



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D SOBRE ADIPOCINAS EM
IDOSOS OBESOS COM OSTEOPOROSE**

DAISY ANNE BARBOSA DE LIRA

Rio de Janeiro
2016



INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA
Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

Daisy Anne Barbosa de Lira

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D SOBRE ADIPOCINAS EM
IDOSOS OBESOS COM OSTEOPOROSE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dra. Maria Eugênia Leite Duarte

RIO DE JANEIRO

2016

INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA
Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA D SOBRE ADIPOCINAS EM
IDOSOS OBESOS COM OSTEOPOROSE.**

AUTORA: DAISY ANNE BARBOSA DE LIRA

ORIENTADOR: Prof. Dra. Maria Eugênia Leite Duarte

EXAMINADORES

Profa. Dra. Verônica Fernandes Vianna (INTO)
Prof. Dr. Marco Bernardo Cury Fernandes (INTO)
Prof. Dr. Rubens Antunes da Cruz Filho (UFF)
Prof. Dra. Amanda dos Santos Cavalcanti (Revisora)
Dra. Cláudia Regina Machado (INTO)

Rio de Janeiro, 03 de fevereiro de 2016.

CATALOGAÇÃO NA FONTE
INTO/BIBLIOTECA SÉRGIO EDUARDO VIANNA

L768e Lira, Daisy Anne Barbosa de.
Efeito da suplementação com cálcio e vitamina D sobre adipocinas e
TNF-alfa em idosos obesos com osteoporose / Daisy Anne Barbosa de Lira.
— 2015.
85 f.

Orientador: Maria Eugenia Leite Duarte.
Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema
Musculoesquelético) — Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
Jamil Haddad, Rio de Janeiro, 2016.

1. Idoso. 2. Obesidade. 3. Osteoporose. 4. Vitamina D. 5. Adipocinas.
6. Leptina. 7. Adiponectina. 8. Fator de Necrose Tumoral Alfa. 9. Ortopedia.
I. Duarte, Maria Eugenia Leite, Orient. II. Título.

NLM WE 250

Dedico este trabalho aos meus pais Antonio e Madalena, aos meus irmãos Vânia e Marcos e ao meu sobrinho e afilhado Júlio César – meu presente!

Agradecimentos

À Deus por não ter desistido do meu sonho. Obrigada por esse amor incansável! Sempre presente em todos os momentos.

À minha orientadora Professora Doutora Maria Eugênia, por todo ensinamento, apoio e entusiasmo dispensado a mim durante esta jornada.

À Professora Amanda Cavalcanti pela revisão do trabalho.

À equipe Peclin: Janise, Daniel, Janilce, e Kelly pelo companheirismo e alegria de todos os dias.

À Claudia Chagas pela paciência inesgotável e por todo apoio dado a mim.

Ao Ricardo Moreira por todo o conhecimento que ele compartilha comigo. Aos professores do mestrado em especial ao Dr. Ricardo Cruz por suas aulas memoráveis e Dra. Cássia Quelho pelo aprendizado filosófico.

Ao grupo do mestrado os “Dalits”: Milena, Verônica, Rosângela, Bárbara, Luciana, Sandra e Fálima. Meninas, amo vocês!

À Livia, Cristiane, Letícia, Valquíria e Juliana amigas muito queridas que sempre me incentivaram. Vocês são as melhores!

RESUMO

LIRA, Daisy Anne Barbosa. Efeito da suplementação vitamina D sobre adipocinas em idosos obesos com osteoporose. Rio de Janeiro, 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Ministério da Saúde, 2016.

Uma das principais consequências do envelhecimento populacional é o aumento dos índices de osteoporose, que resulta em risco aumentado de fratura, sobretudo as fraturas relacionadas com traumas de pequena intensidade. Similarmente, a obesidade está sendo diagnosticada em um percentual cada vez maior de indivíduos e, atualmente, acredita-se que mais de meio bilhão da população mundial seja obesa. A vitamina D, dentre as suas funções, desempenha um papel central na homeostase do cálcio e do fósforo e tem sua ação reduzida em indivíduos obesos, possivelmente em consequência do seu sequestro no tecido adiposo. O tecido adiposo é um órgão endócrino capaz de produzir e secretar peptídeos bioativos como leptina, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e adiponectina que atuam simultaneamente em algumas vias de regulação do metabolismo energético e ósseo. O objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta ao tratamento com suplementação de cálcio e vitamina D sobre marcadores sanguíneos do metabolismo ósseo e energético e do estado inflamatório crônico em 21 pacientes obesos e osteoporóticos com hipovitaminose D, em tratamento com bisfosfonatos durante 12 meses. A idade dos pacientes variou entre 63-86 anos e 20/21 eram mulheres em uso de ácido zoledrônico (47,6%) ou alendronato de sódio (52,4%). Durante o período de acompanhamento não houve alteração do estado nutricional dos pacientes, que permaneceram obesos. Após os 12 meses de tratamento os níveis séricos de vitamina D, osteoprotegerina e adiponectina aumentaram significativamente em relação à medida basal. No mesmo período e nas mesmas condições, os níveis séricos de C-telopeptídeo, fosfatase alcalina óssea, leptina e TNF- α apresentaram redução significativa em relação aos níveis basais pré-tratamento. Apesar da suplementação oral, os níveis de vitamina D mesmo tendo aumentado significativamente em relação aos valores pré-tratamento, permaneceram abaixo da faixa de referência de normalidade. O efeito anti-reabsortivo dos bisfosfonatos foi confirmado e, aparentemente, foi independente do estado de obesidade. A maior disponibilidade de reservatórios de gordura e a alta lipossolubilidade da vitamina D, favorecendo o seu sequestro neste sítio, provavelmente resultou na redução da sua biodisponibilidade que poderia explicar a manutenção do estado de hipovitaminose D, a despeito da suplementação durante 12 meses com cálcio e vitamina D. Nossos resultados estão de acordo com os relatos da literatura que favorecem a hipótese de que leptina e adiponectina são sensíveis à ação da vitamina D, caracterizada por uma relação direta entre vitamina D e adiponectina e inversa entre vitamina D e leptina. A ação anti-inflamatória da 25(OH)D, avaliada através da redução dos níveis circulantes de TNF- α também pode ser sugerida a partir dos resultados do presente estudo. Estudos clínicos adicionais serão necessários para tentar elucidar os mecanismos sistêmicos, as interações e níveis circulantes ótimos de vitamina D e adipocinas em obesos e o seu papel na saúde humana.

Palavras chave: Vitamina D. Obesidade. Adipocinas. Leptina. Adiponectina. TNF- α .

ABSTRACT

LIRA, Daisy Anne Barbosa. Rio de Janeiro, 2016. Effects of vitamin D supplementation on adipokines in obese osteoporotic subjects. Master Thesis. (Master's Degree in Science Applied to the Musculoskeletal System) National Institute of Traumatology and Orthopedics, Ministry of Health, 2016.

One of the main consequences of population aging is the rising in osteoporosis rates, resulting in increased risk of fracture, particularly fragility fractures. Similarly, obesity is being diagnosed in an increasing percentage of individuals, and currently it is believed that more than half a billion of the world population is obese. Vitamin D, among its many functions, plays a central role in the homeostasis of calcium and phosphorus and has an effect reduced in obese individuals possibly in consequence of sequestration in adipose tissue. The adipose tissue is an endocrine organ able to produce and secrete bioactive peptides such as leptin, tumor necrosis factor α (TNF- α) and adiponectin that simultaneously act in some pathways regulating energy and bone metabolism. The aim of this study was to evaluate the response to treatment with calcium and vitamin D supplementation on blood markers of bone and energy metabolism and a marker of chronic inflammatory state in 21 obese and osteoporotic patients with hypovitaminosis D, treated with bisphosphonates for 12 months. The patients' ages ranged from 63-86 years and 20/21 was women taking zoledronic acid (47.6%) or sodium alendronate (52.4%). During the follow-up period there was no change in the nutritional status of patients who remained obese. After 12 months of treatment serum levels of vitamin D, osteoprotegerin and adiponectin increased significantly compared to baseline values. In the same period and under the same conditions, C-telopeptide, serum bone alkaline phosphatase, leptin and TNF- α showed significant reduction compared to baseline levels. Compared to pre-treatment values, oral supplementation with vitamin D increased significantly the circulating levels that, however, remained below the normal reference range. The anti-resorptive effect of bisphosphonates was confirmed and was apparently independent of the state of obesity. The greater availability of fat reservoirs and the high lipid solubility of vitamin D, favoring its sequestration on this site, probably resulted in reduced bioavailability and thus, persistence of the state of hypovitaminosis D, despite the 12 months supplementation with calcium and vitamin D. Our results are in agreement with most reports from the literature that favor the hypothesis that leptin and adiponectin are sensitive to the action of vitamin D, characterized by a direct relationship between adiponectin and vitamin D and a negative relationship between vitamin D and leptin. The anti-inflammatory action of 25 (OH) D, as measured by the reduction in circulating levels of TNF- α , can also be suggested from the results of this study. Additional clinical studies are needed to try to elucidate the systemic mechanisms, interactions and optimal circulating levels of vitamin D and adipokines in obese and their role in human health.

Keywords: Vitamin D. Obesity. Adipokines. Leptin. Adiponectin. TNF- α .

SUMÁRIO	pg
RESUMO	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Tecido Ósseo	13
1.2 Remodelação óssea	18
1.2.1 Regulação da remodelação óssea	22
1.2.1.1 <i>Sistêmica</i>	22
1.2.1.2 <i>Local</i>	23
1.3 Osteoporose	24
1.3.1 Definição e epidemiologia	24
1.3.2 Diagnóstico clínico	25
1.3.3 Marcadores bioquímicos da função óssea	26
1.4 Vitamina D	27
1.4.1 Síntese e metabolismo	28
1.4.2 Valores de referência	30
1.5 Obesidade	31
1.5.1 Adipocinas: adiponectina e leptina	32
1.5.1.1 <i>Adiponectina</i>	32
1.5.1.2 <i>Leptina</i>	34
1.5.2 Adipocinas e tecido ósseo	35
1.5.3 Fator de necrose tumoral alfa e tecido adiposo	36
1.5.4 Regulação metabólica da vitamina D em obesos	37
1.6 Justificativa	39
2 OBJETIVOS	40
2.1 Objetivo Geral	40
2.2 Objetivos Específicos	40
3 PACIENTES E MÉTODOS	41
3.1 Pacientes	41
3.1.1 Amostra inicial	41
3.1.2 Amostra específica (obesos)	42
3.2 Diagnóstico de osteoporose	42
3.3 Diagnóstico de obesidade	43
3.4 Análise da bioquímica sanguínea	44
3.4.1 Vitamina D	44
3.4.1.1 <i>Protocolo de suplementação com Vitamina D₃</i>	45
3.4.2 Marcadores do metabolismo ósseo (C-telopeptídeo, fosfatase	45

alcalina óssea e osteoprotegerina)	46
3.4.3 Adipocinas: adiponectina, leptina e marcador do estado inflamatório crônico (TNF- α)	46
3.5 Análise estatística	
4 RESULTADOS	47
4.1 Distribuição dos dados	47
4.2 Características dos pacientes	47
4.3 Diagnóstico de osteoporose	47
4.3.1 Avaliação densitométrica da perda óssea	47
4.3.2 Diagnóstico clínico-radiográfico	48
4.4 Diagnóstico de obesidade	48
4.5 Acompanhamento clínico da deficiência/insuficiência de Vitamina D	49
4.6 Avaliação dos marcadores de formação (fosfatase alcalina óssea e osteoprotegerina) e de reabsorção óssea (C-telopeptídeo)	51
4.7 Avaliação dos níveis de adipocinas adiponectina, leptina e marcador do estado inflamatório crônico (TNF- α)	52
4.8 Avaliação da relação entre os valores finais da vitamina D com os valores finais dos marcadores do metabolismo ósseo e das adipocinas	54
5 DISCUSSÃO	55
6 CONCLUSÕES	63
7 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	64
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS	81

LISTA DE FIGURAS	pg
Figura 1. Principais aspectos da microestrutura óssea.	15
Figura 2. Aspecto histológico dos elementos celulares do tecido ósseo.	16
Figura 3. Tradução histológica da remodelação óssea.	21
Figura 4. Vias de ativação metabólica da vitamina D ₃ na forma hormonal 1,25(OH) ₂ D.	29
Figura 5. Interações e efeitos sistêmicos da adiponectina.	33
Figura 6. Avaliação bioquímica dos níveis de 25(OH)D em pacientes osteoporóticos obesos antes e depois da suplementação oral com cálcio e vitamina D durante 12 meses.	50
Figura 7. Correlação entre os valores basais e finais de 25(OH)D em pacientes osteoporóticos obesos após suplementação oral com cálcio e vitamina D durante 12 meses.	50
Figura 8. Avaliação bioquímica dos níveis de C-telopeptídeo (CTX), fosfatase alcalina óssea (FAO) e osteoprotegerina (OPG) (A-C) e correlação entre os valores basais e finais dessas variáveis (D-F) em pacientes osteoporóticos obesos antes e depois da suplementação oral com cálcio e vitamina D durante 12 meses.	52
Figura 9. Avaliação bioquímica dos níveis de leptina, adiponectina e TNF- α (A-C) e correlação entre os valores basais e finais dessas variáveis (D-F) em pacientes osteoporóticos obesos antes e depois da suplementação oral com cálcio e vitamina D durante 12 meses.	53

LISTA DE TABELAS

Pg

Tabela 1. Descritiva das variáveis numéricas dos pacientes obesos, osteoporóticos com o correspondente nível descritivo (p valor) obtido pelo teste de Mann-Whitney. 49

Tabela 2. Valores dos níveis séricos de C-telopeptídeo (CTX), fosfatase alcalina óssea (FAO) e osteoprotegerina (OPG) na avaliação basal e final, após tratamento com medicamento antirreabsortivo e suplementação oral com cálcio e vitamina D durante 12 meses. 51

Tabela 3. Valores dos níveis séricos de leptina, adiponectina e TNF- α na avaliação basal e final, após tratamento com medicamento antirreabsortivo e suplementação oral com cálcio e vitamina D durante 12 meses. 52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1,25(OH) ₂ D	1,25 dihidroxivitamina D
25(OH)D	25 hidroxivitamina D
α	alfa
β	beta
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
Ca	Cálcio
CART	Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (<i>Cocaine and amphetamine regulated</i>)
CTX	Teloepetídeo do Carboxi terminal -X
DBP	Proteína de ligação da vitamina D (<i>Vitamin D binding protein</i>)
D ₂	Ergocalciferol
D ₃	Colecalciferol
7 DHC	7-Dehidrocolesterol
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
DMO	Densidade Mineral Óssea
DP	Desvio Padrão
ECLIA	Eletroquimiluminescência
FAO	Fosfatase Alcalina Óssea
HE	Hematoxilia Eosina
IGF I	Fator de crescimento semelhante a insulina I (<i>Insulin-like growth factor I</i>)
IGFII	Fator de crescimento semelhante a insulina II (<i>Insulin-like growth factor II</i>)
IL6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
INTO	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
kDa	kilodalton
Kg	kilograma
m ²	metro quadrado
mL	mililitro
Nm	nanômetro
Ng	nanograma
Ob-Rb	Forma longa do receptor da leptina (<i>long form of the leptin receptor</i>)
1OHase	1-alfa hidroxilase
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPG	Osteoprotegerina
P	Fósforo
%	Percentual
PO ₄	Fosfato
PTH	Paratormônio
R ₁	Receptor 1
R ₂	Receptor 2
RANK	Receptor ativador do fator Kappa β (<i>Receptor activator of nuclear factor kappa- β</i>)
RANK L	Ligante do receptor ativador do fator Kappa β (<i>Receptor activator of nuclear factor kappa- β Ligand</i>)
TGFβ	Fator de Crescimento Transformante β
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
UI	Unidade Internacional
UVB	Raio ultravioleta B
VDR	Receptor da vitamina D (<i>Vitamin D Receptor</i>)

1.1 Tecido Ósseo

O osso é um tipo de tecido conjuntivo especializado e metabolicamente ativo, que desempenha inúmeras funções fisiológicas vitais como suporte e proteção de órgãos e estruturas nobres. Participa diretamente da produção de células sanguíneas, possui uma matriz rica em fatores de crescimento e citocinas e é o principal reservatório de minerais sendo responsável pela homeostasia de diversos íons em particular cálcio e fósforo (LEIBBRANDT e PENNINGER, 2008; FENG e MCDONALD; 2011; TETI, 2011).

O tecido ósseo tem duas origens embrionárias distintas. Os ossos chatos do crânio e a clavícula são formados por ossificação intramembranosa. Este tipo de formação óssea ocorre diretamente a partir de um tecido conjuntivo especializado preexistente, onde os osteoblastos depositam matriz orgânica rica em colágeno tipo I que, a seguir, sofre mineralização através da deposição de fosfato de cálcio, dando origem ao osso mineralizado. A ossificação endocondral é responsável pela formação da maioria dos ossos longos. Ela ocorre através da transformação do mesênquima primitivo em uma peça de cartilagem no formato do futuro osso, que servirá de molde para a deposição guiada de tecido ósseo em substituição a cartilagem, que é gradualmente reabsorvida (ANDERSON, 2003; WAMBERG et al., 2013).

Com base na sua organização estrutural o tecido ósseo é classificado em compacto ou cortical e trabecular ou esponjoso. O osso compacto ou cortical é

denso, sólido, constituído por fibras colágenas flexíveis e cristais de hidroxiapatita e tem como principal função resistir a cargas de compressão e de torção. Nos ossos longos o osso compacto circunda o espaço medular originando uma cavidade central oca, denominada canal ou cavidade medular. A unidade básica do osso compacto é o osteon, que é constituído por um canal central – canal Harvesiano – que contém vasos sanguíneos e nervos e é circundado por lamelas concêntricas constituídas por matriz colágena impregnada por sais de cálcio e fósforo onde se localizam os osteócitos, no interior de pequenas lacunas conectadas por canalículos. Os canalículos são responsáveis pela comunicação e difusão dos nutrientes e restos metabólicos de/para os osteócitos. Os canais Haversianos são conectados perpendicularmente pelos canais vasculares de Volkman. As lamelas circunferenciais envolvem externamente os osteons e as circunferenciais internas resultam da reabsorção parcial de osteons durante o processo de remodelação do osso. Externamente, a superfície do osso cortical é recoberta pelo perióstio que é um tecido conjuntivo fibroso rico em vasos sanguíneos, fibras nervosas, osteoclastos, osteoblastos e que tem a função de proteger, nutrir, e auxiliar na formação óssea. O perióstio tem um importante papel na consolidação das fraturas e no crescimento aposicional. Internamente o osso compacto é revestido pela membrana endosteal (Figura 1) (STANDRING, 2015).

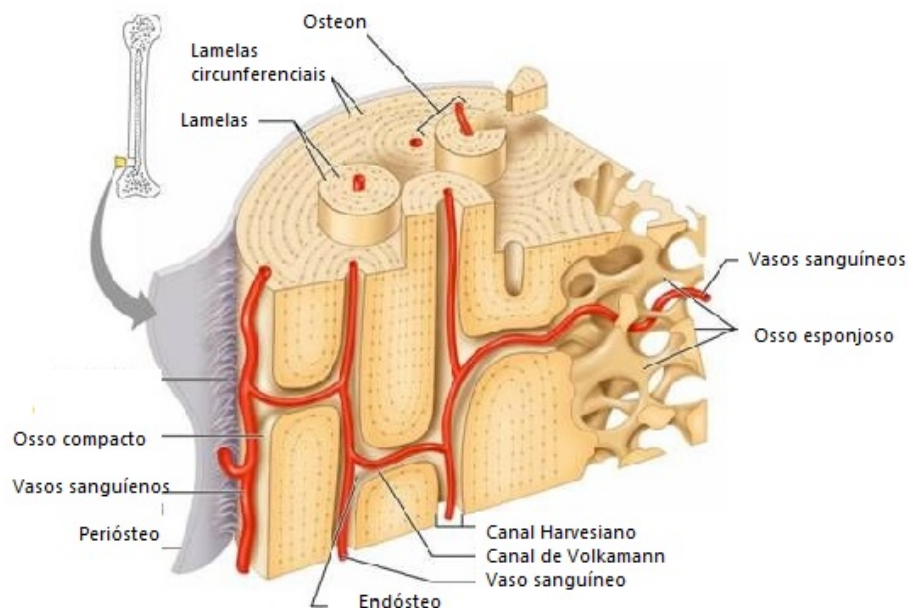


Figura 1. Principais aspectos da microestrutura óssea. Os osteons são estruturas cilíndricas distribuídas paralelamente em relação ao maior eixo do osso, circundados pelas lamelas circunferenciais externas. No osteon as lamelas se organizam de forma concêntrica em torno dos canais Haversianos que, por sua vez, se comunicam através de canais vasculares perpendiculares (canais de Volkmann). As lamelas circunferenciais internas representam osteons parcialmente reabsorvidos e as lamelas intersticiais promovem a junção entre osteons adjacentes. As células ósseas osteócitos se localizam no interior de pequenas lacunas e se comunicam através de prolongamentos (canalículos). O osso esponjoso ocupa a posição central dos ossos longos (cavidade medular) que é totalmente circundada por osso compacto. Adaptado de Standring, 2015.

O osso trabecular ou esponjoso é composto por uma rede de lâminas ósseas irregularmente dispostas em vários sentidos e direções, que delimitam espaços livres entre si e são circundadas por tecido hematopoético altamente vascularizado, com graus variáveis de associação com células adiposas (CHIM *et al.*, 2013).

A porção inorgânica dos ossos (65%) é constituída predominantemente por cálcio e fósforo sob a forma de cristais de hidroxiapatita $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e é responsável pelas propriedades de rigidez e resistência à compressão. A matriz orgânica (35%) é constituída por colágeno e proteínas estruturais não colágenas, como proteoglicanas e sialoproteínas que participam dos processos de estabilização da

matriz, mineralização e outras atividades regulatórias do metabolismo (LEIBBRANDT e PENNIGER, 2008; FENG e MC DONALD, 2011).

Os componentes celulares do osso são os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos (Figura 2).

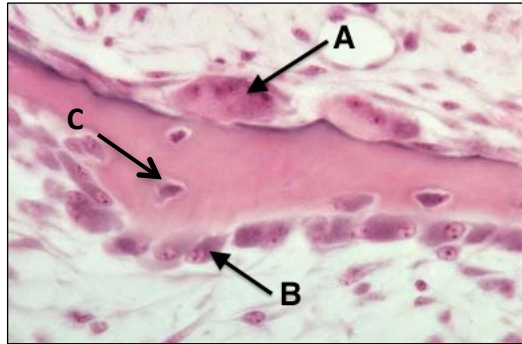


Figura 2. Aspecto histológico dos elementos celulares do tecido ósseo. (A) Osteoclasto multinucleado localizado na superfície óssea, no interior de uma lacuna de reabsorção (lacuna de Howship). (B) Osteoblastos cuboidais, com núcleos basofílicos, nucléolos evidentes, dispostos em “colar” na superfície do osso esponjoso. (C) Osteócitos aprisionados no interior da matriz colágena mineralizada. Coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Arquivo pessoal.

Os osteoblastos têm origem nas células mesenquimais indiferenciadas da medula óssea. As células adultas são altamente especializadas, estão diretamente associadas à osteogênese e são responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea, particularmente colágeno tipo I além da secreção de fatores de crescimento, glicoproteínas e proteoglicanas. Eventualmente os osteoblastos são completamente envolvidos e aprisionados pela matriz óssea recém-sintetizada, originando os osteócitos. Os osteócitos têm citoplasma escasso e pequeno e nenhuma capacidade de síntese proteica. Eles possuem prolongamentos que promovem a comunicação entre células adjacentes que proporcionam o fluxo de mensageiros bioquímicos e metabólicos com a circulação

sistêmica, conferindo aos osteócitos papel fundamental na manutenção da integridade da matriz óssea (TROUVIN e GOËB, 2010).

Além da participação na formação óssea, os osteoblastos desempenham papel central na diferenciação dos osteoclastos, que ocorre através da liberação de fatores derivados da matriz durante o processo de reabsorção como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), os fatores de crescimento insulínico I e II (IGF I e IGF II), a osteocalcina e o colágeno tipo I (KULAR *et al.*, 2012).

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas, formados pela fusão citoplasmática de precursores mononucleares (monócitos), oriundos da linhagem mielóide, responsáveis pela reabsorção e remodelação do tecido ósseo (MC GREEVY e WILLIAMS, 2011).

A principal molécula reguladora da osteoclastogênese é o ligante do receptor ativador do fator Kappa β (RANKL). Ela é expressa por osteoblastos, células T e células endoteliais e é essencial para a formação de osteoclastos através da ligação com o receptor RANK presente nos osteoclastos e em seus precursores (KOHLI e KOHLI, 2011; KULAR *et al.*, 2012).

A atividade de RANKL é antagonizada pela presença do receptor solúvel osteoprotegerina (OPG). A OPG bloqueia a ligação do RANKL com RANK, inibindo a diferenciação dos osteoclastos. A transmissão do sinal de RANKL é determinada pela relação entre RANKL e a OPG, juntamente com a expressão de RANK em precursores de osteoclastos. Tal como RANKL, a OPG é produzida pelos osteoblastos, conferindo a essas células um papel central no controle da relação entre a formação e reabsorção óssea (MARTIN, 2013; WALSH e CHOI, 2014).

1.2 Remodelação óssea

O tecido ósseo está em processo de formação até o final da segunda década de vida. Na maturidade esquelética, quando é atingido o pico da massa óssea, inicia-se um lento processo fisiológico de perda gradual de massa óssea equivalente a cerca de 1,5% ao ano (YAZBEK e NETO, 2008; KINI e NANDEESH, 2012).

Através de um processo denominado de remodelação, altamente regulado por fatores sistêmicos e locais, o organismo procura manter a massa óssea em níveis próximos ao seu pico. Este processo dinâmico se caracteriza pela remoção e substituição do osso antigo danificado e, portanto, com baixa qualidade de sustentação mecânica, por osso recém-sintetizado com melhor e maior resistência. Através da remodelação o esqueleto é renovado garantindo, desta forma, sua integridade durante a vida (FENG e MCDONALD, 2011; KINI e NANDEESH, 2012; DELAISSE, 2014). O processo de remodelação ocorre da mesma forma no osso compacto e no osso esponjoso (KOSLA *et al.*, 2008).

A remodelação óssea pode ser dividida em seis fases: quiescência, ativação, reabsorção, reversão, formação e mineralização. Em condições fisiológicas essa sequência de eventos da remodelação é regulada por hormônios, citocinas e fatores de crescimento. Alterações no equilíbrio entre a reabsorção e a formação resultam na perda óssea que constitui a base da osteoporose (KULAR *et al.*, 2012; CHIM *et al.*, 2013).

Na fase de quiescência a superfície óssea está em repouso (Figura 3A). Em resposta a uma tensão mecânica que resulte em uma microfratura ou sob a ação de hormônios em resposta a alteração da homeostase do cálcio e fósforo, tem início o

recrutamento e ativação de precursores dos osteoclastos: monócitos e macrófagos circulantes. Como resultado da interação com os precursores osteoblásticos, os osteoclastos se diferenciam se fusionam e migram para a superfície óssea orientados por um gradiente de concentração de mediadores químicos (quimiotaxia). Ao atingir a superfície óssea, onde se fixam firmemente, os osteoclastos iniciam a reabsorção óssea que tem uma duração média de duas a quatro semanas em cada ciclo de remodelação (Figura 3B). A tradução histológica da reabsorção óssea é a presença de pequenas cavidades côncavas, com cerca de 50µm de profundidade, localizadas na superfície óssea. Durante a reabsorção são liberadas enzimas hidrolíticas e lisossomais aprisionadas na matriz óssea, em especial catepsina K, que auxiliam na degradação dos demais componentes da matriz, inclusive do colágeno (RAGGATT e PARTRIDGE 2010; KINI e NANDEESH, 2012).

Embora a função primária dos osteoclastos na remodelação óssea seja a reabsorção óssea da matriz mineralizada, é provável que os osteoclastos, além de promoverem a reabsorção, também atuem no controle da liberação de fatores de crescimento como BMP, IGF I e II e fator de crescimento transformante beta (TGF- β), responsáveis por modelar a atividade osteoblástica (KINI e NANDEESH, 2012).

A fase reversa é uma fase de transição entre a reabsorção e a formação óssea (Figura 3C). Células mononucleares da linhagem monocítica e macrófagos contidos na cavidade de reabsorção preparam a superfície óssea para o acesso dos progenitores osteoblásticos. Ao se diferenciarem, os osteoblastos iniciam a fase

subsequente (formação) do ciclo de remodelação (KINI e NANDEESH, 2012; DELAISSE, 2014).

Durante a fase de formação (Figura 3D) os pré-osteoblastos são atraídos para o sítio de remodelação por um gradiente de concentração de fatores de crescimento liberados da matriz recém-reabsorvida. Na superfície da cavidade de reabsorção eles depositam uma camada de matriz extracelular que expressa BMP, responsável pela diferenciação dos pré-osteoblastos em osteoblastos. Estes, por sua vez, iniciam a síntese da matriz óssea (TETI, 2011; KINI e NANDEESH, 2012). Os osteoblastos continuam a síntese da matriz osteóide até que ocorra o preenchimento completo da lacuna de reabsorção. A seguir, os osteoblastos se transformam em células quiescentes terminalmente diferenciadas, que recobrem a superfície óssea recém-formada (Figura 3E). Essas células de revestimento se conectam com os osteócitos na matriz óssea através da rede de canálculos para manter a comunicação entre o ambiente medular e o osso. A matriz osteóide recém depositada leva em média 90 dias no osso esponjoso e 130 dias no osso cortical para completar a fase de mineralização (KINI e NANDEESH, 2012).

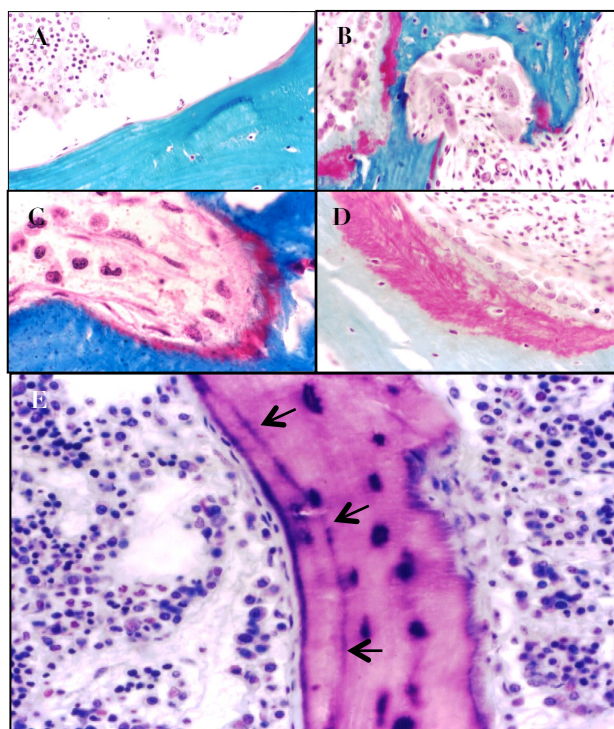


Figura 3. Tradução histológica das fases da remodelação óssea. (A) Fase de quiescência onde a superfície do osso esponjoso é recoberta por lâmina delgada constituída pelo prolongamento citoplasmático de osteoblastos terminalmente diferenciados (células em repouso ou células de revestimento). Este recobrimento tem como função promover uma barreira mecânica à ação dos osteoclastos. (B) Fase da reabsorção - osteoclastos multinucleados são formados e promovem a reabsorção óssea, traduzida pela formação de uma cavidade (Lacuna de Howship) na superfície óssea. (C) A fase reversa se caracteriza pelo recobrimento da base da cavidade de reabsorção por matriz colágena não mineralizada associada com o afluxo de progenitores osteoblásticos e macrófagos. (D) A fase de formação óssea com deposição de matriz osteóide pelos osteoblastos visando o preenchimento da cavidade de reabsorção formada pela ação dos osteoclastos. (E) O final de um ciclo de remodelação completo. O *quantum* de tecido ósseo removido durante o ciclo foi repostado pelos osteoblastos e, após a mineralização, apresenta uma interface (frente de mineralização) bem demarcada (setas) com o osso nativo. Cortes histológicos de osso não descalcificado incluído em resina. A-D: Tricrômico Masson Goldner. E: Azul de Toluidina. (A) 10X, (B,D,E) 20X, (C) 40X. Arquivo pessoal.

O evento mais dinâmico da remodelação óssea é a fase de conversão do catabolismo para o anabolismo, isto é, o processo de acoplamento da formação óssea com o final da atividade de reabsorção (IKEDA e TAKESHITA, 2014). Em

condições fisiológicas um ciclo de remodelação tem a duração total de seis a sete meses e, idealmente, a quantidade de osso formado deve ser igual a quantidade de osso que foi removido e, conseqüentemente, renovado (ERIKSEN, 2010; KINI e NANDEESH, 2012). Como a fase de reabsorção do ciclo de remodelagem é curta e o período de tempo necessário para a reposição do osso reabsorvido é longo, qualquer aumento na frequência de ativação da remodelação resultará em perda de massa óssea (RAISZ, 2005).

1.2.1 Regulação da remodelação óssea

1.2.1.1 Sistêmica

A remodelação óssea é regulada por via sistêmica através de ação hormonal. Fisiologicamente, na segunda década da vida a massa óssea atinge o seu pico máximo e é mantida com pequenas variações até os 50 anos de idade, quando então a reabsorção óssea predomina e tem início a perda óssea (KINI e NANDEESH, 2012). Ao longo do processo de envelhecimento, a remodelação óssea desequilibra de forma contínua a favor da reabsorção, constituindo o principal mecanismo e a base metabólica da osteoporose (TROUVIN e GOËB, 2010; CHIM *et al.*, 2013).

Na menopausa a diminuição dos níveis de estrogênio é responsável pelo aumento da frequência de ativação da remodelação. Diversos sítios são ativados simultaneamente gerando um desequilíbrio entre reabsorção e a capacidade de formação óssea pelos osteoblastos. O aumento da atividade osteoclástica leva a perda de grande parte de osso esponjoso com conseqüente perda da microarquitetura tecidual e desenvolvimento da osteoporose (SEEMAN, 2003; MCGREEVY e WILLIAMS, 2011; ZUPAN *et al.*, 2013). O controle do estrogênio sobre a atividade dos osteoblastos e osteoclastos é realizado através da mediação da

tríade RANK/RANKL/OPG. O estrogênio modula a formação osteoclástica tanto através da diminuição da expressão de citocinas osteoclastogênicas quanto pela supressão direta de RANKL que, por sua vez, induz a diferenciação osteoclástica (LEGIRAN e BRANDI, 2012; WALSH e CHOI, 2014). Outros hormônios, como o paratormônio (PTH) e a 1,25 dihidroxivitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) também atuam diretamente sobre a remodelação óssea (TROUVIN e GOËB, 2010; BANDEIRA *et al.*, 2014).

1.2.1.2 Local

A OPG é uma glicoproteína membro da super família de receptores de fator de necrose tumoral (TNF), envolvida no metabolismo ósseo e que desempenha um papel regulador nos sistemas imunológico, vascular e esquelético (BJERRE, 2013). A OPG é secretada pelas células do estroma da medula óssea e por progenitores osteoblásticos e tem como principal função inibir a osteoclastogênese através do bloqueio da interação do RANKL com o RANK. A não interação do RANK com o seu ligante inibe o recrutamento, a proliferação e a ativação dos osteoclastos (THEOLEYRE *et al.*, 2004; KINI e NANDEESH, 2012). Por ser um fator primário na diferenciação e ativação dos osteoclastos, o RANK funciona como um regulador local do processo de reabsorção (SIMONET *et al.* 1997; KINI e NANDEESH, 2012). Em condições fisiológicas, a OPG promove o equilíbrio entre a formação e reabsorção óssea (MUNHOZ-TORRES *et al.*, 2009).

O desequilíbrio entre as funções dos osteoblastos e dos osteoclastos pode resultar em alterações caracterizadas pelo aumento (osteopetrose) ou diminuição (osteoporose) da massa óssea. Estudos em modelos animais demonstraram que a deleção do gene que codifica a OPG resulta em aumento da remodelação óssea e

osteoporose; a sua super expressão resulta em osteopetrose (SIMONET *et al.*, 1997; BUCAY *et al.*, 1998).

1.3 Osteoporose

1.3.1 Definição e epidemiologia

A osteoporose é um distúrbio osteometabólico causado pelo desequilíbrio entre a reabsorção e formação óssea, com predomínio da atividade dos osteoclastos sobre a dos osteoblastos. Em virtude do envelhecimento populacional houve um aumento na sua prevalência, no Brasil a doença atinge 10 milhões de pessoas (ABRASSO).

A osteoporose se caracteriza pela diminuição da densidade mineral óssea (DMO) que culmina com alterações da microarquitetura do tecido ósseo, aumento da fragilidade esquelética e do risco de fratura, sobretudo as fraturas de baixo impacto (HOLICK, 2007; MCGREEVY e WILLIAMS, 2011; DRAKE *et al.*, 2012; DUQUET, 2014). Algumas situações como hereditariedade, etnia, envelhecimento, consumo excessivo de álcool, baixa exposição solar, *Diabetes Mellitus* (DM), menopausa e obesidade predis põem a osteoporose (CARVALHO *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2010; SOUSA, 2010; GALLAGHER e TELLA, 2014).

1.3.2 Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico de osteoporose se baseia na presença de fratura por fragilidade e/ou quando a DMO, medida por densitometria óssea, é inferior ou igual a -2,5 desvios padrão (DP) do valor obtido em uma população de referência de adultos jovens. Por convenção este valor é descrito como T-Score (GALLAGHER e TELLA, 2014). Baseado nos valores do T-Score a Organização Mundial da Saúde

(OMS) estabeleceu as seguintes diretrizes para o diagnóstico densitométrico de osteoporose: normal quando o T-Score está acima de -1,0 DP; osteopenia para valores entre -1,0 e -2,5 DP e osteoporose para valores de -2,5 ou menor.

A principal complicação da osteoporose é a fratura. A prevalência de fraturas osteoporóticas aumenta de 4% em mulheres com idade entre 50-59 anos para 52% das mulheres com mais de 80 anos. Há uma sequência temporal em fraturas osteoporóticas que se inicia pelas fraturas do rádio distal a partir de 50 anos de idade, seguido de fraturas vertebrais entre 60-75 anos e fraturas do colo do fêmur a partir de 70 anos (GALLAGHER e TELLA, 2014).

Além das fraturas, outro problema frequentemente associado a osteoporose é a redução dos níveis séricos de vitamina D. A deficiência ou a insuficiência de vitamina D está intimamente associada a perda óssea contribuindo, consequentemente, para o aumento da fragilidade óssea. Além da associação com a perda óssea, a vitamina D está diretamente relacionada com o desenvolvimento e progressão de fraqueza muscular (sarcopenia) que, por sua vez, potencializa o risco de quedas (BUSSE *et al.*, 2013).

1.3.3 Marcadores bioquímicos da função óssea

A monitorização do metabolismo ósseo pode ser feita através da medida dos níveis séricos de diversas enzimas e proteínas liberadas durante o processo de formação óssea ou através da quantificação dos produtos resultantes da degradação do osso durante a fase de reabsorção (PAGANI *et al.*, 2005). Apesar do crescente avanço tecnológico das técnicas e métodos de diagnóstico laboratorial, que permitem avaliar com alto poder de especificidade e sensibilidade os marcadores

do metabolismo ósseo, o diagnóstico de osteoporose não pode ser estabelecido unicamente em bases bioquímicas. Existem relatos de que em pacientes osteoporóticos, os níveis séricos de diversos marcadores são semelhantes aos níveis em indivíduos saudáveis (NIELSEN *et al.*, 1991). A associação entre o diagnóstico densitométrico e marcadores do *turnover* ósseo pode, contudo, ser útil para a avaliação do risco de fratura em pacientes com diagnóstico estabelecido de osteoporose (LEWIECKI *et al.*, 2009).

Se por um lado a utilização de um painel bioquímico de marcadores do metabolismo ósseo não é adequada para estabelecer o diagnóstico de osteoporose, eles são amplamente utilizados na monitorização da resposta terapêutica a medicamentos que atuam sobre o metabolismo ósseo. A fosfatase alcalina óssea (FAO) e a osteocalcina são marcadores clássicos da formação óssea e da reabsorção os produtos resultantes da degradação do colágeno (RISTELI *et al.*, 1999).

A fosfatase alcalina sérica compreende diversas isoformas produzidas principalmente no fígado e ossos. A FAO isoforma específica do osso, pode ser medida através de imunoensaios utilizando anticorpos monoclonais direcionados para esta isoforma (PAGANI *et al.*, 2005). A osteocalcina também é um bom marcador da função osteoblástica por mostrar boa correlação com a formação óssea. Uma importante limitação do uso da osteocalcina como marcador da função osteoblástica é a sua rápida degradação sérica resultando em porções fragmentadas e pela sua secreção seguir um ritmo circadiano, variável ao longo do dia (GUNDBERG *et al.*, 1985).

Os marcadores da reabsorção óssea são uma classe de produtos derivados da hidrólise enzimática do colágeno tipo I, que constitui 90% das proteínas ósseas. Fragmentos do colágeno tipo I, particularmente o telopeptídeo do carboxiterminal-X (CTX), é um dos marcadores mais utilizados e pode ser detectado pela presença de anticorpos específicos (PAGANI *et al.*, 2005).

1.4 Vitamina D

A vitamina D é a principal responsável pela regulação da homeostase do cálcio (Ca) e fósforo (P). Sua síntese ocorre através da pele pela ação de raios Ultravioleta B (UVB) ou pode ser adquirida através da dieta. No entanto sua deficiência/insuficiência no organismo é considerada uma pandemia (HOLICK, 2007; BENDIK *et al.*, 2014; ZABIHIYEGANHEH *et al.*, 2014). As principais consequências dos baixos níveis séricos de vitamina D são o hiperparatireoidismo secundário, aumento do *turnover* ósseo, aumento da perda óssea e maior risco de fratura por fragilidade (HOSSEIN-NEZHAD e HOLICK, 2013).

1.4.1 Síntese e metabolismo

A vitamina D compreende um grupo de vitâmeros ou polímeros com atividade biológica similar no organismo sendo a principal forma presente nos alimentos os colecalciferóis (vitamina D₃) e ergocalciferol (vitamina D₂) (SANTOS e FILHO, 2012; BENDIK *et al.*, 2014).

A vitamina D é única pelo fato de ter como fonte a síntese na pele através da ação da luz solar e pela ingestão através da dieta (HOLICK, 2007; CASTRO, 2011; BENDIK *et al.*, 2014). Na reação fotoquímica entre 7-deidrocolesterol (7-DHC), um precursor do colesterol localizado na membrana plasmática dos queratinócitos e a

UVB, é gerada a pré vitamina D que é rapidamente convertida na forma inativa da vitamina D também chamada de colecalciferol ou vitamina D₃ (HOLICK, 2007). Esta reação fotoquímica é mantida continuamente, durante toda a vida, em todas as células quando expostas a ondas curtas (entre 290-315nm) de UVB na presença de quantidades suficientes de 7-DHC (BOUILLON e SUDA, 2014). A exposição excessiva à luz solar degrada a pré-vitamina D₃ e a vitamina D₃ em fotoprodutos inativos, o luminosterol e taquisterol, controlando a superprodução de vitamina D (MARQUES *et al.*, 2010; SANTOS e FILHO, 2012).

As vitaminas D₂ e D₃ provenientes da ingesta são incorporadas pelos quilomícrons inicialmente no sistema linfático e, a seguir, no sistema venoso. Ao se ligar a proteína de ligação da vitamina D (DBP), o composto segue para o fígado onde é metabolizado. Neste órgão a vitamina D sofre a primeira hidroxilação no carbono 25 transformando-se em 25-hidroxivitamina D (25(OH)D), sob a ação da enzima 25-hidroxilase (HOLICK, 2007). Este metabólito da vitamina D ainda é inativo e necessita passar por um segundo processo de metabolização no rim, regulado pela 25-hidroxivitamina D 1- α hidroxilase (1-OHase), e se transforma na forma biologicamente ativa a 1,25-dihidroxivitamina D (1,25(OH)₂D) (Figura 4) (LIPS, 2006; HOLICK, 2007; CASTRO, 2011).

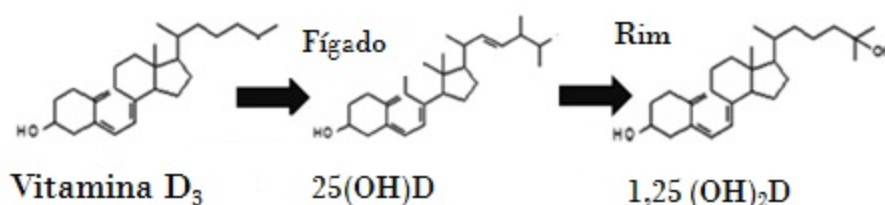


Figura 4. Vias de ativação metabólica da vitamina D₃ na forma hormonal 1,25(OH)₂D. A forma inativa D₃ sofre hidroxilação hepática através da ação da enzima 25-hidroxilase e é convertida na forma 25(OH)D, também inativa. A

hidroxilação renal do carbono 1- α , sob a ação da enzima 1-OHase origina o composto metabolicamente ativo 1,25(OH)₂D. Adaptado de DE LUCA, 2004.

A ação clássica da vitamina D em animais vertebrados e humanos é promover a absorção de cálcio e fósforo e, assim, garantir a mineralização adequada do esqueleto (HOLICK, 2007; CASTRO, 2011; BUSSE et al, 2013; HOSSEIN-NEZHAD e HOLICK, 2013). A 1,25(OH)₂D atua sobre os osteoclastos estimulando o aumento na expressão de RANK e, conseqüentemente, a osteoclastogênese. Os osteoclastos, por sua vez, mantêm a homeostasia do cálcio e fósforo através da mobilização óssea (HOLICK, 2007).

Vários estudos demonstraram a face hormonal da vitamina D na homeostase sistêmica em parte devido à presença do receptor da 1,25-dihidroxitamina D (VDR) em células de vários tecidos como mama, próstata, cérebro e células do sistema imune. Além disso, alguns desses tecidos expressam a enzima 1-OHase, responsável pela hidroxilação renal da 25(OH)D (HOLICK, 2007; CASTRO, 2011; VANLINT, 2013).

1.4.2 Níveis gerais de vitamina D

Os níveis de VDR diminuem com a idade, o que provavelmente contribui para a resistência a 1,25(OH)₂D observada em idosos (DE LUCA, 2004; MITHAL *et al.*, 2009; MARQUES *et al.*, 2010). Em condições fisiológicas, os valores séricos da vitamina D (25(OH)D) que correspondem a suficiência ficam entre 30-100 ng/mL. Valores entre 21-29 ng/mL caracterizam um estado de insuficiência, abaixo de 20ng/mL de deficiência e valores acima de 100ng/mL indicam intoxicação (HOLICK *et al.*, 2011).

As principais consequências da deficiência ou da insuficiência de vitamina D são o hiperpatireoidismo secundário, que está relacionado diretamente com maiores índices de fraturas. Outras condições clínicas que podem se associar a redução dos níveis de séricos de 25(OH)D são a esquizofrenia, depressão, diabetes tipo 1 e alguns tipos de neoplasias malignas e obesidade (HOLICK, 2007; BUSSE *et al.*, 2013; HOLICK *et al.*, 2011; VANLINT, 2013; VIMESWARAN *et al.*, 2013).

Além do envelhecimento, a obesidade também pode estar relacionada com níveis reduzidos de vitamina D em consequência do “sequestro” da vitamina D no tecido adiposo. Outro mecanismo que pode estar relacionado com a menor biodisponibilidade de vitamina D em obesos seria a menor capacidade de liberação sistêmica de vitamina D₃ dos depósitos na pele (WORTSMAN *et al.*, 2000).

Com intuito de avaliar as consequências da deficiência ou da insuficiência de vitamina D em obesos, foram realizados alguns estudos sobre a resposta à suplementação com vitamina D neste grupo específico de pacientes. Os resultados não são unânimes ao afirmar a necessidade de suplementação em obesos com maiores doses de vitamina D devido a uma possível resistência periférica à ação da vitamina D (RAJAKUMAR *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2009; KAMYCHEVA *et al.*, 2013; SALIBA *et al.*, 2013).

a. Obesidade

A obesidade é definida como uma doença crônica de origem multifatorial. A rotina da vida moderna que engloba a falta de atividade física adequada, estresse, alimentação desequilibrada aliada a fatores genéticos desencadeiam o

desenvolvimento e o agravamento da obesidade e das suas comorbidades (REPETTO et al, 2003).

Segundo a OMS a obesidade é definida como “um acúmulo excessivo ou anormal de gordura que pode ser prejudicial a saúde”. Sua classificação é realizada através do cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC), amplamente utilizado para classificar sobrepesos e obesidade em adultos. O diagnóstico de obesidade é estabelecido quando o IMC é maior ou igual a 30 kg/m². Segundo esses critérios, uma estimativa mundial realizada pela OMS em 2014 revelou que dois bilhões de adultos estavam acima do peso e, destes, mais de meio bilhão são obesos.

No passado a obesidade foi considerada benéfica para a integridade óssea devido à alta DMO observada em indivíduos com excesso de peso (REID *et al.*, 1992). Contudo, estudos recentes mostraram que o excesso de tecido adiposo, além de não favorecer o osso, já foi identificado como fator de risco para fraturas (CAO, 2011; GONNELLI e CAFFARELLI, 2014).

Numa visão mais atual o tecido adiposo deixou de ser considerado apenas como reservatório de energia, passando a ser visto como um órgão endócrino por ser capaz de produzir e secretar vários peptídeos bioativos denominados adipocinas. Dentre estes se destacam a adiponectina, a leptina, a interleucina 6 (IL-6), a resistina e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) que é uma citocina inflamatória também secretada por este tecido (STOKIĆ *et al.*, 2015).

1.5.1 Adipocinas: adiponectina e leptina

As adipocinas são hormônios com funções pleiotrópicas envolvidas com a regulação do metabolismo energético como o apetite e a sensibilidade à ação da insulina (KHAN e JOSEPH, 2014; NIGRO et al, 2014). Elas regulam o microambiente do tecido adiposo, promovendo a comunicação com outros tecidos e desempenham atividades como o controle da ingestão alimentar e a regulação da sensibilidade à ação da insulina. As alterações na secreção das adipocinas podem ter um papel central na fisiopatologia da obesidade e das suas complicações (GUIMARÃES *et al.*, 2007; NAKAMURA *et al.*, 2014).

1.5.1.1 Adiponectina

A adiponectina é derivada do gene ADIPOQ localizado no cromossomo 3q27, que transcreve um peptídeo de 224 aminoácidos com cadeia de peso molecular de 30kDa. É produzida e secretada pelo tecido adiposo. Ela atua em células de diversos tecidos (Figura 5) tendo uma função bem definida como agente antidiabético, anti-inflamatório, antiaterogênico e cardioprotetor (CARVALHO *et al.*, 2004; GUIMARÃES *et al.*, 2007; KHAN e JOSEPH, 2014; NIGRO *et al.*, 2014).

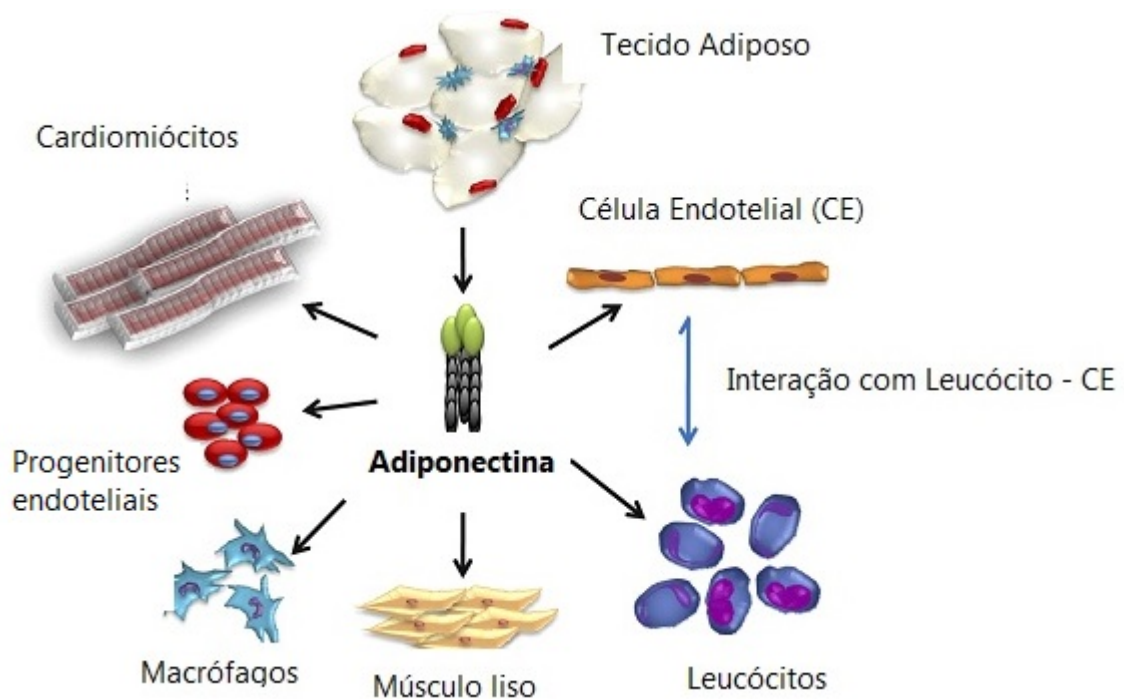


Figura 5. Interações e efeitos sistêmicos da adiponectina. A adiponectina liberada pelos adipócitos atua pelas vias endócrina e parácrina na modulação da função e atividade dos cardiomiócitos, células endoteliais (CE) e seus progenitores, macrófagos, leucócitos e musculatura lisa dos vasos sanguíneos. Adaptado de XU e VANHOUTTE, 2012.

A adiponectina possui uma característica diferente da maioria das proteínas secretadas pelos adipócitos, uma vez que a sua expressão diminui à medida que o tecido adiposo aumenta. Ela age por meio de dois receptores, Adipo R₁, encontrado no músculo esquelético e Adipo R₂ amplamente encontrado no fígado (KADOWAKI e YAMAGUCHI, 2005). A adiponectina sintetizada no músculo esquelético tem a função de aumentar o transporte de glicose e estimular a oxidação dos ácidos graxos. No fígado ela atua através da inibição da expressão de enzimas gliconeogênicas hepáticas e na produção de glicose (COMBS *et al.*, 2001; XU *et al.*, 2003).

1.5.1.2. *Leptina*

A leptina foi descrita em 1994 e é considerado um marco importante na pesquisa da obesidade por ter fornecido um novo cenário para o conhecimento dos mecanismos que envolvem a homeostase energética. Ela age no sistema nervoso central (hipotálamo) controlando a ingestão alimentar, aumentando o gasto energético e regulando a função neuroendócrina, o metabolismo de glicose e de gordura (LEGIRAN e BRANDI, 2012; FAROOQUI e O'RAHLILLY, 2014; KHAN e JOSEPH, 2014; MUNZBERG e MORISSON, 2015).

A leptina, (do grego *Leptos* que significa magro) é derivada do gene *Lep*, localizado no cromossomo 7q31.3, que transcreve um peptídeo de 167 aminoácidos com cadeia de peso molecular de 16-kDa, membro da família das citocinas de cadeia helicoidal longa. A leptina é produzida e secretada predominantemente pelo tecido adiposo branco e seus níveis circulantes são proporcionais à extensão e ao volume deste tecido (LEGIRAN e BRANDI, 2012; KHAN e JOSEPH, 2014; MUNZBERG e MORISSON, 2015). GNACIŃSKA *et al.* (2010), avaliando a atividade do tecido adiposo em relação ao sobrepeso e à obesidade, constataram que indivíduos com baixa ingesta calórica tem concentração sérica de leptina significativamente menor do que obesos.

A liberação de leptina ocorre em picos de aproximadamente trinta minutos, atingindo o maior nível durante a noite e nas primeiras horas da manhã (ROMERO e ZANESCO, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2007). Embora a leptina classicamente atue na regulação do peso através da ingestão dos alimentos, gasto energético e distribuição de gordura, ela também atua sobre o metabolismo ósseo através de receptores centrais e periféricos localizados no osso (LEGIRAN e BRANDI, 2012; CARTER *et*

al., 2013; KHAN e JOSEPH, 2014; SHARMA *et al.*, 2014). Esta ação pode ser positiva quando direcionada para a regulação da formação óssea através de ações diretas sobre o osso ou, negativa, quando estiver direcionada para a supressão da formação óssea e aumento a reabsorção através da via de transmissão hipotalâmica (MOTYL e ROSEN, 2012).

1.5.2 Adipocinas e tecido ósseo

Além da expressão de neuropeptídeos envolvidos com o aumento ou com a diminuição da ingestão alimentar, a leptina ao se ligar ao seu receptor Ob-Rb nos núcleos hipotalâmicos, ativa duas vias centrais diferentes que influenciam a formação óssea. Na primeira, através de sinalização simpática via receptores β -adrenérgicos, ela diminui a formação óssea pelos osteoblastos e induz a secreção de RANKL, potencializando a reabsorção óssea pelos osteoclastos (KIM *et al.*, 2010). O segundo mecanismo envolve a modulação do transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), um neuropeptídeo hipotalâmico cuja expressão é aumentada pela leptina. A expressão diminuída do RANKL pelo CART inibe a diferenciação osteoclástica (THOMAS *et al.*, 1999; ELEFTERIOU *et al.*, 2004; TAKEDA, 2008; KIM *et al.*, 2010).

Na via de ação periférica da leptina os receptores presentes desta adipocina nos osteoblastos estimulam a sua proliferação e inibem a ação dos osteoclastos favorecendo a formação óssea (KAWAI *et al.*, 2012).

Em relação à adiponectina, apesar de já terem sido identificados receptores em osteoclastos e osteoblastos, a sua ação sobre o osso ainda não está totalmente esclarecida, sendo relatado efeitos controversos sobre o aumento da massa óssea

(KAJIMURA *et al.*, 2013). É possível que a adiponectina possua uma ação direta sobre as células estromais da medula e uma ação indireta, através da modulação por fatores de crescimento (WILLIAMS *et al.*, 2009). Kajimura *et al.* (2013) mostraram que camundongos deficientes em adiponectina tem menor massa óssea por inibição da proliferação e por estimulação da apoptose osteoblástica. Recentemente, um estudo clínico realizado na Suécia, com 989 homens idosos mostrou que o aumento dos níveis séricos de adiponectina podem estar relacionados com maior risco de fraturas (JOHANSSON, 2014). Resultados de outros estudos (WU *et al.*, 2014) mostraram que a adiponectina é capaz regular a massa óssea através de um mecanismo central, estimulando a diferenciação osteoblástica e inibindo a diferenciação osteoclástica.

Os resultados de estudos experimentais em camundongos deficientes em adiponectina demonstraram maior resistência à perda óssea vertebral após ooforectomia. Nos animais sem função ovariana e deficientes em adiponectina houve aumento da expressão e dos níveis de FAO, indicando um aumento da atividade osteoblástica em relação aos animais do grupo controle (WANG *et al.*, 2013).

1.5.3 Fator de necrose tumoral alfa e tecido adiposo

O tecido adiposo é local de síntese de diversas proteínas envolvidas com o processo inflamatório. O TNF- α está entre as citocinas secretadas pelo tecido adiposo e relacionada com a inflamação (GNACIŃSKA *et al.*, 2010).

O TNF- α é uma proteína transmembranar de 25 kDa produzida principalmente por macrófagos ativados durante os processos inflamatórios

(AGGARWAL *et al.*, 2013). Na obesidade, os macrófagos infiltrados no tecido adiposo contribuem para a secreção de grande parte desta citocina (LEE *et al.*, 2014). Atualmente já está bem estabelecido que o TNF- α é um dos componentes do estado inflamatório crônico da obesidade (KHAN e JOSEPH, 2014), está superexpresso no tecido adiposo e é encontrado em altas concentrações séricas em indivíduos obesos. A perda de peso em obesos acarreta redução significativa dos níveis séricos de TNF- α (ZICCARDI *et al.*, 2002; NICKLAS *et al.*, 2005).

Além do papel no metabolismo energético, o TNF- α também participa de processos que levam a destruição da cartilagem e do osso. Saitenberg-Kermanach *et al.* (2004), relataram em pacientes com artrite reumatoide, a redução do *turnover* ósseo quando era feita a associação de osteoprotegerina com anti-TNF- α , indicando o papel protetor sobre a perda óssea desta associação. Este efeito é dado pelo efeito anti-reabsortivo do anti-TNF- α e pelo efeito anabólico da osteoprotegerina.

1.5.4 Regulação metabólica da vitamina D em obesos

Apesar da associação entre níveis reduzidos de vitamina D e obesidade já estar estabelecida, os mecanismos envolvidos nesta associação ainda não estão totalmente elucidados. As principais hipóteses seriam a baixa ingestão de vitamina D por indivíduos obesos, aumento da captação da vitamina D pelo tecido adiposo, aumento da depuração metabólica e estilo de vida sedentário com diminuição de atividades ao ar livre e consequente redução da exposição à luz solar (WORTSMAN *et al.*, 2000; BOLLAND *et al.*, 2007; VANLINT, 2013).

Os efeitos da suplementação de vitamina D em indivíduos obesos foram investigados esparsamente e os resultados permanecem controversos. Rajakumar *et*

al. (2008) não observaram diferença entre os níveis de vitamina D e a resposta à suplementação em pré adolescentes obesos e não obesos. Já Lee *et al.* (2009) encontraram uma correlação negativa entre as concentrações de vitamina D e IMC, concluindo que a eficácia da suplementação de vitamina D depende do IMC. Pacientes com sobrepeso e obesos necessitariam de doses maiores de vitamina D para normalizar os níveis séricos em relação aos indivíduos com peso normal. Recentemente, Saliba *et al.* (2013) demonstraram que o aumento dos níveis de 25(OH)D em resposta ao tratamento com suplementação com vitamina D foi maior em não obesos em relação a indivíduos obesos. Diferentemente, Kamycheva *et al.* (2013), não observaram relação entre os níveis de vitamina D e IMC.

Wamberg *et al.* (2013) demonstraram que a 25(OH)D possui efeito anti-inflamatório sobre os adipócitos. Entretanto, neste estudo, não foi observada redução dos marcadores inflamatórios sistêmicos em um grupo de participantes que recebeu 7000 UI de vitamina D oral diária durante 26 semanas.

1.6 Justificativa

A prevalência de doenças crônico degenerativas como a osteoporose aumentou substancialmente nas últimas décadas no Brasil e mundialmente, sobretudo em virtude do aumento da expectativa de vida e do consequente envelhecimento populacional. As fraturas por fragilidade óssea decorrentes de traumas de baixo impacto são a principal complicação da osteoporose. O seu tratamento tem um grande impacto econômico para a sociedade e este custo é particularmente maior em indivíduos obesos em virtude da maior morbidade e mortalidade observada neste grupo de pacientes. A associação entre osteoporose e

obesidade é ainda mais preocupante considerando-se os dados do Ministério da Saúde, que mostraram que entre 2006 e 2012 os índices de obesidade no Brasil aumentaram em 54%. A doença atinge 51% da população adulta e seu avanço está diretamente relacionado com hábitos alimentares e sedentarismo.

O Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad (INTO) no Rio de Janeiro é um órgão do Ministério da Saúde, voltado para a formulação de uma política nacional sobre a prevenção, diagnóstico e tratamento das doenças do sistema musculoesquelético. Dentro deste contexto, propomos uma ação voltada particularmente para a reposição de vitamina D em osteoporóticos obesos, sobretudo naqueles com deficiência ou insuficiência da vitamina em tratamento com medicamento anti-reabsortivo. Simultaneamente propomos avaliar se a suplementação com vitamina D tem uma ação positiva sobre alguns marcadores bioquímicos relacionados com a obesidade.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da suplementação de vitamina D sobre as adipocinas leptina, adiponectina e TNF- α em idosos obesos com hipovitaminose D e osteoporóticos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os níveis de vitamina D por bioquímica sanguínea antes e um ano depois do tratamento com doses diárias de 800 UI de vitamina D₃ e 1000 mg de cálcio;
- Avaliar os níveis séricos dos marcadores da formação (osteoprotegerina e fosfatase alcalina óssea) e da reabsorção óssea (CTX) em resposta ao tratamento com bisfosfonatos, cálcio e vitamina D;

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Pacientes

3.1.1 Amostra inicial

Entre janeiro de 2012 e janeiro de 2014, 263 homens e mulheres com mais de 60 anos, foram admitidos no INTO para participar do projeto OSTEOPREV, uma pesquisa clínica que teve como objetivo avaliar a resposta do tecido ósseo ao tratamento com quatro medicamentos anti-osteoporóticos, associados à suplementação com cálcio e com vitamina D.

Para ingressar no projeto Osteoprev os voluntários deveriam ter história confirmada por radiografia de fratura por fragilidade óssea e/ou diagnóstico radiográfico de colapso vertebral. Constituíram critérios de exclusão doença esofágica sintomática, níveis séricos de cálcio $>10\text{mg/dL}$, intolerância aos medicamentos investigados (teriparatida, alendronato, ácido zoledrônico e ranelato de estrôncio), impossibilidade de permanecer em ortostatismo durante 30 minutos, doença neoplásica maligna, *deficit* cognitivo grave, utilização de qualquer medicamento anti-reabsortivo ou anabólico nos últimos seis meses, uso continuado de glicocorticóides e recusa em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO II).

O projeto Osteoprev, do qual foram recrutados os voluntários para a

investigação específica do presente estudo, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INTO através do parecer nº 00050305-09 (ANEXO I). Ao final do 12º mês de tratamento todos os voluntários foram submetidos à avaliação por microtomografia periférica de alta resolução, densitometria óssea, exames clínicos e bioquímicos para comparação com os valores basais dos mesmos exames.

3.1.2 Amostra específica (Obesos)

A partir da amostra geral (n=263) do projeto OSTEOPREV foram selecionados 21 voluntários. Constituíram critérios de inclusão: IMC ≥ 30 Kg/m², uso de medicamentos antirreabsortivos para osteoporose, nível de vitamina D <29 ng/mL e história de fratura por fragilidade e/ou colapso vertebral. Constituíram critérios de exclusão: voluntários com IMC <30 Kg/m², uso de medicamento osteoformador ou que apresentasse em conjunto as ações antirreabsortiva e osteoformadora para osteoporose, voluntários com doença renal crônica ou hepática e hiperparatireoidismo secundário.

3.2 Diagnóstico de osteoporose

O diagnóstico clínico de osteoporose foi estabelecido na fase de admissão no projeto Osteoprev, durante consulta médica direcionada para a investigação de fratura por fragilidade. O voluntário que comprovasse através de documentação radiográfica de uma ou mais fraturas prévias por fragilidade estava apto para ingressar no estudo. Pacientes sem documentação radiográfica e/ou sem história de fratura prévia eram avaliados quanto à possibilidade de serem portadores de colapso vertebral. O

diagnóstico de colapso vertebral foi feito em radiografias digitais da coluna torácica e lombar por um único observador independente, com ampla experiência no diagnóstico e tratamento de doenças do sistema musculoesquelético. Foi utilizado como critério diagnóstico de colapso a redução da altura do corpo vertebral em relação a uma vértebra normal do paciente e/ou acunhamento vertebral traduzido por maior redução da altura na porção anterior da vértebra em relação à porção posterior e/ou protusão ou desvio do muro posterior do corpo vertebral.

O diagnóstico densitométrico de perda óssea foi feito por Raios-X de dupla energia (DEXA) em aparelho modelo *Prodigy Advance Plus LUNAR* (GE, Madison, Wisconsin, USA). A interpretação dos resultados densitométricos seguiu as referências utilizadas pela OMS que considera para o diagnóstico de osteoporose valores de T-Score $\leq -2,5$ DP; para o diagnóstico de osteopenia T-Score entre $-1,0$ e $-2,5$ DP e como faixa de normalidade valores de T-score >-1 DP.

3.3 Diagnóstico de obesidade

O diagnóstico de obesidade foi estabelecido segundo os critérios e recomendações da OMS através do IMC. O IMC foi calculado através da razão entre o peso (kg) e o quadrado da estatura (m), sendo considerados obesos os indivíduos com $IMC \geq 30$ kg/m². Esta medida foi realizada no início da investigação e em todas as consultas até completar 12 meses de estudo.

3.4 Análise da bioquímica sanguínea

A cada três (03) meses foram coletadas amostras de 10 mL de sangue, em tubo soro gel após jejum de 8 horas. Após a retração do coágulo as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a uma rotação 2200g. A seguir o soro foi aliquotado e congelado a -20°C até o processamento para avaliação dos marcadores do metabolismo ósseo e das adipocinas. As análises foram realizadas em laboratório terceirizado do INTO.

As avaliações bioquímicas dos níveis séricos de vitamina D, FAO e CTX foram realizadas a cada três meses até completar 12 meses de tratamento com medicamento anti-osteoporótico associado à suplementação com cálcio e vitamina D. A avaliação desses marcadores fez parte do protocolo de investigação e acompanhamento laboratorial dos pacientes do projeto Osteoprev. As avaliações adicionais dos marcadores OPG, adiponectina, leptina e $\text{TNF-}\alpha$, foram feitas apenas nos 21 voluntários obesos com hipovitaminose D.

3.4.1 Vitamina D

A determinação dos níveis séricos de vitamina D foi feita por técnica de eletroquimiluminescência (ECLIA) sendo considerada como faixa de normalidade valores de $25(\text{OH})\text{D}$ entre 30-100 ng/mL. O diagnóstico de deficiência ou de insuficiência de vitamina D, seguiu as recomendações da Diretriz da Sociedade Americana de Endocrinologia (HOLICK et al., 2011), sendo considerada insuficiência valores entre 21-29 ng/mL e deficiência de vitamina D valores séricos abaixo de 20ng/mL.

3.4.1.1 Protocolo de suplementação com vitamina D₃

Durante os 12 meses de duração do Osteoprev e, independente dos níveis séricos de vitamina D, os voluntários foram tratados com 500 mg de carbonato de cálcio e 400 UI de vitamina D₃ administrada por via oral (cápsulas) em duas doses diárias correspondendo a 1000 mg de carbonato de cálcio e 800 UI de vitamina D.

A partir do acompanhamento trimestral todos os voluntários com diagnóstico laboratorial de deficiência ou insuficiência de vitamina D foram suplementados adicionalmente com terapia em *bolus* com dose única de 200.000UI de vitamina D₃ por via oral (50 gotas contendo 4000UI/gota) também segundo as recomendações da Diretriz da Sociedade Americana de Endocrinologia (HOLICK et al., 2011). A terapia em *bolus* era repetida sempre que constatada hipovitaminose D na avaliação bioquímica trimestral.

3.4.2 Marcadores do metabolismo ósseo (C-telopeptídeo, fosfatase alcalina óssea e osteoprotegerina)

A metodologia empregada para a análise da FAO foi de imunoensaio enzimático e do CTX por ECLIA. Os níveis de osteoprotegerina foram determinados por ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*, Boster Immunoleader, Fremont, California, USA) seguindo as instruções do fabricante.

3.4.3 Adipocinas : adiponectina, leptina e marcador do estado inflamatório crônico (TNF- α)

As análises bioquímicas para a determinação dos níveis séricos de TNF- α , adiponectina e leptina foram realizadas por ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*, Boster Immunoleader, Fremont, California, USA) seguindo as instruções do fabricante.

3.5 Análise estatística

A análise de distribuição de normalidade dos dados foi realizada pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis numéricas foram expressas pela mediana, amplitude interquartílica (AIQ) e os extremos mínimo e máximo. A comparação entre as variáveis basais e finais foi feita com o teste de Mann-Whitney pareado para as variáveis que tiveram a hipótese de normalidade rejeitada. A relação entre valores basais e finais da mesma variável e entre os valores finais da vitamina D e das demais variáveis foi avaliada através de regressão linear. Em todas as análises foi adotada a significância de 5%. As análises estatísticas foram feitas utilizando o software estatístico R, versão 3.2.2 (<https://www.R-project.org>).

4.1 Distribuição dos dados

Na comparação entre os valores numéricos basais e finais das variáveis estudadas, foi utilizado método não paramétrico (Teste de Mann-Whitney), pois se observou que os dados apresentavam distribuição não normal (não Gaussiana), devido à rejeição da hipótese de normalidade avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk.

4.2 Características dos pacientes

Dos 21 voluntários que constituíram a amostra do presente estudo, 20 (95,2%) eram mulheres com idade mediana de 74 anos (faixa de variação entre 63-86 anos). Durante os 12 meses de realização da pesquisa todos os participantes permaneceram em tratamento clínico para osteoporose com alendronato sódico (52,4%) ou ácido zoledrônico (47,6%) associado, em ambos os casos, com suplementação diária com 1000 mg de cálcio e 800 UI de Vitamina D.

4.3 Diagnóstico de osteoporose

4.3.1 Avaliação densitométrica da perda óssea

A mediana, a amplitude interquartilica e os valores mínimo e máximo do T-Score basal da região do colo do fêmur, utilizado como parâmetro diagnóstico de perda óssea (osteopenia ou osteoporose), estão listados na Tabela 1. A maioria dos pacientes (n=14) estava situada na faixa de osteopenia (valores de T

Score entre -1,0 e -2,5 DP). O diagnóstico densitométrico de osteoporose foi estabelecido em três pacientes (-2,8 DP) e nos demais (n=4) os valores do T Score estavam dentro da faixa de normalidade (-0,2 a -0,8 DP). Os valores individuais da avaliação densitométrica por DEXA estão relacionados no ANEXO III.

4.3.2 Diagnóstico clínico-radiográfico

Na avaliação radiográfica da coluna vertebral todos os pacientes foram diagnosticados como portadores de osteoporose através da identificação de colapso de um ou mais corpos vertebrais da coluna torácica e/ou lombar. Em dez pacientes houve associação do colapso vertebral com história de fratura por fragilidade óssea no terço distal do rádio (n=6), no terço proximal do úmero (n=3), no terço proximal do fêmur (n=2) e no cotovelo (n=1) (ANEXO III).

4.4 Diagnóstico de obesidade

Através da medida do IMC na avaliação basal, todos os participantes foram diagnosticados como portadores de obesidade por apresentarem $IMC \geq 30$ kg/m². Durante o período de acompanhamento do estudo não houve alteração do estado nutricional dos pacientes, que permaneceram obesos (IMC basal 33 kg/m² e final 32,6 kg/m², p=0,19) (Tabela 1).

4.5 Acompanhamento clínico da hipovitaminose D

O valor mediano dos níveis séricos basais de 25(OH)D foi 11,0 ng/mL (variação entre 4,0 – 29,7 ng/mL) confirmando o diagnóstico de deficiência ou insuficiência de 25(OH)D em todos os pacientes (Tabela 1). Além da suplementação diária com 1000 mg de cálcio e 800 UI de vitamina D, todos

foram tratados com duas a quatro suplementações adicionais com 200.000 UI de vitamina D. Na avaliação bioquímica final observou-se que embora os níveis séricos de 25(OH)D tenham aumentado significativamente em relação ao estado basal ($p < 0,0001$, figura 6), permaneceram abaixo (26 ng/mL) do valor mínimo da faixa de normalidade (30 ng/mL). Não houve correlação entre os níveis basais e finais de vitamina D (Figura 7). Os valores séricos individuais da 25(OH)D na avaliação basal e nas avaliações trimestrais e o número de suplementações em *bolus* com 200.000UI de vitamina D₃ ministradas aos pacientes estão discriminados no ANEXO V.

Tabela 1. Descritiva das variáveis numéricas dos pacientes obesos osteoporóticos com o correspondente nível descritivo (p valor) obtido pelo teste de Mann-Whitney.

Variável	n	mediana	AIQ	mínimo	máximo	p valor
Idade (anos)	21	73,2	67,5 - 77,0	63	86	-
T-Score (basal)	21	-1,6	-2,5 - -1,10	-2,80	-0,20	-
IMC kg/m ² (basal)	21	33,3	32,0 - 36,2	30,1	43,7	
IMC kg/m ² (final)	21	32,6	30,6 - 35,4	28,7	45,9	0,19
25(OH)D (ng/mL) (basal)	21	11,0	7,8 - 15,4	4,0	29,7	
25(OH) D (ng/mL) (final)	21	26,0	22,5 - 30,8	5,1	46,9	0,0001

AIQ: Amplitude Interquartílica: Q1- Q3; 25(OH)D: 25 hidroxi vitamina D; IMC: Índice de massa corporal.

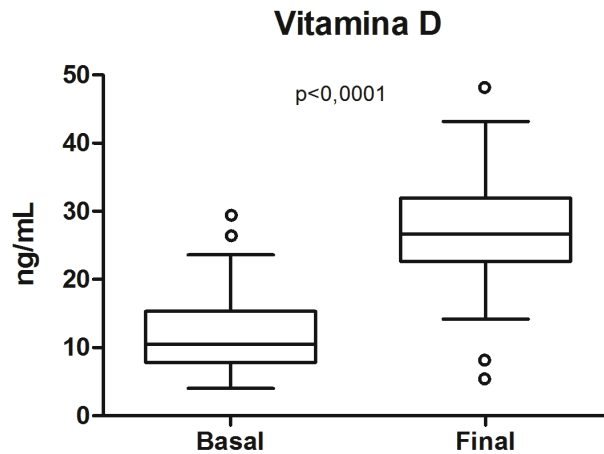


Figura 6. Avaliação bioquímica dos níveis de 25(OH)D em pacientes osteoporóticos obesos antes e depois da suplementação oral com cálcio e vitamina D durante 12 meses. Bloxpot: mediana, quartis e outliers. Teste de Mann-Whitney.

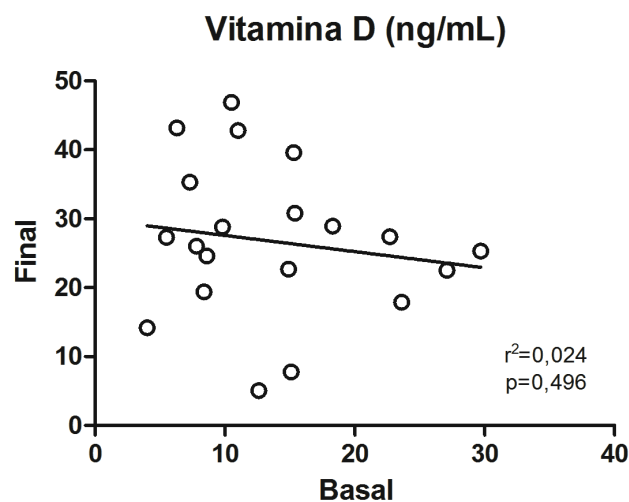


Figura 7. Correlação entre os valores basais e finais de 25(OH)D em pacientes osteoporóticos obesos após suplementação oral com cálcio e vitamina D durante 12 meses. Teste de correlação de Pearson.

4.6 Avaliação dos marcadores de formação (fosfatase alcalina óssea e osteoprotegerina) e de reabsorção óssea (C-telopeptídeo)

Os níveis séricos basais de CTX e de FAO diminuíram significativamente ($p < 0,0001$ e $p < 0,008$ respectivamente) em relação à medida final realizada após 12

meses de tratamento com medicamento anti-reabsortivo associado à suplementação com vitamina D e cálcio. Neste mesmo período e, nas mesmas condições, os níveis séricos de osteoprotegerina aumentaram significativamente ($p < 0,0001$) em relação aos níveis basais (Tabela 2 e Figura 8 A-C). Não houve correlação entre os níveis basais e finais de CTX e de FAO (Figura 8 D e E). Os níveis finais de osteoprotegerina mostraram relação direta com o valor obtido na avaliação inicial ($p < 0,0001$) (Figura 8 F).

Tabela 2. Valores dos níveis séricos de C-telopeptídeo (CTX), fosfatase alcalina óssea (FAO) e osteoprotegerina (OPG) na avaliação basal e final, após tratamento com medicamento antireabsortivo e suplementação oral com cálcio e vitamina D durante 12 meses.

Variável	Basal				Final				<i>p</i> valor ^a
	n	mediana	AIQ		mediana	AIQ			
CTX (ng/mL)	21	0,311	0,210	- 0,404	0,141	0,109	- 0,194		0,0001
FAO (µg/L)	21	33,5	25,1	- 37,0	22,9	16,4	- 28,4		0,008
OPG (pg/mL)	21	2,70	2,0	- 2,90	2,90	2,75	- 3,60		0,0001

AIQ: Amplitude Interquartilica: Q1- Q3; CTX: C-telopeptídeo; FAO: fosfatase alcalina óssea; OPG: Osteoprotegerina. ^a Teste de Mann-Whitney pareado.

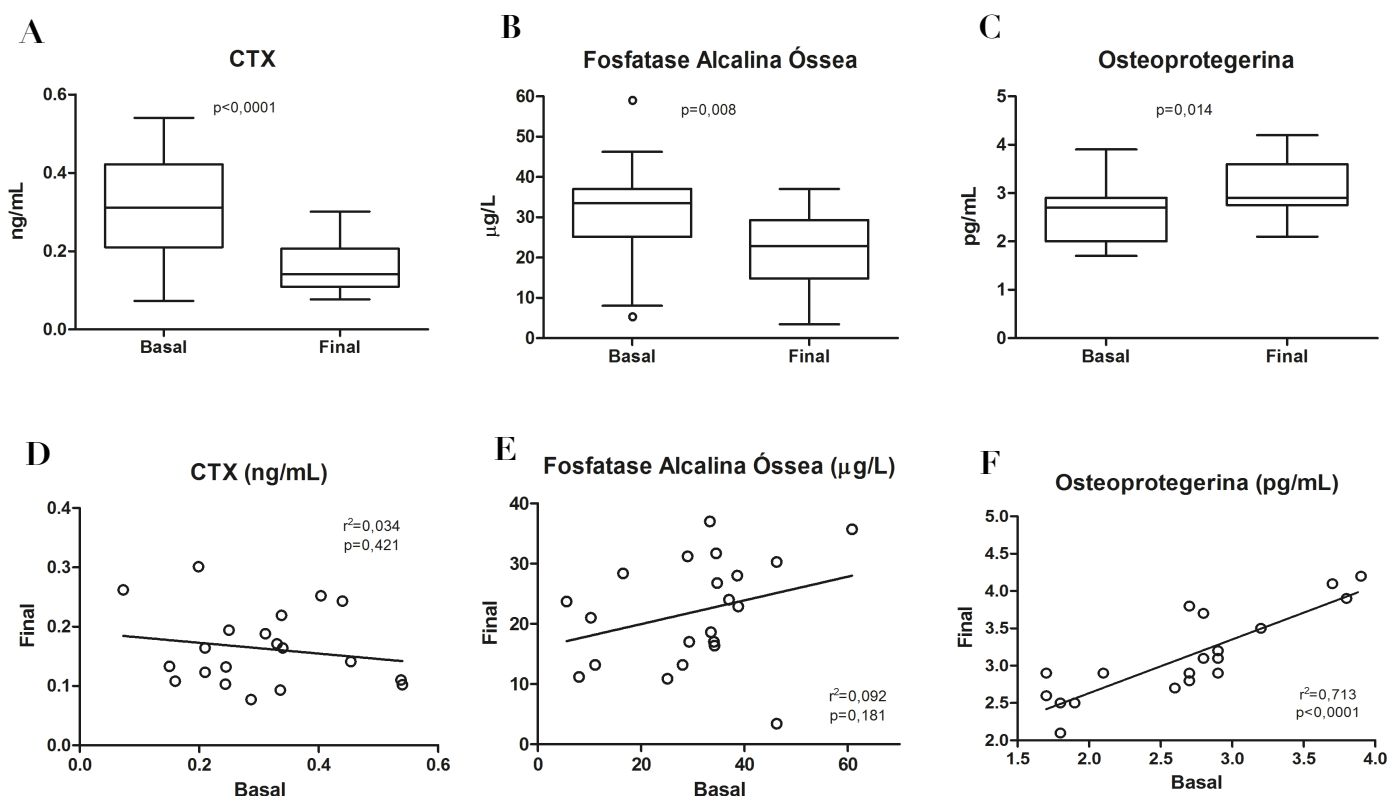


Figura 8. Avaliação bioquímica dos níveis de C-telopectídeo (CTX), fosfatase alcalina óssea (FAO) e osteoprotegerina (OPG) (A-C) e correlação entre os valores basais e finais dessas variáveis (D-F) em pacientes osteoporóticos obesos antes e após a suplementação oral com cálcio e vitamina D durante 12 meses. Bloxpot: mediana, quartis e outliers. (A-C) Teste de Mann-Whitney e (D-F) Teste de correlação de Pearson.

4.7 Avaliação dos níveis de adipocinas adiponectina, leptina e marcador do estado inflamatório crônico (TNF- α)

Os níveis séricos de leptina e de TNF- α reduziram significativamente ($p < 0,001$ e $0,002$ respectivamente) em relação à medida final realizada após 12 meses de tratamento com medicamento anti-reabsortivo associado à suplementação com vitamina D e cálcio. Neste mesmo período e, nas mesmas condições, os níveis séricos de adiponectina aumentaram significativamente ($p < 0,0001$) em relação aos níveis basais (Tabela 3 e Figura 9 A-C). Os níveis séricos finais dos três marcadores

se correlacionaram positivamente com os níveis iniciais ($p<0,001$ para leptina, $p<0,0001$ para adiponectina e $p<0,002$ para $\text{TNF-}\alpha$) (Figura 9 D-F).

Tabela 3. Valores dos níveis séricos de leptina, adiponectina e $\text{TNF-}\alpha$ na avaliação basal e final, após tratamento com medicamento antireabsortivo e suplementação oral com cálcio e vitamina D durante 12 meses.

Variável	Basal			Final		p valor ^a
	n	mediana	AIQ	mediana	AIQ	
Leptina (ng/mL)	21	2,7	2,4 - 3,1	2	1,5 - 2,8	0,001
Adiponectina (ng/mL)	21	15	12 - 20	26	20 - 33	0,0001
$\text{TNF-}\alpha$ (pg/mL)	21	4,80	4,00 - 5,45	3,60	3,20 - 4,60	0,002

AIQ: Amplitude Interquartilica; Q1- Q3. CTX: C-telopeptídeo. FAO: fosfatase alcalina óssea. OPG: osteoprotegerina.

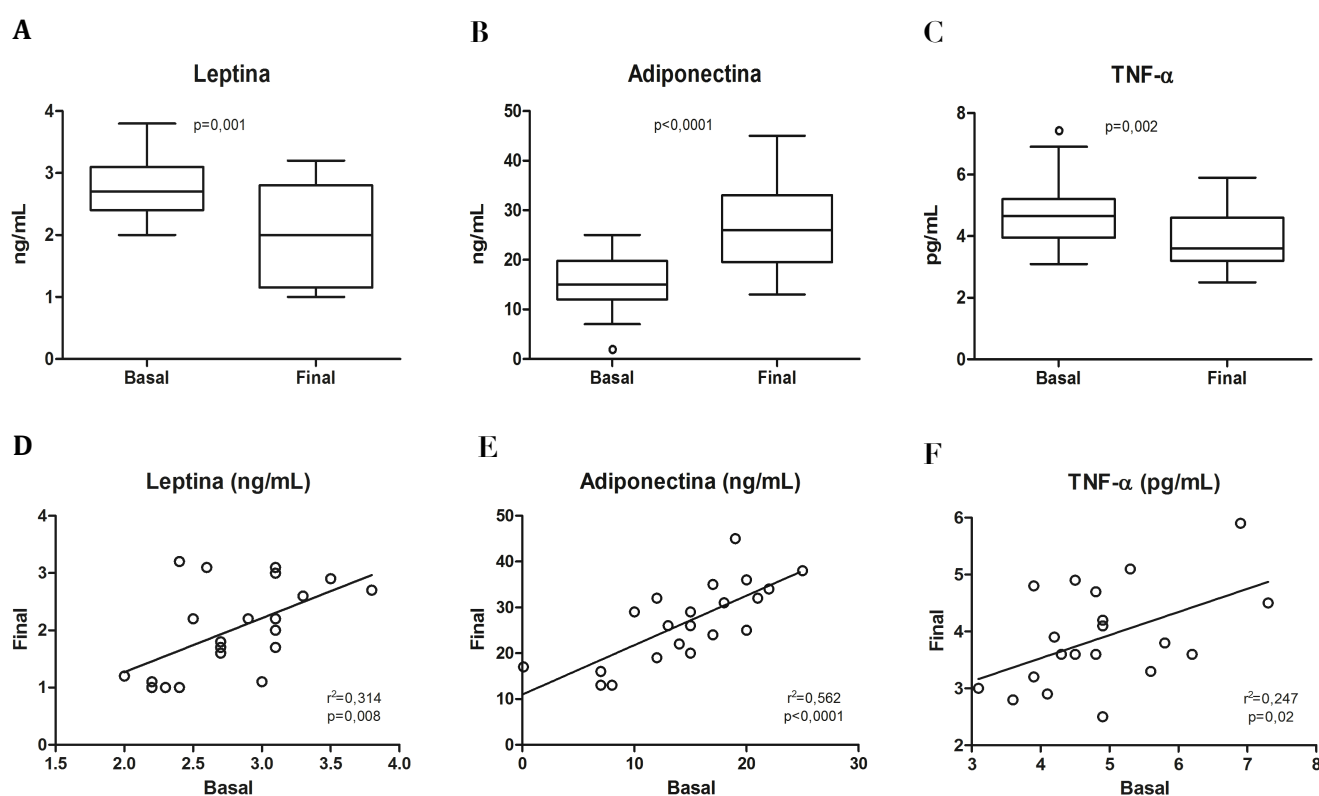


Figura 9. Avaliação bioquímica dos níveis de leptina, adiponectina e $\text{TNF-}\alpha$ (A-C) e correlação entre os valores basais e finais dessas variáveis (D-F) em pacientes osteoporóticos obesos antes e depois da suplementação oral com cálcio e vitamina D durante 12 meses. Bloxpot: mediana, quartis e outliers. (A-C) Teste de Mann-Whitney e (D-F) Teste de correlação de Pearson.

4.8 Avaliação da relação entre os valores finais da vitamina D com os valores finais dos marcadores do metabolismo ósseo e das adipocinas

Não foi observada correlação estatisticamente significativa entre os valores finais da vitamina D com os valores finais de CTX ($p=0,94$), fosfatase alcalina ($p=0,24$), osteoprotegerina ($p=0,89$), adiponectina ($p=0,61$), leptina ($p=0,58$) e TNF- α ($p=0,98$) pelo teste de correlação de Pearson.

No presente estudo avaliamos os níveis dos marcadores do metabolismo ósseo e energético e do estado inflamatório crônico em resposta a suplementação com cálcio e vitamina D durante 12 meses, em pacientes obesos e osteoporóticos com hipovitaminose D em uso de bisfosfonatos. Após a suplementação oral, os níveis de vitamina D aumentaram significativamente em relação aos valores pré-tratamento. Contudo, os valores finais permaneceram abaixo da faixa de referência de normalidade. Embora não seja possível estabelecer a partir dos nossos resultados uma relação causal direta entre a elevação dos níveis de vitamina D e a redução dos níveis séricos de leptina e TNF- α e aumento dos níveis de adiponectina circulante, esta relação é sustentada por relatos da literatura (Zhu *et al.* 2005; MALECKI, 2006; Nimitphong *et al.* 2009; KONG *et al.*, 2013).

Estudo realizado por Wortsman *et al.* (2000) em indivíduos obesos e não obesos, mostrou que o estímulo pela radiação UV e à suplementação oral com 25(OH)D, acarretou em aumento de 57% nos níveis séricos da vitamina nos indivíduos não obesos. Considerando que os níveis séricos basais de 7-deidrocolesterol eram semelhantes entre os dois grupos, os autores concluíram que a obesidade não afeta a síntese cutânea de 7-deidrocolesterol. A resposta diminuída dos obesos às duas intervenções (suplementação e exposição à radiação UV), segundo estes autores pode estar relacionada com um defeito na liberação sistêmica do 7-deidrocolesterol e/ou com a baixa biodisponibilidade da vitamina D que, nos obesos estaria sequestrada nos grandes depósitos de gordura.

A maior disponibilidade de reservatórios de gordura e o fato da vitamina D ser uma molécula lipossolúvel rapidamente convertida no tecido gorduroso, favorece o seu sequestro neste sítio induzindo o estado de deficiência/insuficiência. Além disso, indivíduos obesos procuram evitar a exposição solar (COMPSTON *et al.*, 1981) e produzem maiores quantidades de 1,25 (OH)D que promove uma alça de regulação negativa sobre a produção hepática de 25(OH)D (BELL *et al.*, 1985). Também é possível que os depósitos gordurosos nos obesos tenham maior capacidade de captação de vitamina D (LIEL *et al.*, 1988). Este conjunto de mecanismos atuando isoladamente ou em conjunto seria responsável pelo frequente estado de deficiência/insuficiência observado nos obesos.

Nossos resultados demonstraram que, mesmo após a suplementação com vitamina D e aumento significativo dos níveis séricos basais de 25(OH)D, eles permaneceram abaixo do limite inferior da faixa de normalidade. No contexto deste estudo não foi possível avaliar se a deficiência/insuficiência de vitamina D em obesos resulta de uma alteração primária no metabolismo da vitamina D ou se é uma consequência direta da obesidade.

A redução de mais de 50% da biodisponibilidade de vitamina D em obesos (WORTSMAN *et al.*, 2000) poderia explicar, pelo menos parcialmente, os resultados encontrados no nosso estudo que mostraram que independentemente da suplementação oral, os pacientes permaneceram com níveis abaixo da faixa de normalidade. Provavelmente, para promover a normalização dos níveis séricos de 25(OH)D em obesos, seria necessário a adoção de protocolos terapêuticos individualizados (SINGH e BONBAM, 2015).

Os bisfosfonatos possuem a mesma estrutura química básica, com duas moléculas de ácido fosfônico ligadas a uma molécula de carbono e se caracterizam pela alta afinidade com o fosfato de cálcio presente nos cristais de hidroxiapatita (HAMDY, 2010). Tanto o alendronado como o ácido zoledrônico atuam sobre o *turnover* ósseo reduzindo inicialmente a reabsorção através da redução do número de osteoclastos e, posteriormente reduzindo a formação óssea (RÄKEL *et al.*, 2011; NAYLOR e EASTELL, 2012). Nossos resultados mostraram que após 12 meses de tratamento com essa classe de medicamentos, os níveis séricos de CTX e FAO reduziram em 54% e 31% respectivamente, confirmando a redução do *turnover* ósseo. Esses resultados comprovam o efeito anti-reabsortivo do tratamento com os bisfosfonatos que, aparentemente foi independente do estado de obesidade, que se manteve inalterado durante o período de observação do estudo (IMC basal 33,3 kg/m² e final 32,6 kg/m², p=0,19).

Similarmente ao que foi observado com CTX e FAO, os níveis séricos de OPG também estão de acordo com a ação anti-reabsortiva dos bisfosfonatos. Conceitualmente existem três mecanismos que, provavelmente atuam em conjunto e potencialmente podem influenciar a produção de OPG pelos osteoblastos durante o tratamento com bisfosfonatos: (1) alteração da atividade osteoblástica em resposta à redução da atividade osteoclástica; (2) efeito direto específico dos bisfosfonatos sobre a produção de OPG; (3) alterações na diferenciação dos osteoblastos (DOBNIG *et al.*, 2006). Independente do(s) mecanismo(s) envolvido(s) com a regulação da produção de OPG, está bem estabelecido que os bisfosfonatos têm uma ação antireabsortiva direta sobre os osteoclastos, e que esta ação resulta na

regulação negativa da atividade osteoblástica através da redução da proliferação e da diferenciação dos osteoblastos (HUGHES *et al.*, 1995). Desta forma, outros mecanismos alternativos devem ser considerados para explicar o aumento dos níveis séricos de OPG durante o tratamento com bisfosfonatos.

No nosso estudo, no mesmo período em que observamos a redução do *turnover* ósseo, comprovado pela redução dos níveis séricos de CTX e FAO, observamos que os níveis séricos de OPG apresentaram uma elevação acima dos níveis basais pré-tratamento. Se considerarmos que os osteoblastos são a principal fonte de osteoprotegerina liberada na circulação, um contexto caracterizado pela redução numérica dessas células, não explicaria o aumento em 7,4% observado nos níveis séricos dos pacientes em resposta ao tratamento com bisfosfonatos. Uma possibilidade que poderia explicar essa elevação, seria o aumento absoluto do potencial de síntese individual de OPG pelos osteoblastos. Os resultados de estudos desenvolvidos por Viereck *et al.* (2002) e Pan *et al.* (2004) confirmaram o efeito estimulador direto de pamidronato e ácido zoledrônico sobre a expressão gênica e sobre a secreção de OPG por osteoblastos em sistemas *in vitro*. Outro mecanismo que poderia explicar o aumento na produção de OPG seria que os bisfosfonatos têm alvo preferencial os osteoblastos nos estágios finais de diferenciação que, por sua vez, têm maior potencial de síntese proteica em relação às células menos diferenciadas (GORI *et al.*, 2000).

Apesar da relação entre vitamina D e inflamação ainda não estar totalmente esclarecida em situações clínicas (CANNEL *et al.*, 2014), estudos *in vitro* (KORF *et al.*, 2012; FENG *et al.*, 2013; GUO *et al.*, 2013) e *in vivo* (ADZEMOVIC *et*

al., 2013; YILMAZ *et al.*, 2013; ERBAS *et al.*, 2014) já comprovaram a potente ação anti-inflamatória da 25(OH)D. Esta ação é mediada por mecanismos modulatórios da resposta imune (GUILLLOT *et al.*, 2010) e pela redução na produção de TNF- α , interferon- γ , das interleucinas pró inflamatórias IL-2, IL-12, IL-17, IL-21 e pelo aumento da produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (ARANOW, 2011).

Um dos objetivos do presente estudo foi avaliar se suplementação oral com 25(OH)D em obesos com hipovitaminose D estaria relacionada com alterações nas concentrações séricas de TNF- α . Da mesma forma, no presente estudo, a suplementação com vitamina D reduziu em 25% os níveis de TNF- α , apesar dos níveis finais não apresentarem correlação significativa com os níveis de vitamina D.

Embora a relação entre elevação da concentração sérica de 25(OH)D e redução das concentrações circulantes de TNF- α esteja bem estabelecida, o(s) mecanismo(s) responsáveis por esta associação ainda não foram totalmente esclarecidos. É possível que a produção local autócrina de 1,25(OH)₂D esteja vinculada a expressão de genes que regulam negativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias que, por sua vez, regulam positivamente a expressão de citocinas anti-inflamatórias (CANNEL *et al.*, 2014). Esta hipótese foi comprovada no estudo de Zhu *et al.* (2005) que mostraram que em amostras teciduais de cólon de camundongos com colite, a 1,25(OH)₂D regula negativamente a expressão de diversos genes associados ao TNF- α , inclusive proteínas envolvidas com a sua transcrição, com seus receptores e com a produção do próprio TNF- α . Apesar de não ter sido objeto de investigação do nosso estudo, acreditamos como outros autores (PETERSON e HEFFERNAN, 2008), que a redução dos níveis circulantes

de TNF- α em resposta a suplementação com 25(OH)D certamente tem algum significado clínico.

Diversos aspectos da interação entre o tecido adiposo e metabolismo ósseo já estão bem definidos. Os depósitos adiposos interferem sobre o *turnover* ósseo não apenas pela sua influência sobre o peso corporal mas, sobretudo, pelo seu papel no metabolismo e armazenamento da vitamina D (HOLICK, 2007). Além disso, a produção de adipocinas pelas células gordurosas, particularmente leptina e adiponectina, e sua interação com a vitamina D, conferem ao tecido adiposo um papel central na regulação do metabolismo ósseo (KONTOGIANNI *et al.*, 2004; MICHAELSSON *et al.*, 2008; SHI *et al.*, 2008; YADAV *et al.*, 2009; NAPOLI *et al.*, 2010).

Como a leptina é secretada pelo tecido adiposo, o volume de gordura corporal é o principal determinante dos seus níveis circulantes. Alguns estudos (MAETANI *et al.*, 2009; GRETHEN *et al.*, 2012) mostraram a relação inversa entre 25(OH)D e leptina em obesos. Esta relação é consistente com o estado de hipovitaminose e com maiores níveis circulantes de leptina em obesos. Devido à alta solubilidade da vitamina D, o seu sequestro nos depósitos adiposos promove o aumento da concentração local na gordura que resultaria, por sua vez, em um estímulo aumentado sobre os adipócitos e maior secreção de leptina. Desta forma, é razoável supor que além da relação inversa observada em obesos entre vitamina D e leptina existe o fato de que nos obesos as altas concentrações locais de vitamina D no tecido adiposo estimula a produção de leptina (KONG *et al.*, 2013).

Sistemicamente, a produção de leptina induzida pela obesidade leva a

diminuição proporcional na conversão de vitamina D em 25(OH)D e, posteriormente, na sua conversão em 1,25(OH)₂D, favorecendo a instalação do estado de hipovitaminose (MAETANI *et al.*, 2009). No cenário do nosso estudo, observamos que embora nossos resultados não tenham mostrado correlação entre os níveis de vitamina D e as adipocinas leptina e adiponectina, observamos que a elevação dos níveis séricos da vitamina D foi acompanhada de uma redução em 26% dos níveis de leptina e um aumento de 73% dos níveis de adiponectina. Embora não seja possível estabelecer uma relação causal entre esses achados, os relatos da literatura favorecem a hipótese de que as duas adipocinas são sensíveis à ação da vitamina D, caracterizada por uma relação direta entre vitamina D e adiponectina e inversa entre vitamina D e leptina (PEDONE *et al.*, 2013).

Uma hipótese, baseada em resultados de experimentos *in vitro* com tecido adiposo humano, sugere que a 25(OH)D atue como regulador negativo da secreção de leptina (MENENDEZ *et al.*, 2001). Outro possível mecanismo que relaciona a leptina com a vitamina D seria através de uma ação inibitória da leptina sobre a expressão das duas hidroxilases necessárias para a conversão da vitamina D na forma ativa 1,25(OH)₂D. A demonstração da redução da expressão do gene das duas hidroxilases sinaliza para a possibilidade de que a leptina favoreça a deficiência de vitamina D restringindo sua conversão para 1,25(OH)₂D (MATSUNUMA *et al.*, 2004; MATSUNUMA e HORIUCHI, 2007).

Apesar da falta de consenso, prevalece a hipótese de que a adiponectina tem uma associação direta com os níveis circulantes de vitamina D e com o grau de obesidade (LECHNIK *et al.*, 2003; GANAGE-YARED *et al.*, 2009; NIMITPHONG *et*

al., 2009; BIDULESCU *et al.*, 2014). Estudos *in vitro* mostraram que $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ regula a expressão de adipocinas na gordura visceral através da regulação da expressão do gene da adiponectina (LORENTE-CEBRIÁN *et al.*, 2012). A $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ também atuaria na regulação negativa do gene do TNF- α , que é uma molécula que interfere diretamente com a síntese de adiponectina (MALECKI, 2006). Nimitphong *et al.* (2009) mostraram que as concentrações de vitamina D se correlacionam positivamente com a adiponectina em indivíduos com resistência à insulina. Apesar dos resultados do nosso estudo estarem de acordo com esses relatos da literatura não foi possível estabelecer uma relação direta entre os níveis de adiponectina, vitamina D e TNF- α . Entretanto, esta possibilidade deve ser considerada. O estudo apresentou limitações importantes quanto ao número da amostra que pode ter contribuído para que a análise estatística dos dados não tenha sido significativa.

Não obstante, estudos clínicos adicionais serão necessários para tentar elucidar os mecanismos sistêmicos, as interações e os níveis circulantes ótimos de vitamina D e adipocinas em obesos e o seu papel na saúde humana. Particularmente se considerarmos que a obesidade e a hipovitaminose D se tornaram epidemias globais, acreditamos na importância em desenvolver estudos *in vitro* com células adiposas humanas, que poderão complementar os estudos clínicos, gerando novas informações sobre os mecanismos moleculares responsáveis pela ação regulatória da vitamina D sobre as adipocinas e TNF- α .

1. A suplementação com 1000 mg de cálcio e 800 UI de vitamina D, mais a suplementação em bolus durante 12 meses em idosos obesos com hipovitaminose D não foi eficiente para que todos os voluntários alcançassem a suficiência de vitamina D.
2. A redução dos níveis de TNF- α , após a suplementação e aumento dos níveis circulantes de 25(OH) $_2$ D, sugere que a vitamina D possui uma ação regulatória negativa desta adipocina.
3. O aumento de adiponectina e a redução da leptina após 12 meses de suplementação com vitamina D sugerem que essas adipocinas são sensíveis a ação da vitamina D.
4. A elevação dos níveis séricos de OPG em relação aos níveis basais está de acordo com a ação dos bisfosfonatos sobre o turnover ósseo.
5. O tratamento com os bisfosfonatos (ácido zoledrônico e alendronato de sódio) reduziu os níveis finais de CTX e FAO, comprovando o efeito sobre o *turnover* ósseo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRASSO (Associação Brasileira de Avaliação Óssea e Osteometabolismo). <http://abrasso.org.br/noticia/abrasso-alerta-sobre-riscos-da-osteoporose-doenca-que-atinge-10-milhoes-de-brasileiros> Acessado em 23/02/2016.
- ADZEMOVIC MZ, ZEITELHOFER M, HOCHMEISTER S, GUS- TAFSSON SA, JAGODIC M. Efficacy of vitamin D in treating multiple sclerosis-like neuroinflammation depends on developmental stage. *Exp Neurol* 2013; 249:39-48.
- AGGARWAL BB, GUPTA SC, SUNG B. Curcumin: an orally bioavailable blocker of TNF and other pro-inflammatory biomarker. *Br J Pharmacol* 2013;169(8):1672-92.
- ANDERSON H. Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheumatol Rep* 2003;5(3):222-6.
- ARANOW C. Vitamin D and the immune system. *J Investig Med* 2011; 59:881-6.
- BANDEIRA F, COSTA AG, FILHO MAS, PIMENTEL L, LIMA L, BILEZIKIAN JP. Bone markers and osteoporosis therapy. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2014;58(5):504-13.
- BENDIK I, FRIEDEL A, ROSS FF, WEBER P, EGGERSDORFER M. Vitamin D: a critical and essential micronutrient for human health. *Front in Physiol* 2014;11(5):248.
- BELL NH, EPSTEIN S, GREENE A, SHARY J, OEXMANN MJ, SHAW S. Evidence for alteration of the vitamin D-endocrine system in obese subjects. *J Clin Invest* 1985;76(1):370-3.
- BIDULESCU A, MORRIS AA, STOYANOVA N, MENG Y, VACCARINO V, QUYYUMI AA, GIBBONS GH. Association between vitamin D and adiponectin and its relationship with body mass index: the META-Health study. *Front Public Health* 2014; Oct 14;2:193.
- BJERRE M. Osteoprotegerin (OPG) as a biomarker for diabetic cardiovascular complications. *Springerplus* 2013;2:658.
- BOLLAND MJ, GREY AB, AMES RW, MASON BH, HORNE AM, GAMBLE GD, REID IR. The effects of seasonal variation of 25-hydroxyvitamin D and fat mass on a diagnosis of vitamin D sufficiency. *Am J Clin Nutr* 2007;86(4):959-64.
- BOUILLON R, SUDA T. Vitamin D: calcium and bone homeostasis during evolution. *Bonekey Rep* 2014;3:480.

- BUWAY N, SAROSI I, DUSTAN CR, MORONY S, TARPLEY J, CAPPARELLI C, SCULLI S, TAN HL, XU W, LACEY DL, BOYLE WJ, SIMONET WS. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998;12(9):1260-8.
- BUSSE B, BALE HA, ZIMMERMANN EA, PANGANIBAN B, BARTH HD, CARRIERO A, VETTORAZZI E, ZUSTIN J, HAHN M, AGER JW, PUSCHEL K, AMILING M, RICHIE RO. Vitamin D deficiency induces early signs of aging in human bone, increase the risk of fracture. *Sci Transl Med* 2013;5(193):193.
- CAO JJ. Effects of obesity on bone metabolism. *J Orthop Surg Res* 2011;15(6):30.
- CANNELL JJ, GRANT WB, HOLICK MF. Vitamin D and inflammation. *Dermatoendocrinol* 2014; 6:1.
- CARTER S, CARON A, RICHARD D, PICARD F. Role of leptin resistance in the development of obesity in older patients. *Clin Interv Aging* 2013;8:829-44.
- CARVALHO CM, FONSECA CC, PEDROSA JI. Educação para a saúde em osteoporose com idosos de um programa universitário: repercussões. *Cad Saúde Pub* 2004;20(3):719-26.
- CASTRO LCG. O sistema endocrinológico da vitamina D. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2011;55(8):566-75.
- CHIM SM, TICKNER J, CHOW ST, KUEK V, GUO B, ZHANG G, ROSEN V, EBER W, XU J. Angiogenic factors in bone local environment. *Cytokine Growth Factor Rev* 2013;24(3):297-310.
- COMBS TP, BERG AH, OBICI S, SCHERER PE, ROSSETTI L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 2001;108(12):1875-81.
- COMPSTON JE, VEDI S, LEDGER JE, WEBB A, GAZET JC, PILKINGTON TER. Vitamin D status and bone histomorphometry in gross obesity. *Am J Clin Nutr* 1981;34:2359-63.
- DE LUCA HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004;80(6 Suppl):1689S-96S.
- DELAISSE JM. The reversal phase of the bone-remodeling cycle: cellular prerequisites for coupling resorption and formation. *Bonekey Rep* 2014;3:561.
- DOBNIG H, HOFBAUER LC, VIERECK V, OBERMAYER-PIETSCH B, FAHRLEITNER-PAMMER A. Changes in the RANK ligand/osteoprotegerin system are correlated to changes in bone mineral density in bisphosphonate-treated osteoporotic patients. *Osteoporos Int* 2006; 17:693-703.

- DRAKE MT, MURAD MH, MAUCK KF, LANE MA, UNDAVALLI C, ELRAIYAH T, STUART LM, PRASAD C, SHAHROUR A, MULLAN JR, HAZEM A, ERWIN PJ, MONTORI V M. Risk factors for low bone-mass related fractures in men: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(6):1861-70.
- DUQUET N. Osteoporosis: risk factors and prevention. *J Pharm Belg* 2014;(2):4-12.
- ELEFTERIOU F, TAKEDA S, EBIHARA K, MAGRE J, PATANO N, KIM CA. Serum leptin level is a regulator of bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(9):3258-63.
- ERBAS, O, SOLMAZ V, AKSOY D, YAVASOGLU A, SAGCAN M, TASKIRAN D. Cholecalciferol (vitamin D 3) improves cognitive dysfunction and reduces inflammation in a rat fatty liver model of metabolic syndrome. *Life Sci* 2014; 103:68-72
- ERIKSEN EF. Cellular mechanisms of remodeling. *Rev Endocr Metab Disord* 2010;11(4):219-27.
- FAROOQI SI, O'RAHILLY S. 20 years of leptin: human disorders of leptin action. *J Endocrinol* 2014;223(1):T63-70.
- FENG X, MCDONALD JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol* 2011;6:121-45.
- FENG X, Lv C, WANG F, GAN K, ZHANG M, TAN W. Modulatory effect of 1,25-dihydroxyvitamin D 3 on IL-1 β -induced RANKL, OPG, TNF α , and IL-6 expression in human rheumatoid synovial cells MH7A. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013:160123.
- GALLAHER JC, TELLA SH. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014;142:155-70.
- GANNAGE-YARED MH, CHEDID R, KHALIFE S, AZZI E, ZOGHBI F, HALABY G. Vitamin D in relation to metabolic risk factors, insulin sensitivity and adiponectin in a young Middle-Eastern population. *Eur J Endocrinol* 2009; 160:965-71.
- GNACIŃSKA M, MALGORZEWICZ S, GUZEK M, LYSIAK-SZYDŁOWSKA W, SWORCZAK K. Adipose tissue activity in relation to overweight or obesity. *Endokrynol Pol* 2010;61(2):160-8.
- GONNELLI S, CAFFARELLI C. Obesity and fracture risk. *Clin Cases in Miner and Bone Metab* 2014;11(1):9-14.
- GORI F, HOFBAUER LC, DUNSTAN CR, SPELSBERG TC, KHOSLA S, RIGGS BL. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally

- regulated. *Endocrinology* 2000; 141:4768-4776.
- GRETHEN E, HILL KM, JONES R, CACUCCI BM, GUPTA CE, ACTON A, CONSIDINE RV, PEACOCK M. Serum leptin, parathyroid hormone, 1,25-dihydroxyvitamin D, fibroblast growth factor 23, bone alkaline phosphatase, and sclerostin relationships in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(5):1655-62.
- GUILLOT X, SEMERANO L, SAIDENBERG-KERMANACH N, FALGARONE G, BOISSIER M C. Vitamin D and inflammation. *Joint Bone Spine* 2010; 77:552-7.
- GUIMARÃES DED, SARDINHA FLC, MIURINI DM, CARMO MGT. Adipocinas: uma nova visão do tecido adiposo. *Rev Nutr* 2007;20(5):549-59.
- GUNDBERG CM, MARKOWITZ ME, MIZRUCHI M, ROSEN JF. Osteocalcin in human serum: a circadian rhythm. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;60(4):736-9.
- GUO J, Ma Z, Ma Q, Wu Z, FAN P, ZHOU X, CHEN L, ZHOU S, GOLTZMAN D, MIAO D, WU E. 1,25(OH)₂D₃ inhibits hepatocellular carcinoma development through reducing secretion of inflammatory cytokines from immunocytes. *Curr Med Chem* 2013; 20:4131-41.
- HAMDY RC. Zoledronic acid: clinical utility and patient considerations in osteoporosis and low bone mass. *Drug Des Dev Ther* 2010;4:321-35.
- HOLICK MF, BINKLEY NC, BISCHOFF-FERRARI HA, GORDON CM, HANLEY DA, HEANEY RP, MURAD MH, WEAVER CM, ENDOCRINE SOCIETY. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(7):1911-30.
- HOLICK MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357(3):266-81.
- HOSSEIN-NEZHAD A, HOLICK MF. Vitamin D for Health: a global perspective. *Mayo Clin Proc* 2013;88(7):720-55.
- HUGHES DE, WRIGHT K R, UY H L, SASAKI A, YONEDA T, ROODMAN G D, MUNDY G R, BOYCE BF. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 1995; 10:1478-1487.
- IKEDA K, TAKESHITA S. Factors and mechanisms involved in the coupling from bone resorption to formation: how osteoclasts talk to osteoblasts. *J Bone Metab* 2014;21(3):163-7.
- JOHANSSON H, ODEN A, KARLSSON MK, MC CLOSKEY E, KANIS JA, OHLSSON G. Waning predictive value of serum adiponectin for fracture risk in elderly men: MrOS Sweden. *Osteoporos Int* 2014;25(7):1831-6.
- KADOWAKI T, YAMAGUCHI T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrinol Rev* 2005;26(3):439-51.

- KAJIMURA D, LEE HW, RILEY KJ, ARTEAGA-SOLIS E, FERRON M, ZHOU B. Adiponectin regulates bone mass via opposite central and peripheral mechanisms through FoxO1. *Cell Metab* 2013;17(6):901-15.
- KAMYCHEVA E, BERG V, JORDE R. Insulin-like growth factor I, growth hormone, and insulin sensitivity: the effects of a one-year cholecalciferol supplementation in middle-aged overweight and obese subjects. *Endocrine* 2013;43(2):412-8.
- KAWAI M, PAULA FJA, ROSEN CJ. New insights into osteoporosis: the bone-fat connection. *J Intern Med* 2012; 272(4):317-29.
- KHAN M, JOSEPH F. Adipose Tissue and adipokines: the association with and application of adipokines in obesity. *Scientifica* 2014;2014:328592 .
- KIM YS, PAIK IY, RHIE YJ, SUH SH. Integrative physiology: defined novel metabolic roles of osteocalcin. *Korean Med Sci* 2010;25(7):985-91.
- KINI U, NANDEESH BN. Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. In: Fogelman I, Gnanasegaran G, Wall H (ed) Radionuclide and hybrid bone imaging. *Springer, Berlin*, 2012, pp. 29-57.
- KOHLI SS, KOHLI VS. Role of RANKL-RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications. *Indian J Endocrinol Metab* 2011;15(3):175-81.
- KONG J, CHEN Y, ZHU G, ZHAO Q, LI YC. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 upregulates leptin expression in mouse adipose tissue. *J Endocrinol* 2013;18,216:(2)265-71.
- KONTOGIANNI MD, DAFNI UG, ROUTSIAS JG, SKOPOULI FN. Blood leptin and adiponectin as possible mediators of the relation between fat mass and BMD in perimenopausal women. *J Bone Miner Res* 2004;19:546-551.
- KORF H, WENES M, STIJLEMANS B, TAKIISHI T, ROBERT S, MIANI M, EIZIRIK DL, GYSEMANS C, MATHIEU C. 1,25- Dihydroxyvitamin D3 curtails the inflammatory and T cell stimulatory capacity of macrophages through an IL-10-dependent mechanism. *Immunobiology* 2012; 217:1292-300.
- KOSLA, S. WESTENDORF, JJ, OURSLER, M.J. Building bone to reverse osteoporosis and repair fracture. *J.Clin. Invest.* V 2008;118(2):421-428.
- KULAR J, TICKNER J, CHIM SM, XU J. An overview of the regulation of bone remodeling at the cellular level. *Clin Biochem* 2012; 45:863-73.
- LECHNIK L, REGISTER TC, HSU FC, LOHMAN K, NICKLAS BJ, FREEDMAN BI, LANGEFELD CD, CARR JJ, BOWDEN DW. Adiponectin as a novel determinant of bone mineral density and visceral fat. *Bone* 2003; 33: 646-651.

- LEE P, GREENFIELD JR, SEIBEL MJ, EISMAN JA, CENTER JR. Adequacy of vitamin D replacement in severe deficiency is dependent on body mass index. *Am J Med* 2009;122(11):1056-1060.
- LEE SW, KIM M, KIM H, HAN SS, LEE H, LEE JP, KIM DK, LIM CS, KIM YS, PARK AK, JOO KW. Obesity modifies the association between serum 25-Hydroxyvitamin D and insulin resistance in Korean general population without increased fasting glucose levels. *Tohoku J Exp Med* 2014;234:89-97.
- LEGIRAN S, BRANDI ML. Bone mass regulation of leptin and postmenopausal osteoporosis with obesity. *Clin Cases in Miner Bone Metab* 2012;9(3):145-49.
- LEIBBRANDT A, PENNINGER JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann NY Acad Sci* 2008; 1143:123-50.
- LEWIECKI EM, BAIM S, BILEZIKIAN JP, EASTELL R, LEBOFF MS, MILLER PD. 2008 Santa Fe Bone Symposium: update on osteoporosis. *J Clin Densitom* 2009;12(2):135-57.
- LIEL Y, ULMER E, SHARY J, HOLLIS BW, BELL NH. Low circulating vitamin D in obesity. *Calcif Tissue Int* 1988; 43: 199-201.
- LIPS P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;92(1):4-8.
- LORENTE-CEBRIÁN S, ERIKSSON A, DUNLOP T, MEJHERT N, DAHLMAN I, ASTRÖM G, SJÖLIN E, WÅHLÉN K, CARLBERG C, LAURENCIKIENE J, HEDÉN P, ARNER P, RYDÉN M. Differential effects of 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol on MCP-1 and adiponectin production in human white adipocytes. *Eur J Nutr* 2012 Apr;51(3):335-42.
- MAETANI M, MASKARINEC G, FRANKE AA, COONEY RV. Association of leptin, 25 hydroxyvitamin D, and parathyroid hormone in woman. *Nutr Cancer* 2009;61(2):225-31.
- MALECKI TM. Obesity-insulin resistance type 2 diabetes mellitus. *Kardiol Pol* 2006 64:561-66.
- MARQUES CD, DANTAS AT, FRAGOSO TS, BRANCO AL, DUARTE PA. Importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. *Rev Bras Reum* 2010;50(1):67-80.
- MARTIN TJ. Historically significant events in the discovery of RANK/RANKL/OPG. *World J Orthop* 2013;4(4):186-97.
- MATSUNUMA A, HORIUCHI N. Leptin attenuates gene expression for renal 25-hydroxyvitamin D(3)-1 alpha-hydroxylase in mice via the long form of the leptin receptor. *Arch Biochem Biophys* 2007; 463:118-127.

- MATSUNUMA A, KAWANE T, MAEDA T, HAMADA S, HORIUCHI N. Leptin corrects increased gene expression of renal 25-hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase and-24-hydroxylase in leptin-deficient, ob/ob mice. *Endocrinology* 2004; 145:1367-1375.
- MCGREEVY C, WILLIAMS D. Safety of drugs used in the treatment of osteoporosis. *Ther Adv Drug Saf* 2011;2(4):159-72.
- MENENDEZ C, LAGE M, PEINO R, BALDELLI R, CONCHEIRO P, DIÉGUEZ C, CASANUEVA FF. Retinoic acid and vitamin D(3) powerfully inhibit in vitro leptin secretion by human adipose tissue. *J Endocrinol* 2001; 170:425-431.
- MICHAELSSON K, LIND L, FRYSTYK J, FLYVBJERG A, GEDEBORG R, BERNE C, ZETHELIUS B, MALLMIM H, SODERBERG S, MELHUS H. Serum adiponectin in elderly men does not correlate with fracture risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:4041-4047.
- MITHAL A, WAHL DA, BONJOUR JP, BURCKHARDT P, DAWSON-HUGHES B, EISMAN JA, EL-HAJJ FULEIHAN G, JOSSE RG, LIPS P, MORALES-TORRES J. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporos Int* 2009;20(11):1807-20.
- MOTYL KJ, ROSEN CJ. Understanding leptin-dependent regulation of skeletal homeostasis. *Biochimie* 2012;94(10):2089-96.
- MUÑOZ-TORRES M, REYES-GARCIA R, MEZQUITA-RAYA P, FERNANDEZ-GARCIA D, ALONSO G, LUNA JD, RUIZ-REQUENA ME, ESCOBAR-JIMENEZ F. Serum cathepsin K as a marker of bone metabolism in postmenopausal women treated with alendronate. *Maturitas* 2009;64(3):188-92.
- MUNZBERG H, MORRISON CD. Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism*. 2015;64(1):13-23.
- NAKAMURA K, FUSTER JJ, WALSH K. Adipokines: a link between obesity and cardiovascular disease. *J Cardiol* 2014;63(4):250-59.
- NAPOLI N, PEDONE C, POZZILLI P, LAURETANI F, FERRUCCI L, INCALZI RA. Adiponectin and bone mass density: The InCHIANTI study. *Bone* 2010;47:1001-1005.
- NAYLOR K, EASTELL R. Bone turnover markers: use in osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:379-89.
- NICKLAS BJ, YOU T, PAHOR M. Behavioural treatments for chronic system inflammation: effects of dietary weight loss and exercise training. *CMAJ* 2005;172(9):1199-1209.
- NIELSEN HK, LAURBERG P, BRIKEN K, MOSEKILDE L. Relations between diurnal variations in serum osteocalcin, cortisol, parathyroid hormone, and

- ionized calcium in normal individuals. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1991;124(4):391-8.
- NIGRO E, SCUDIERO O, MONACO ML, PAMIERI A, MAZZARELLA G, COSTAGLIOLA C, BIANCO AL, DANIELA A. New insight into adiponectin role in obesity and obesity-related diseases. *BioMed Res Int* 2014;658913.
- NIMITPHONG H, CHANPRASERTYOTHIN S, JONGJAROENPRASERT W, ONGPHIPHAD- HANAKUL B. The association between vitamin D status and circulating adiponectin independent of adiposity in subjects with abnormal glucose tolerance. *Endocrine* (2009) 36:205-10.
- PAGANI F, FRANUCCI CM, MORO L. Bone Markers: biochemical and clinical perspectives. *J Endocrinol Invest.* 2005(28)8:13.
- PAN B, FARRUGIA AN, BIK To LB, FINDLAY DM, GREEN J, LYNCH K, ZANNETTINO AC. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF- α converting enzyme (TACE). *J Bone Miner Res* 2004;19:147-154.
- PEDONE C, NAPOLI N, POZZILLI P, LAURETANI F, BANDINELLI S, FERRUCCI L, ROSSI FF, ANTONELLI-INCALZI R. Bone health as a function of adipokines and vitamin d pattern in elderly patients. *Rejuvenation Res* 2013 ;16(6):467-74.
- PETERSON CA, HEFFERNAN ME. Serum tumor necrosis factor-alpha concentrations are negatively correlated with serum 25(OH)D concentrations in healthy women. *J Inflamm* 2008, 5:10.
- PINHEIRO MM, EIS SR. Epidemiology of osteoporotic fractures in Brazil: what we have and what we need. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2010; 54(2):164-70.
- RAGGATT LJ, PARTRIDGE NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem* 2010;285(33):25103-8.
- RAISZ L. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J Clin Invest* 2005;115(12):3318-25.
- RAJAKUMAR K, FERNSTROM JD, HOLICK MF, JANOSKY JE , GREENSPAN SL. Vitamin D status and response to vitamin D in obese vs. non-obese African American children. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16(1):90-5.
- RÄKEL A, BOUCHER A, STE-MARIE LG. Role of zoledronic acid in the prevention and treatment of osteoporosis. *Clin Interv Aging* 2011;6:89-99.
- REID IR, AMES R, EVANS MC, SHARPE S, GAMBLE G, FRANCE JT, LIM TM, CUNDY TF. Determinants of total body and regional bone mineral density in normal postmenopausal women - a Key role fat mass. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;75(1):45-51.

- REPETTO G, RIZZOLLI J, BONATTO C. Prevalencia, riscos e soluções na obesidade e sobrepeso: Here, there and everywhere. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2003;47(6):633-5.
- RIBEIRO SML, ZIRLEIDE AS, SILVA J, LOUZADA E, JUNIOR JD, TIRAPEGUI J. Aspectos sobre o balanço energético, exercício físico e amenorreia do esforço. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007;51(1):11-24.
- RISTELI J, RISTELI L. Products of bone collagen metabolism. In: Seibel MJ, Robbins SP, Bilezikian JP (ed) Dynamics of bone and cartilage metabolism: principles and clinical applications. *Academic Press, London*, 1999, 275-287.
- ROMERO CEM, ZANESCO A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. *Rev Nutr* 2006;19(1):85-9.
- SAIDENBERG-KERMANAC N, CONRADO A, LEMEITER D, DE VERNEJOUL MC, BOISSIER MC, COHEN-SOLAL ME. TNF-alpha antibodies and osteoprotegerin decrease systemic bone loss associated with inflammation through distinct mechanisms in collagen-induced arthritis. *Bone* 2004;35(5):1200-7.
- SALIBA W, BARNETT-GRINESS O, RENNERT G. The relationship between obesity and the increase in serum 25(OH)D levels in response to vitamin D supplementation. *Osteoporos Int* 2013;24(4):1447-54.
- SANTOS HLBS, FILHO NAR. Relação entre vitamina D e doenças alérgicas. *Rev Bras Alerg Immunopatol* 2012;35(1):15-24.
- SEEMAN E. Invited Review: Pathogenesis of osteoporosis. *J Appl Physiol* 2003;95(5): 2142-51.
- SHARMA S, TANDON VR, MAHAJAN S, MAHAJAN V, MAHAJAN A. Obesity: friend or foe for osteoporosis. *J Midlife Health* 2014;5(1):6-9.
- SHI Y, YADAV VK, SUDA N, LIU XS, GUO XE, MYERS MG Jr, KARSENTY G. Dissociation of the neuronal regulation of bone mass and energy metabolism by leptin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:20529-20533.
- SIMONET WS, LACEY DL, DUNSTAN CR, KELLY M, CHANG MS, LUTHY R, NGUYEN HQ, WOODEN S, BENNETT L, BOONE T, SHIMAMOTO G, DEROSE M, ELLIOT R, COLOMBERO A, TAN, HL, TRAIL G, SULLIVAN J, DAVY E, BUCAY N, RENSHAW-GEGG L, HUGHES TM, HILL D, PATTISON W, CAMPBELL P, SANDER S, VAN G, TARPLEY J, DERBY P, LEE R, BOYLE WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89:309-19.

- SING G, BONHAM AJ. A predictive equation to guide vitamin D replacement dose in patients. *Angiology* 2015;66(7):613-8.
- SONG Q, SERGEEV IN. Calcium and vitamin D in obesity. *Nutr Res Rev* 2012;25(1):130-41.
- SOUSA MPG. Diagnóstico e tratamento da osteoporose. *Rev Bras Ortop* 2010;45(3):220-9.
- STANDRING S. Gray's Anatomy: the anatomical basis of clinical practice: Functional anatomy of the musculoskeletal system. *Elsevier* 2015; p.1584.
- STOKIĆ E, KUPUSINAC A, TOMIC-NAGLIC D, SMILJENIC D, KOVACEV-ZAVISIC B, SRDIC-GALIC B, SOSKIC S, ISENOVIC ER. Vitamin D dysfunctional dipose tissue in obesity. *Angiology* 2015;66(7):613-8.
- TAKEDA,S. Central control of bone remodelling. *Journal of Neuroendocrinology*,2008; 20(6) 802 807.
- TETI A. Bone Development: overview of bone cells and signaling. *Curr Osteoporos Rep* 2011;92:64 73.
- THEOLEYRE S, WITTRANT Y, TAT SK, FORTUN Y, REDINI F, HEYMAN D. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15(6):457-75.
- THOMAS T, GORI F, KHOSLA S, JENSEN MD, BURGUERA B, RIGGS BL. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinol* 1999;140(4):1630-38.
- TROVIN AP, GOEB V. Receptor activator of nuclear factor-kB ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clin Interv Aging* 2010; 19(5):345-54.
- VANLINT S. Vitamin D and obesity. *Nutrients* 2013;5(3):949-56.
- VIERECK V, EMONS G, LAUCK V, FROSCH KH, BLASCHKE S, GRÜNDKER C, HOFBAUER LC. Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:680 686.
- VIMESWARAN K, BERRY D, LU C, PILZ S, HIRAKI L, COOPER J, DASTANI Z, LI R, HOUSTON D, WOOD AR, MICHAËLSSON K, VANDENPUT L, ZGAGA L,YERGES-ARMSTRONG LM, MCCARTHY MI, DUPUIS

- J, KAAKINEN M, KLEBER ME, JAMESON K, ARDEN N, RAITAKARI O, VIIKARI J, LOHMAN KK, FERRUCCI L, MELHUS H, INGELSSON E, BYBERG L, LIND L, LORENTZON M, SALOMAA V, CAMPBELL H, DUNLOP M, MITCHELL BD, HERZIG KH, POUTA A, HARTIKAINEN AL, GENETIC INVESTIGATION OF ANTHROPOMETRIC TRAITS-GIANT CONSORTIUM, STREETEN EA, THEODORATOU E, JULA A, WAREHAM NJ, OHLSSON C, FRAYLING TM, KRITCHEVSKY SB, SPECTOR TD, RICHARDS JB, LEHTIMÄKI T, OUWEHAND WH, KRAFT P, COOPER C, MÄRZ W, POWER C, LOOS RJ, WANG TJ, JÄRVELIN MR, WHITTAKER JC, HINGORANI AD, HYPÖNEN E. Causal relationship between obesity and vitamin D status: Bi-directional mendelian randomization analysis of multiple cohorts. *Plos Med* 2013;10(2):1549-1676.
- WALSH MC, CHOI Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG system in immunity, bone, and beyond. *Front Immunol* 2014;5:511.
- WAMBERG L, PEDERSEN S B, RICHELSEN B, REJNMARK, L. The Effect of high-dose Vitamin D supplementation on calciotropic hormones and bone mineral density in obese subjects with low levels of circulating 25-hydroxyvitamin D: results from a randomized controlled study. *Calcif Tissue Int* 2013;93(1):69-77.
- WANG F, WANG PX, WU XL, DANG SY, CHEN Y, NI YY. Deficiency of adiponectin protects against ovariectomy-induced osteoporosis in mice. *Plos One* 2013; 8(7):e68497.
- WILLIAMS GA, WANG Y, CALLON KE, WATSON M, LIN JM, LAM JB. *In vitro* and *in vivo* effects of adiponectin on bone. *Endocrinol* 2009;150(8):3603-10.
- WORTSMAN J, MATSUOKA LY, CHEN TC, LU Z, HOLICK MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 2000; 72(3):690-93.
- WU Y, TU Q, VALVERDE P, ZHANG J, MURRAY D, DONG LQ. Central adiponectin administration reveals new regulatory mechanisms of bone metabolism in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014;306(12):E1418-30.
- XU A, VANHOUTTE PM. Adiponectin and adipocyte fatty acid binding protein in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012;302(6):H1231-40.
- XU H, BARNES GT, YANG Q, TAN G, YANG D, CHOU CJ, SOLE J, NICHOLS A, ROSS JS, TARTAGLIA LA, CHEN H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003;112(12):1821-30.

- YADAV VK, OURY F, SUDA N, LIU Z, GAO X, CONFAVREUX C, KLEMENHAGEN KC, TANAKA KF, GINGRICH JA, GUO XE, TECOTT LH, ANN JJ, HEN R, HORVATH TL, KARSENTY G. A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell* 2009;138:976-989.
- YAZBEK MA, NETO JFM. Osteoporose e outras doenças osteometabólicas no idoso. *Einstein* 2008;6(Supl1):S74-8.
- YILMAZ SS, HIZLI D, YILMAZ E, ERYILMAZ OG, HIZLI F, HALTAS H. Effect of vitamin D on postoperative adhesion formation in a rat uterine horn adhesion model. *J Reprod Med* 2013; 58:511-6.
- ZHU Y, MAHON BD, FROICU M, CANTORNA MT: Calcium and 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 target the TNF-alpha pathway to suppress experimental inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol* 2005, 35:217-224.
- ZICCARDI P, NAPPO F, GIUGLIANO G, ESPOSITO K, MARFELLA R, CIOFFI M, D'ANDREA F, MOLINARI A M, GIUGLIANO D. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in the obese woman after weight loss over one year. *Circulation* 2002;105(7):804-9.
- ZUPAN J, JERAS M, MARC J. Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. *Biochem Med* 2013;23(1):43-63.

Certificamos que o projeto intitulado "**Comparação entre a eficácia de drogas antiosteoporóticas em pacientes com osteoporose grave**", protocolo nº **0005.0.305.000-09**, a ser desenvolvido no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia - INTO, tendo a Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro como Instituição vinculada e como pesquisador principal **Verônica Fernandes Vianna**, está de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o qual foi APROVADO em 18/02/2009 na reunião do Comitê de Ética em Pesquisa do INTO.

O Pesquisador está autorizado a dar início à pesquisa em pauta, devendo atender às seguintes exigências:

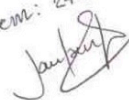
- Encaminhar a este CEP, **relatório descritivo de seu andamento ao final de cada semestre;**
- **Ao término da pesquisa, apresentar cópia do trabalho concluído, conforme metodologia exigida pela Instituição, impressa e em mídia.**

Rio de Janeiro, 19 de fevereiro de 2009.



Dr. Sérgio Eduardo Vianna.

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do INTO

Recbi em: 24.02.2011


ANEXO II Termo de consentimento livre e esclarecido



ESTUDO DE COMPARAÇÃO ENTRE A EFICÁCIA DE DROGAS ANTI-OSTEOPORÓTICAS EM PACIENTES COM OSTEOPOROSE GRAVE

CENTRO DE PESQUISA CLÍNICA DO INTO – CPeClin
Av. Brasil, 500, São Cristóvão, RJ.
Tels: 2134-5971 ou 2134-5055

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO ESTUDO "Comparação entre a eficácia de drogas anti-osteoporóticas em pacientes com osteoporose grave".

EXECUTORES Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia do Rio de Janeiro (INTO/MS) e Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

PESQUISADORES Dr^{as}. Veronica Vianna e Maria Eugenia Leite Duarte – Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia do Rio de Janeiro (INTO/MS) e Dra. Maria Lucia Fleiuss de Farias – Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Você está sendo convidado para participar desta pesquisa, realizada pelo Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia do Rio de Janeiro (INTO/MS) e pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) porque você tem diagnóstico de osteoporose e fratura. A osteoporose é uma doença causada pela diminuição da quantidade de osso no esqueleto, que pode levar a um maior risco de fratura, dores constantes na coluna e, em alguns casos, a necessidade de realizar uma cirurgia. O risco de fratura aumenta com a idade, em quem já teve ou tem uma fratura, com a ausência de tratamento e com o maior risco de queda. O paciente que tem osteoporose e já apresenta uma fratura, tem um risco maior de ter outra fratura.

O objetivo deste estudo será comparar o resultado do tratamento da osteoporose com os seguintes remédios (**alendronato** de uso semanal por via oral; **ranelato de estrôncio** uso diário por via oral; **ácido zoledrônico** uso anual por via venosa e **teriparatida** uso diário por via subcutânea). Todos os remédios são para evitar que você piores da osteoporose e também para reduzir a chance de você quebrar outro osso.

Espera-se que aproximadamente 400 pacientes participem deste estudo. Sua participação será de aproximadamente 14-15 meses e incluirá 7 consultas no INTO e 3 consultas no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (FUNDÃO).

Para o tratamento será feita suplementação de cálcio e vitamina D e uma das quatro medicações que serão avaliadas nesta pesquisa. Todos os remédios que serão utilizados já são usados para tratar osteoporose no Brasil e no mundo. Mas, nenhum estudo comparou o efeito destes remédios em uma mesma população. Nem você, nem o médico poderão escolher o remédio que você vai utilizar porque ele será definido por sorteio. Você não precisa participar deste estudo para receber tratamento para sua doença. Existem medicações e tratamentos disponíveis para osteoporose que poderão ser recomendados para você.

Fazendo parte desta pesquisa você será avaliado em consultas programadas aqui no INTO e na UFRJ. A primeira consulta será realizada hoje, aqui no Centro de Pesquisa Clínica do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia do Rio de Janeiro, se você concordar em participar. Você será questionado a respeito de remédios que costuma consumir, se você e os seus familiares mais próximos tem outras doenças que possam interferir na resposta ao tratamento e o nível de dificuldade que você tem para fazer suas tarefas diárias. A seguir você terá seu peso e altura verificados e caso continue preenchendo os critérios do estudo, você também fará uma radiografia simples da coluna torácica e da coluna lombar, para avaliar se há alguma fratura, pois um grande número de fraturas na coluna podem não produzir sintomas. E se for constatada a presença de fratura (as), você será chamado para fazer um exame de sangue, em outra visita ao INTO,

ANEXO II Termo de consentimento livre e esclarecido

para avaliar sua saúde e se você tem alguma doença que seja a causa da osteoporose. A coleta de sangue pode causar algum desconforto local e em alguns casos, pode causar um hematoma local (pequena mancha roxa). Após um lanche fornecido pelo INTO você poderá fazer ou não uma avaliação da força das suas pernas, que é um teste que consiste em empurrar com os pés uma plataforma. Este teste é realizado com você na posição deitada e não oferece nenhum risco para sua saúde e nem irá alterar a intensidade da osteoporose. Depois da avaliação dos resultados dos exames de sangue e caso permaneça dentro dos critérios do estudo, você será contatado por telefone para o agendamento de dois exames no Hospital do Fundão.

No Hospital do Fundão, na unidade de endocrinologia, você realizará os exames de Densitometria e Microtomografia. Nenhum dos dois exames causa dor ou desconforto, e tem como objetivo medir a quantidade e a qualidade do osso que você tem no seu esqueleto. A densitometria exigirá que você fique deitado por alguns minutos e para a microtomografia você ficará sentado. Cada um dos exames emite uma quantidade mínima de radiação que não causará risco para sua saúde.

Uma semana depois, em horário e dia marcados, você retornará ao Centro de Pesquisa Clínica do INTO, quando haverá um sorteio para definir o remédio que você tomará, além do cálcio e da vitamina D. A medicação será fornecida gratuitamente para três meses de tratamento e você receberá todas as informações relativas ao uso do medicamento (como deve ser tomado, como deve ser guardado e possíveis efeitos colaterais). Todo remédio pode produzir efeitos não desejáveis e, caso você sinta qualquer coisa, poderá ser visto por um dos médicos do INTO ligado à pesquisa. Ao final da consulta você deverá assinar um documento dando ciência do seu conhecimento sobre a possibilidade de ocorrer esses efeitos colaterais.

A cada três meses do início do tratamento você terá uma consulta no Centro de Pesquisa Clínica do INTO quando você será questionado sobre o aparecimento de efeitos desagradáveis que possam estar relacionados diretamente com o remédio. É importante que, se sentir que seus sintomas pioraram, você fale com o médico durante a consulta, para que ele avalie se você deve permanecer ou não no estudo. Se estes efeitos puderem ser tratados ou tolerados e não impliquem em nenhum risco para a sua saúde, você receberá a medicação para mais três meses de tratamento. Para isso será necessário devolver as embalagens vazias ou com o(s) remédio(s) que, por algum motivo, você não ingeriu. Isto é muito importante para que o médico possa avaliar no final do estudo a sua resposta ao tratamento.

Na consulta de seis meses após o início do tratamento você fará um exame de sangue igual ao que foi feito no início do tratamento, para controle do uso do remédio e será encaminhado com dia e hora para realizar a segunda microtomografia no Hospital do Fundão.

Doze meses após iniciar tratamento a consulta será realizada no Centro de Pesquisa Clínica do INTO você colherá outra amostra de sangue e será questionado sobre a presença de efeitos desagradáveis que você acha que estão relacionados diretamente com o remédio. Você deverá devolver a caixa ou frascos vazios com o(s) remédio(s) que, por algum motivo, você não tomou. Ainda nesta consulta você responderá novamente ao mesmo questionário que foi feito no início do tratamento e repetirá o teste de força igual ao que foi feito no início do tratamento e realizará duas radiografias simples de coluna. Ao final da consulta você será encaminhado com dia e hora marcada para realizar a terceira microtomografia no Hospital do Fundão e, após a realização deste exame, você será informado sobre os efeitos do remédio e receberá orientação quanto ao seu tratamento.

A recusa ou interrupção do tratamento, em qualquer momento, não prejudicará de forma alguma o seu direito de, agora ou no futuro, ser tratado nas instituições envolvidas no estudo. No decorrer do estudo você será informado se ocorreram novas descobertas, positivas ou negativas, para o tratamento da sua doença. Se necessário seu médico irá reavaliar sua situação, e discutir com você estas novas possibilidades. Consultas adicionais com seu médico ou exames laboratoriais podem ser necessários.

Uma pequena parte (alíquota) de sangue (soro) coletada será armazenada por um período de 5 anos após a coleta, podendo ser utilizada neste protocolo de pesquisa (OSTEOPREV) ou em outra futura pesquisa do INTO, de acordo com a legislação brasileira.

ANEXO II Termo de consentimento livre e esclarecido

Apenas os pesquisadores terão acesso aos dados confidenciais que identifiquem você pelo nome. Você não será identificado em nenhum relatório ou publicação resultante deste estudo.

Você não pagará nenhuma quantia pelos exames, remédios e consultas. Você apenas receberá vale-transporte para os deslocamentos nos dias de consultas no INTO e na UFRJ. A assistência médica não relacionada com o estudo, como por exemplo qualquer outro exame que não esteja identificado neste protocolo, será de sua responsabilidade.

Os pedidos de indenização decorrentes de eventuais resultados desfavoráveis do tratamento proposto nesta pesquisa serão tratados na forma estabelecida pela legislação vigente.

Lembre-se que a participação neste protocolo é voluntária. Você poderá recusar-se a participar ou descontinuar a sua participação a qualquer momento, sem penalidades ou perda de benefícios que você tenha direito.

Declaro que li e entendi esta carta e que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e concordo voluntariamente em participar deste protocolo.

CONTATO EM CASO DE DÚVIDAS / EMERGÊNCIA – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A pesquisadora principal é a Dra. Maria Eugenia Leite Duarte que poderá ser encontrada no endereço: Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia do Rio de Janeiro (INTO/MS) – Av. Brasil, nº 500 – São Cristóvão, CEP: 20940-070, Rio de Janeiro, RJ. Telefones: 2134-5179 / 2134-5055 / 8027-6743.

Se você tiver alguma pergunta ou dúvida sobre a pesquisa, entre em contato com o CEP – Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia do Rio de Janeiro (INTO-RJ).

Se você precisar de atendimento de urgência ou for internado por qualquer motivo em outro hospital, **ENTRE EM CONTATO COM O INTO**. Avise ao responsável pelo seu atendimento de urgência que você faz parte de um estudo de pesquisa para tratamento de Osteoporose, realizado no Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia do Rio de Janeiro (INTO-MS) e pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Declaro ter recebido uma cópia deste termo de consentimento.

Rio de Janeiro, de de 201

Assinatura do Paciente ou representante legal

Assinatura do responsável pela aplicação do termo de consentimento

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE E RESPONSÁVEL LEGAL (se aplicável)

(em letra de forma)

Paciente				
Idade	Identidade	Órgão Expedidor	Data de Emissão	Sexo

Responsável				
Idade	Identidade	Órgão Expedidor	Data de Emissão	Sexo
Endereço (Rua, Av, bairro, etc.)			Cidade	Telefone

OSTEOPREV outubro / 2011 – Versão 2

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INTO

Página 3

Documento ref. ao protocolo - CAAE: 00059/2005-000-09
aprovado na reunião em 19/10/2011

Visto, 19/10/2011, Folha 03/03