Curso de curta duração em Estudos de Casos Clínicos Em Hematologia.
Farmapolis, SIDIFAR -SC, Brasil

2001 - 2001 Curso de curta duração em Interpretação de Exames Laboratoriais.
XII Congresso Paulista de Farmacêuticos, CRF-SP, Brasil

2000 - 2000 Curso de curta duração em Citologia Ginecológica.
Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Canoas, Brasil

1998 - 1998 Curso de curta duração em Quimioterapia Antineoplásica.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Luterana do Brasil - ULBRA

Vínculo institucional

2003 - 2004 Vínculo: estágio em pesquisa científica , Enquadramento funcional: estágio , Carga horária: 20, Regime: Parcial

1998 - 1998 Vínculo: bolsista , Enquadramento funcional: estágio , Carga horária: 12, Regime: Parcial

Atividades

05/2003 - 07/2004 Estágio, Programa de Pós Graduação Em Diagnóstico Genético e Molecular, Laboratório de Marcadores Moleculares de Dano Neural
Estágio:
ESTÁGIO EM PESQUISA CIENTÍFICA

08/1998 - 12/1998 Estágio, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Centro de Ciências da Saúde
Estágio:
monitoria das disciplinas de citologia e histologia

2. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

1999 - 1999 Vínculo: estágio voluntário , Enquadramento funcional: estágio , Carga horária: 16, Regime: Parcial

Atividades

01/1999 - 12/1999 Estágio, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica
Estágio:
ESTÁGIO EM PESQUISA CIENTÍFICA

3. Laboratório Bioclínico Ltda - NETLAB

Vínculo institucional

2000 - 2000 Vínculo: estágio , Enquadramento funcional: estágio , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

04/2000 - 10/2000 Estágio, Laboratório Privado, Microbiologia e Imunologia
Estágio:
estágio técnico-profissional voluntário

4. Hospital Mãe de Deus - HMD

Vínculo institucional

2001 - 2001 Vínculo: estágio , Enquadramento funcional: estágio curricular , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

03/2001 - 07/2001 Estágio, Hospital Mão de Deus, Setor de Farmácia Hospitalar
Estágio:
ESTÁGIO CURRICULAR

5. Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

Vínculo institucional

2001 - 2002 Vínculo: bolsista , Enquadramento funcional: bolsista , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

09/2001 - 08/2002 Estágio, Serviço de Patologia Clínica, Hematologia
Estágio:
bolsista em hematologia

6. Hospital de Pronto Socorro - HPS

Vínculo institucional

2002 - 2002 Vínculo: estágio curricular , Enquadramento funcional: estágio curricular , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

09/2002 - 12/2002 Estágio, Prefeitura Municipal de Porto Alegre, Setor de Microbiologia Bioquímica e Hematologia
Estágio:
estágio curricular em análises clínicas

7. Laboratório de Patologia Clínica - REDE LAC

Vínculo institucional

2003 - 2003 Vínculo: estágio técnico-profissional v , Enquadramento funcional: estágio voluntário , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

01/2003 - 02/2003 Estágio, Laboratório Privado, Setor de Imuno Hormônios
Estágio:
estágio técnico-profissional voluntário

8. Laboratório Marques Dalmeida - LMA

Vínculo institucional

2003 - 2005 Vínculo: analista de laboratório , Enquadramento funcional: analista de laboratório , Carga horária: 36, Regime: Parcial

Atividades

11/2003 - 03/2005 Serviço Técnico Especializado, Laboratório Privado, Cachoeirinha
Especificação:
analista de laboratório nos setores de uroanálise, parasitologia, hematologia e bioquímica

9. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2009 - 2009 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Programa de Aperfeiçoamento de Ensino , Carga horária: 6, Regime: Parcial
Outras informações:
Desenvolvimento de atividades didáticas junto à disciplina FBC0513 Bioquímica Clínica, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas

2008 - 2008 Vínculo: bolsista , Enquadramento funcional: Campanha Diabetes, Regime: Parcial
Outras informações:
Orientação de participantes na VIII Campanha de Diabetes da Faculdade de Ciências Farmacêuticas

2007 - 2007 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Programa de Aperfeiçoamento de Ensino , Carga horária: 6, Regime: Parcial
Outras informações:
Desenvolvimento de atividades didáticas junto à disciplina FBC0512 Bioquímica Clínica, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicilógicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas

2006 - 2006 Vínculo: bolsista , Enquadramento funcional: Campanha Diabetes,

Regime: Parcial
Outras informações:
Orientação de participantes na VI Campanha de controle de Diabetes

2006 - 2008 Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Pós-Graduação-Mestrado, Regime: Dedicação exclusiva

2005 - 2006 Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Aperfeiçoamento Profissional , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

---

Atividades

05/2005 - Atual Estágio, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Estágio:
APERFEIÇOAMENTO PROFISSIONAL

Áreas de atuação

1. Biologia Molecular
2. Analises Clínicas
3. Farmácia

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Bem

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **Himelfarb, Silvia T.**, Silva, Fernanda A., Arazi, Simone S., Farjado, Cristina M., Garofalo, Adriana, Bertolami, Marcelo C., Bertolami, Adriana, Faludi, Andre, Sampaio, Marcelo F., Rezende, Adriana A., Hirata, Rosario D.C., Hirata, Mario H.
Tumor necrosis factor-? and interleukin-6 expression in leukocytes and their association with polymorphisms and bone markers in diabetic individuals treated with pioglitazone. Drug Metabolism and Drug Interactions. , v.26, p.37 - 40, 2011.
Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1515/dmdi.2011.100]

2. ROCHA, Adriana Brondani da, ZANONI, Caroline, FREITAS, G. R., ANDRE, C., HIMELFARB, Silvia Tchernin, SCHNEIDER, Rogério Fett, GRIVICICH, I., BORGES, Leonardo Lucena, SCHWARTSMANN, Gilberto, KAUFMANN, Mauro, REGNER, Andrea Pereira
Serum Hsp70 as an early predictor of fatal outcome after severe traumatic brain injury in males. Journal of Neurotrauma. , v.22, p.966 - 977, 2005.
Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Vários. Home page: [doi:10.1089/neu.2005.22.966]

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. BORTOLIN, R. H., **Himelfarb, Silvia T.**, SANTOS, F. M., OLIVEIRA, A. M. L., FREIRE-NETO, F. P., BEZERRA, J. F., MORAIS, L. V. F., URURAHY, M. A. G., BARBOSA, A. C. S., LEMOS, B. S., BRITO, F. A., ALMEIDA, M. G., REZENDE, L. A., HIRATA, R. D. C., HIRATA, M. H., REZENDE, A. A.
Influence of High Glucose Concentration on Bone Metabolism Parameters in C57BL/6 Mice Fed With a High-Fat Diet In: 72nd Scientific Sessions, 2012, Philadelphia.
Journal of American Diabetes Association. , 2012.
Referências adicionais : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

2. HIMELFARB, Silvia Tchernin, SILVA, F. A., Arazi, S. S., Farjado, Cristina Moreno, Oliveira, Raquel, BERTOLAMI, M. C., Bertolami, Adriana, FALUDI, André, SAMPAIO, M. F., REZENDE, A. A., HIRATA, R. D. C., HIRATA, M. H.
Effects of pioglitazone on PPARG, TNFA and osteoprotegerin expression in leukocytes and bone turnover biomarkers in diabetic individuals. In: 5th Santorini Conference, 2010, Santorini, Grécia.
5th Santorini Conference Biologie Prospective 2010. , 2010. v.48. p.A67 -

Referências adicionais : Alemanha/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

3. SILVA, F. A., SHALEM, M. H., SAMPAIO, M. F., HIMELFARB, Silvia Tchernin, BERTOLAMI, M. C., MONACO, M. I., SOUSA, A., ARMAGANIJAN, D., HIRATA, R. D. C., HIRATA, M. H.
Association of the Atherosclerosis with TLR2, TLR4 and IL-6 polymorphisms in Type 2 Diabetes Patients In: XII Brazilian Congress of Atherosclerosis - Brazilian Society of Cardiology, 2009, Campinas.
Atherosclerosis suplements. Elsevier, 2009. v.10. p.14 - 15
Áreas do conhecimento : Biologia Molecular
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

4. HIRATA, M. H., HIMELFARB, Silvia Tchernin, MARQUES, M. F. S. F., SILVA, F. A., RODRIGUES, A. C., SAMPAIO, M. F., DINKHUYSEN, J. F., BERTOLAMI, M. C., ARMAGANIJAN, D., SILVA, V. F., REZENDE, A. A., MONACO, M. I., HIRATA, R. D. C.
Thiazolidinediones and its negative effects on bone metabolism in brazilian individuals with type 2 diabetes mellitus In: AACC Annual Meeting 2009, 2009, Chicago.
Clinical Chemistry. , 2009. v.55. p.A223 - A223
Áreas do conhecimento : Biologia Molecular
Referências adicionais : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

5. HIRATA, M. H., HIMELFARB, Silvia Tchernin, MARQUES, M. F. S. F., MONACO, M. I., RODRIGUES, A. C., SAMPAIO, M. F., DINKHUYSEN, J. F., BERTOLAMI, M. C., ARMAGANIJAN, D., SILVA, V. F., REZENDE, A. A., HIRATA, R. D. C.
Effects of pioglitazone on RANK and RANKL mRNA expression in peripheral blood leukocytes from indivuduals with type 2 diabetes mellitus In: AACC Annual Meeting 2008, 2008, Washington.
Clinical Chemestry. Washington: , 2008. v.54. p.A165 - A165
Referências adicionais : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

6. HIRATA, M. H., MARQUES, M. F. S. F., HIMELFARB, Silvia Tchernin, RODRIGUES, A. C., SILVA, V. F., MONACO, M. I., SAMPAIO, M. F., DINKHUYSEN, J. F., BERTOLAMI, M. C., ARMAGANIJAN, D., HIRATA, R. D. C.
Effects of pioglitazone on total PPARG, PPARG2, SUR and KIR 6.2 mRNA expression in p ripheral blood leukocytes from individuals with type 2 diabetes mellitus In: AACC Annual Meeting, 2008, 2008, Washington.
Clinical Chemestry. Washington: , 2008. v.54. p.A165 - A165
Referências adicionais : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

7. MARQUES, M. F. S. F., HIMELFARB, Silvia Tchernin, SILVA, V. F., MONACO, M. I., SAMPAIO, M. F., BERTOLAMI, M. C., ARMAGANIJAN, D., HIRATA, R. D. C., HIRATA, M. H.
Estudo da expressão gênica do PPARGAMA2, SUR1, KIR6.2 em indivíduos diabéticos melito tipo 2 (DMT2) em tratamento com pioglitazonas In: XV Congresso Paulista de Farmacêuticos, VII Seminário Internacional de Farmacêuticos, EXPOFAR 2007, 2007, São Paulo.
Revista Brasileira de Ciências Farnacêuticas. São Paulo: , 2007. v.43. p.65 - 65
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

8. HIMELFARB, Silvia Tchernin, MARQUES, M. F. S. F., SILVA, V. F., MONACO, M. I., SAMPAIO, M. F., ARMAGANIJAN, D., REZENDE, A. A., HIRATA, R. D. C., HIRATA, M. H.
Estudo da expressão gênica do RANK e RANKL em indivíduos diabéticos tipo 2 em tratamento com pioglitazonas In: XV Congresso Paulista de Farmacêuticos, VII Seminário Internacional de Farmacêuticos, EXPOFAR 2007, 2007, São Paulo.
Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. São Paulo: , 2007. v.43. p.62 - 62
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

9. HIMELFARB, Silvia Tchernin, ROCHA, Adriana Brondani da, COSTA, Francielle da, PINHEIRO, Guilherme Dutra, GEHRKE, Junia Thirzah, BORGES, Leonardo Lucena, SCHNEIDER, Rogério Fett, KAUFMANN, Mauro, SCHWARTSMANN, Gilberto, REGNER, Andrea Pereira, ZANONI, Caroline, FERNANDES, Reginaldo Mendonça
Investigação da proteína s100B sérica como potencial marcador prognóstico no traumatismo-crânio - encefálico severo em humanos In: IV Fórum de pesquisa Científica e tecnológica, IX salão de iniciação científica da Universidade luterana do brasil, 2003, canoas.
Iv Fórum de pesquisa científica e tecnológica, IX salão de iniciação científica. Porto alegre: Ulbra, 2003.
Áreas do conhecimento : Medicina
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

10. **HIMELFARB, Silvia Tchernin**
Efeito do Lítio sobre as concentrações séricas de Triacilgliceróis e colesterol total em pacientes com transtorno de humor Bipolar In: II Fórum de Pesquisa Científica e tecnológica, VII salão de iniciação Científica, 2001, Canoas.
II fórum de Pesquisa Científica e tecnológica, VII salão de Iniciação Científica. Canoas: Ulbra, 2001.
Áreas do conhecimento : Farmácia
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

11. HIMELFARB, Silvia Tchernin, A, Mascarenhas M, S, Frassetto S
Estudo do efeito do lítio sobre as concentrações séricas de colesterol total e triacilgliceróis em pacientes com transtorno de humor bipolar In: XII congresso paulista de farmacêuticos, 2001, São Paulo.
Revista brasileira de ciências farmacêuticas. são paulo: faculdade de ciências farmacêuticas, 2001. v.37. p.15 - 15
Áreas do conhecimento : Farmácia
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

12. HIMELFARB, Silvia Tchernin, ROMBALDI, Fernanda, CERESÉR, Keila Maria Mendes
Fármacos mais utilizados na terapia da gota e interações medicamentosas envolvendo o tratamento dos fatores associados In: XII congresso paulista de farmacêuticos, IV Seminário internacional de farmacêuticos, EXPOFAR, 2001, São Paulo.
Revista brasileira de Ciências farmacêuticas. São paulo: Faculdade de Ciências farmacêuticas, 2001. v.37. p.87 - 87
Áreas do conhecimento : Farmácia
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

13. HIMELFARB, Silvia Tchernin, DUARTE, Marisa Valquíria S, MASCARENHAS, Rita de Cássia G, CERESER, Keila Maria M, MASCARENHAS, Marcello A
Hipertensão no dabetes mellitus tipo 2: tratamento medicamentoso In: XII congresso paulista de farmacêuticos, IV Seminário internacional de farmacêuticos, EXPOFAR, 2001, São paulo.
Revista Brasileira de ciências Farmacêuticas. São Paulo: Faculdade de Ciências farmacêuticas, 2001. v.37. p.87 - 87
Áreas do conhecimento : Farmácia
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

Apresentação de trabalho e palestra

1. BORTOLIN, R. H., SANTOS, F. M., OLIVEIRA, A. M. L., FREIRE-NETO, F. P., BEZERRA, J. F., MORAIS, L. V. F., URURAHY, M. A. G., BARBOSA, A. C. S., LEMOS, B. S., BRITO, F. A., ALMEIDA, F. A. P., **Himelfarb, Silvia T.**, HIRATA, R. D. C., HIRATA, M. H., REZENDE, A. A.
Influence of HIgh Glucose Concentration on Bone Metabolism in Mice C57BL/6 Induced with High-Fat Diet, 2011. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Imira Plaza Hotel; Cidade: Natal; Evento: II International Synposium of Pharmaceutical Sciences; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal do Rio Grande do Norte

2. **Himelfarb, Silvia T.**
Avaliação da Atividade Osteoblástica e Osteoclástica em Diabéticos Tipo 2 e em Modelos Experimentais, 2010. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: FCF/USP; Cidade: São Paulo; Evento: II Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP; Inst.promotora/financiadora: FCF/USP

3. HIMELFARB, Silvia Tchernin, SILVA, F. A., Arazi, S. S., Farjado, Cristina Moreno, Oliveira, Raquel, BERTOLAMI, M. C., REZENDE, A. A., Bertolami, Adriana, FALUDI, André, SAMPAIO, M. F., HIRATA, R. D. C., HIRATA, M. H.
Effects of pioglitazone on PPARG, TNFA and osteoprotegerin expression in leukocytes and bone turnover biomarkers in diabetic indivuduals., 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Alemanha/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Cidade: Santorini; Evento: 5th Santorini Conference Biologie Prospective "Funtional Genomics towards Personalized Health Care".

4. SILVA, F. A., SHALEM, M. H., SAMPAIO, M. F., HIMELFARB, Silvia Tchernin, BERTOLAMI, M. C.,

MONACO, M. I., SOUSA, A., ARMAGANIJAN, D., HIRATA, R. D. C., HIRATA, M. H.
Association of the Atherosclerosis with TLR2, TLR4 and IL-6 polymorphisms in Type 2 Diabetics Patients, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: São Paulo; Cidade: Campinas; Evento: XII Brazilian Congress of Atherosclerosis - Brazilian Society of Cardiology; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Cardiologia

5. HIRATA, M. H., HIMELFARB, Silvia Tchernin, MARQUES, M. F. S. F., SILVA, F. A., RODRIGUES, A. C., SAMPAIO, M. F., DINKHUYSEN, J. F., BERTOLAMI, M. C., ARMAGANIJAN, D., SILVA, V. F., REZENDE, A. A., MONACO, M. I., HIRATA, R. D. C.
Thiazolidinediones and its negative effects on bone metabolism in brazilian individuals with type 2 diabetes mellitus, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Estados Unidos; Cidade: Chicago; Evento: AACC Annual Meeting 2009; Inst.promotora/financiadora: AACC

6. HIRATA, M. H., HIMELFARB, Silvia Tchernin, MARQUES, M. F. S. F., MONACO, M. I., RODRIGUES, A. C., SAMPAIO, M. F., DINKHUYSEN, J. F., BERTOLAMI, M. C., ARMAGANIJAN, D., SILVA, V. F., REZENDE, A. A., HIRATA, R. D. C.
Effects of pioglitazone on RANK and RANKL mRNA expression in peripheral blood leukocytes from individulas with type 2 diabetes mellitus, 2008. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Cidade: Washigton; Evento: AACC Annual Meetting 2008

7. HIRATA, M. H., MARQUES, M. F. S. F., HIMELFARB, Silvia Tchernin, RODRIGUES, A. C., SILVA, V. F., MONACO, M. I., SAMPAIO, M. F., DINKHUYSEN, J. F., BERTOLAMI, M. C., ARMAGANIJAN, D., HIRATA, R. D. C.
Effects of pioglitazone on total PPARG, PPARG2, SUR and KIR6.2 mRNA expression in peripheral blood leukocytes from individuals with type 2 diabetes mellitus, 2008. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Estados Unidos/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Cidade: Washington; Evento: Annual Meeting 2008

8. MARQUES, M. F. S. F., HIMELFARB, Silvia Tchernin, SILVA, V. F., MONACO, M. I., SAMPAIO, M. F., BERTOLAMI, M. C., ARMAGANIJAN, D., HIRATA, R. D. C., HIRATA, M. H.
Estudo da expressão gênica do PPARGAMA2, SUR1, KIR6.2 em indivíduos diabéticos melito tipo 2 (DMT2) tratados com pioglitazona, 2007. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários; Local: CRF-SP; Cidade: São Paulo; Evento: XV Congresso Paulista de Farmacêuticos; VII Seminário Internacional de Farmacêuticos; EXPOFAR'; Inst.promotora/financiadora: CRF-SP

9. HIMELFARB, Silvia Tchernin, MARQUES, M. F. S. F., SILVA, V. F., MONACO, M. I., SAMPAIO, M. F., ARMAGANIJAN, D., REZENDE, A. A., HIRATA, R. D. C., HIRATA, M. H.
Estudo da expressão gênica do RANK e RANKL em indivíduos diabéticos tipo 2 em tratamento com pioglitazona, 2007. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários; Local: CRF-SP; Cidade: São Paulo; Evento: XV Congresso Paulista de Farmacêuticos; VII Seminário Internacional de Farmacêuticos; EXPOFAR' 2007; Inst.promotora/financiadora: CRF-SP

10. **HIMELFARB, Silvia Tchernin**
Investigação da proteína S100B sérica como potencial marcador prognóstico no traumatismo crânio-encefálico severo em humanos, 2003. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários; Local: ULBRA; Cidade: Cotia; Evento: IV Fórum de Pesquisa Científica e Tecnológica; IX Salão de Iniciação Científica. ULBRA; Inst.promotora/financiadora: ULBRA

11. **HIMELFARB, Silvia Tchernin**
Estudo do efeito do Lítio sobre as concentrações séricas de colesterol total e triacilgliceróis em pacientes com transtorno do humor bipolar, 2001. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários; Local: ULBRA; Cidade: Canoas; Evento: II Fórum de Pesquisa Científica e Tecnológica; VII Salão de Iniciação Científica. ULBRA; Inst.promotora/financiadora: ULBRA

12. HIMELFARB, Silvia Tchernin, MASCARENHAS, Marcello A, FRASSETTO, S. S.
Estudo do efeito do Lítio sobre as concentrações séricas de colesterol total e triacilgliceróis em pacientes com transtorno do humor bipolar, 2001. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários; Local: CRF-SP; Cidade: São Paulo; Evento: XII Congresso Paulista de Farmacêuticos; IV Seminário Internacional de Farmacêuticos; EXPOFAR' 2001; Inst.promotora/financiadora: CRF-SP

13. OLIVEIRA, Diogo de, BADARACO, Patricie, OPPELT, Daniela Mendes, HIMELFARB, Silvia Tchernin, NEDEL, Márcio, KOMMERS, Trícia
Modulação da Fosforilação da GFAP em cerebelo de ratos jovens por receptores glutamatérgicos, 1999. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários; Local: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Cidade: Porto Alegre; Evento: XI Salão de Iniciação Científica; Inst.promotora/financiadora: Pró-Reitoria de Pesquisa/PROPESQ

Demais produções bibliográficas

1. Arazi, S. S., **HIMELFARB, Silvia Tchernin**
O papel da farmacogenética na terapia cardiovascular.. PROCARDIOL - Programa de Atualização em Cardiologia. Porto Alegre:Artmed, 2010. (Outra produção bibliográfica)
Palavras-chave: Farmacogenética
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

Produção técnica
Demais produções técnicas

1. **HIMELFARB, Silvia Tchernin**
Estrutura, Função e Propriedades Físico-Químicas dos Ácidos Nucléicos., 2010. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)
Referências adicionais : Brasil/Português. 4 horas. Meio de divulgação: Meio digital

2. HIMELFARB, Silvia Tchernin, SANTOS, Fabiana C. P.
Módulo de Biologia Molecular, 2010. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)
Referências adicionais : Brasil/Português. 4 horas. Meio de divulgação: Meio digital

3. HIMELFARB, Silvia Tchernin, HIRATA, M. H.
Genoma, Transcriptoma e Proteoma Aplicado à Cardiologia - Estrutura dos Ácidos Nucléicos", 2009. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
Referências adicionais : Brasil/Português. 4 horas. Meio de divulgação: Impresso

4. **HIMELFARB, Silvia Tchernin**
I Curso de atualização em Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico, 2006. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
Referências adicionais : Brasil/Português. 58 horas. Meio de divulgação: Impresso

Demais trabalhos
1. **HIMELFARB, Silvia Tchernin**
curso de metodos de extração de acidos nucleicos dentro do I curso de atualização em biologia molecular aplicada ao diagnóstico, 2006.
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

Eventos
Participação em eventos

1. **III Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas da FCFC/USP**, 2011. (Simpósio)

2. **X Simpósio de Biossegurança e Descartes de Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino e Pesquisa**, 2011. (Simpósio)

3. **5th Santorini Conference Biologie Prospective**, 2010. (Congresso)

4. **XII Congresso Brasileiro de Aterosclerose**, 2009. (Congresso)

5. **Seminários da comissão de Pesquisa**, 2005. (Outra)
Áreas do conhecimento : Genética

6. **Seminários da comissão de Pesquisa da USP**, 2005. (Outra)
Áreas do conhecimento : Genética

7. **Simposio de biossegurança e descartes de produtos químicos perigosos em instituição de**

ensino e pesquisa, 2005. (Simpósio)
Áreas do conhecimento : Farmácia

8. **Palestra Contadores de Células urinárias: o novo conceito eu uroanálise**, 2004. (Outra)
Áreas do conhecimento : Farmácia

9. **38 congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial**, 2004. (Congresso)
Áreas do conhecimento : Farmácia

10. **IV Fórum de pesquisa Científica e Tecnológica, IX Salão de Iniciação Científica**, 2003. (Outra)
Áreas do conhecimento : Medicina

11. **Sul Saúde**, 2003. (Congresso)
Áreas do conhecimento : Administração

12. **I Encontro de Hematologia do UNILAB**, 2003. (Encontro)
Áreas do conhecimento : Farmácia

13. **XXX Congresso Brasileiro de Análises Clínicas, III Congresso Brasileiro de Citologia Clínica**, 2003. (Congresso)
Áreas do conhecimento : Farmácia

14. **FEHOSUL**, 2003. (Seminário)
Áreas do conhecimento : Farmácia

15. **I Encontro Gaúcho de genética, Biologia molecular e Saúde**, 2003. (Encontro)
Áreas do conhecimento : Genética

16. **XI Encontro de Farmacêuticos e Bioquímicos, IX Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos, III Encontro de Farmacêuticos e Bioquímicos do Mercosul**, 2002. (Encontro)

17. **XII Congresso Paulista de Farmacêuticos, IV Seminário Internacional de Farmacêuticos, EXPOFAR 2001**, 2001. (Congresso)

18. **Viroses Humanas**, 2001. (Outra)

19. **II Fórum de Pesquisa Científica e Tecnológica, VII Salão de Iniciação Científica**, 2001. (Outra)
Áreas do conhecimento : Farmácia

20. **4 Congresso de Produtos Farmacêuticos e Cosméticos do RS**, 2000. (Congresso)

21. **XI Salão de Iniciação Científica - UFRGS**, 1999. (Outra)
.
22. **XXIV Semana Acadêmica de Estudos Farmacêuticos - Farmácia e Vigilância Sanitária**, 1998. (Outra)

23. **XXV Congresso Brasileiro de Análises Clínicas**, 1998. (Congresso)
.