

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

ADRIANA LELIS CARVALHO

Relação entre os Tecidos Ósseo e Adiposo no Diabetes Melito do tipo 1.

Aluna: Adriana Lelis Carvalho

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Albuquerque de Paula

Ribeirão Preto

2017

ADRIANA LELIS CARVALHO

Relação entre os Tecidos Ósseo e Adiposo no Diabetes Melito do tipo 1.

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

Área de Concentração: Investigação Biomédica

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Albuquerque
de Paula

Ribeirão Preto

2017

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Carvalho, Adriana Lelis

Relação entre os Tecidos Ósseo e Adiposo no Diabetes Melito do tipo 1./ Adriana Lelis Carvalho; orientador Francisco José Albuquerque de Paula – Ribeirão Preto, 2017.
156f.: il.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (USP)

Área de Concentração: Investigação Biomédica

Orientador: De Paula, Francisco José Albuquerque

1. Diabete Melito do tipo 1.
2. Densidade mineral óssea.
3. Tecido adiposo da medula óssea.
4. Tecido adiposo visceral.
5. Tecido adiposo subcutâneo.

CARVALHO, Adriana Lelis

Relação entre os Tecidos Ósseo e Adiposo no Diabetes Melito do tipo 1.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora em
Ciências Médicas.
Área de Concentração: Investigação Biomédica.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese de doutorado a todos os voluntários
que gentilmente concordaram em participar deste projeto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, ao Prof. Dr. Francisco José Albuquerque de Paula por ter me recebido em seu grupo de pesquisa e aceito realizar minha orientação ao longo deste período. Agradeço pela disponibilidade a ensinar e pela confiança na execução deste projeto.

Agradeço aos colaboradores deste projeto: Prof. Dr. Marcello Henrique Nogueira Barbosa, Prof. Dr. Carlos Ernesto Garrido Salmon, Prof. Dr. Jorge Elias Junior, Prof. Dra. Belinda Pinto Simões e Dra. Maria Carolina Rodrigues de Oliveira, pelas contribuições durante o desenvolvimento do projeto.

Agradeço ao Dr. Carlos Eduardo Barra Couri e a Dra. Maria Carolina Rodrigues de Oliveira pela ajuda no recrutamento do grupo de diabéticos tipo 1 na Unidade de Transplante de Medula Óssea (UTMO) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP). Também, agradeço à Prof. Dra. Maria Cristina Foss por ter aberto espaço no ambulatório de Diabetes do HCFMRP-USP para o recrutamento dos voluntários com o diagnóstico de diabetes melito tipo 1.

Aos voluntários do trabalho, minha gratidão.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado (nº 2013/09853-6), da bolsa estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) (nº 2014/14505-0) e do auxílio financeiro para a realização desta pesquisa (nº 2014/15864-3).

Aos técnicos dos Laboratórios da Endocrinologia e Metabologia pela imensa ajuda durante esta jornada. À Marta Tocico Nakao Inouye Maibashi, agradeço o apoio e a ajuda nas atividades laboratoriais, sou grata a todos os ensinamentos adquiridos durante todos estes anos de convívio. À Milena Saavedra Lopes do Amaral, Maria Yoshiko Matuyama e Sebastião Lázaro agradeço a ajuda essencial durante a coleta dos dados.

Às técnicas da densitometria óssea, Rita e Rosário, essenciais para realização deste trabalho e todos os técnicos da ressonância magnética e também do Centro de Imagens.

Aos meus colegas de laboratório, Iana Mizumukai, Luciana Parreiras, Sérgio Luchini, Emiliana Ribeiro, Maria Augusta Viana, Maira Lupatelli, e Jéssica Bonella agradeço por toda a convivência durante este tempo, pela ajuda e troca de experiência, pela amizade. Agradeço especialmente, à Iana, ao Sérgio e à Luciana, que sempre muito solícitos e amáveis, me ajudaram imensamente durante este período. Agradeço também, à aluna de iniciação científica Bianca Massaro por sua contribuição durante a coleta de dados. E ao Adriano Levi Spirlandeli por me deixar acompanhá-lo para apreender sobre o desenvolvimento de estudo experimental com animais.

Agradeço à Prof. Dra. Sandra Fukada, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP Ribeirão Preto, por ter disponibilizado seu laboratório para o aprendizado de novas técnicas laboratoriais.

Agradeço ao Dr. Clifford J. Rosen, por ter me recebido e disponibilizado seu laboratório no Maine Medical Center Research Institute (MMCRI) para o desenvolvimento do projeto experimental anexado ao fim deste manuscrito. Agradeço a todo o grupo do seu laboratório: Katie Motyl, Phuong Le, Victoria DeMambro, Anyonya Guntur, David Maridas, Sheila Bornstein, Katie Bishop e Carolina Figueroa pelas contribuições e pelo convívio harmonioso durante os 10 meses de estágio. Também deixo registrado meu agradecimento a todos do MMCRI, em especial Shivangi, Deepthi, Patrizia, Amanda, Leo e Ricky, que também contribuíram para esta fosse uma ótima experiência.

Agradeço imensamente aos meus pais, Fernando e Maria Helena, e ao meu irmão Octávio, pelo incentivo e amor. Agradeço, ao meu namorado Francisco, pela paciência e carinho. Aos amigos todos, aqueles que estão por perto e que também compartilham a vivência na pós-graduação, Vivianne, Juliana, Erika, Sofia, Rebeca, e todos aqueles que estão longe, Mariana e Fernanda, sou grata pelo apoio e palavras de incentivo.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“O importante e bonito do mundo é isso: que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas, mas que elas vão sempre mudando. Afinam e desafinam.”

João Guimarães Rosa

RESUMO

CARVALHO, A. L. **Relação entre os Tecidos Ósseo e Adiposo no Diabetes Melito do tipo 1**. 2017. 156 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O tecido adiposo é tipicamente um tecido versátil e heterogêneo tanto do ponto de vista estrutural quanto funcional, o seu papel fisiológico pode variar de acordo com a quantidade de lipídios armazenados e sua localização. O aumento do tecido adiposo da medula óssea (TAMO) ocorre em condições catabólicas associadas com a perda de massa óssea, tais como a anorexia nervosa e a terapia com glicocorticoide. Diferentemente, a obesidade está relacionada com massa óssea preservada ou aumentada, mas aparentemente não influencia o TAMO. O objetivo do trabalho foi avaliar a relação entre o tecido adiposo da região abdominal, o teor de lipídio intra-hepático (LIH) e do TAMO com a densidade mineral óssea (DMO) e a ocorrência de fratura no Diabetes Melito do tipo 1 (DM1) em insulinoterapia convencional ou submetido ao transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH). O estudo é composto de três grupos pareados por idade, gênero, estatura e peso: Controle (13H/11M; 29±6 anos; 67,4±14, Kg; 1,68±0,08 m; 23,8±3,7 Kg/m²), DM1 (13H/10M; 32±13 anos; 72,3±10,6 Kg; 1,69±0,08 m; 25,3±3,4 Kg/m², 17±11 anos de duração do diabetes) e DM1-TCTH (5H/4M; 25±6 anos; 66,9±11 Kg; 1,72±0,11 m; 22,5±2,2 Kg/m²; 6 meses a 10 anos após TCTH). Foram realizadas dosagens bioquímicas, hormonais e dos marcadores ósseos e adipocinas. A DMO foi avaliada pela densitometria óssea em diversos sítios. O TAMO da vertebra L3 [gordura/ (gordura+água) %] foi avaliada por meio do método de espectroscopia (¹H) pela ressonância magnética. O tecido adiposo subcutâneo (TAS), o tecido adiposo visceral (TAV) e o LIH foram avaliados também por ressonância magnética. O controle glicêmico foi pior no grupo DM1 (HbA1c: Controle=5,3±0,3%; DM1=9,6±2,2%; DM1-TCTH=6,4±0,5%; p<0,0001) mesmo com uso de maior quantidade de insulina exógena (DM1: 0,80±0,2 UI/Kg de peso; DM1-TCTH: 0,27±0,3 UI/Kg de peso; p<0,0001). A maioria dos diabéticos em insulinoterapia convencional apresentou sobrepeso (57%), sendo que cerca de 1/3 tinha percentual de gordura corporal elevado. A DMO dos sítios ósseos avaliados foi semelhante entre os grupos (por ex., L1-L4: Controle=0,995±0,138 g/cm²; DM1=0,977±0,132 g/cm²; DM1-TCTH=0,971±0,115 g/cm²; p>0,05). A prevalência de indivíduos com massa

óssea alterada (Z-score > -2,0 ou T-score > -1,0) foi de 12,5% (n=3) no grupo Controle, 26% (n=6) no grupo com DM1 em insulinoterapia convencional e 11% (n=1) no grupo DM1-TCTH. O TAS foi maior no diabético em tratamento convencional, mas o TAV, o LIH e o TAMO da vertebra L3 não diferiram entre os grupos (TAMO: Controle= 34,4±11,7 %; DM1= 34,2±8,5%; DM1-TCHT= 40,3±8,5%; p>0,05). Além disso, a fração saturada e insaturada do TAMO não foi diferente nos grupos de diabéticos tipo 1 (p>0,05). O TAS apresentou uma associação positiva com a DMO do colo do fêmur (+0,0000055 g/cm²; p=0,02). Por sua vez, o teor de LIH mostrou ter uma relação inversa com a DMO do quadril total e da coluna (-0,012 g/cm²; p=0,03), além de fatores como a idade e a glicemia que também apresentaram impacto negativo sobre tecido ósseo. Houve correlação entre o TAV e o LIH (r=0,40), porém não houve associação entre o LIH e o TAMO (+0,226%, p>0,05). O colesterol (+0,09%; p=0,002) se mostrou como um preditor importante do TAMO da vertebra L3. Ainda, a idade (+0,252%; p=0,0006) apresentou uma associação importante com a fração saturada do TAMO e o fato de ser do gênero masculino (-1,379%, p<0,0001) foi um preditor negativo da fração insaturada do TAMO. Além disso, o TAMO não apresentou associação significativa com a DMO da coluna lombar (-0,002 g/cm²; p=0,16). Assim, verificou-se que independentemente do tipo de tratamento clínico recebido, os indivíduos com DM1 apresentaram massa óssea preservada e não houve alteração do TAMO, o que pode estar relacionado com o estado nutricional destes indivíduos. Os diabéticos tipo 1 em insulinoterapia convencional apresentaram maior acúmulo de TAS comparado com os diabéticos tipo 1 submetidos ao TCTH o que pode ter relação com a presença de hiperinsulinemia periférica mais intensa. Por outro lado, não se observou aumento no TAV ou no teor de LIH entre os grupos estudados. O aumento do TAS mostrou ter uma relação positiva com a DMO enquanto que o TAV não apresentou nenhuma associação com a massa óssea. O TAMO não teve um impacto prejudicial para o tecido ósseo. Encontrou-se que o colesterol se mostrou como preditor mais importante para do aumento do TAMO e de sua fração saturada do que o controle glicêmico. Há necessidade de continuidade das investigações sobre o papel do estado nutricional neste contexto para melhor compreensão da inter-relação entre depósitos de tecido adiposo e massa óssea no DM1.

Palavras chave: Diabetes melito do tipo 1. Densidade mineral óssea. Tecido adiposo da medula óssea. Tecido adiposo visceral. Tecido adiposo subcutâneo.

ABSTRACT

CARVALHO, A. L. **Relationship between Body Adiposity, Marrow Adipose Tissue and Bone Mass in Human Type 1 Diabetes Mellitus.** 2017. 156 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Adipose tissue can impact differently depending on its localization and amount of stored fat. Marrow adipose tissue (MAT) expansion occurs in catabolic conditions associated with bone loss, such as anorexia nervosa and glucocorticoid therapy. Conversely, obesity is related to high or normal BMD and no change in MAT. Our aim was to evaluate the relationship of lipids depots with bone mass and MAT in conventionally treated T1D and T1D subjects submitted to hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). The study comprised 3 groups matched by age, gender, height and weight: Control (13M/11F; 29±6 years; 67.4±14.4 Kg; 1.68±0.08 m; 23.8±3.7 Kg/m²), T1D (13M/10F; 32±13 years; 72.3±10.6 Kg; 1.69±0.08 m; 25.3±3.4 Kg/m², 17±11 years of diabetes duration) e T1D-HSCT (5M/4F; 25±6 years; 66.9±11 Kg; 1.72±0.11 m; 22.5±2.2 Kg/m²; 6 months to 10 years after HSCT). Blood samples were collected to evaluate glycemic control. BMD were assessed by DXA. ¹H magnetic resonance spectroscopy (1,5T) was used to evaluate MAT [fat/(fat+water) %] in L3 vertebrae. Subcutaneous adipose tissue (SAT), visceral adipose tissue (VAT), and intrahepatic lipids (IHL) were also evaluated by MRI. Only T1D exhibited poor metabolic control (HbA1c: Control=5.3±0.3%; T1D=9.6±2.2%; T1D-HSCT=6.4±0.5%; p<0,0001). Most T1D patients were overweighted (57%) and 1/3 of them had higher % body fat. BMD was similar between groups (e.g. L1-L4: Control=0.995±0.138 g/cm²; T1D=0.977±0.132 g/cm²; T1D-HSCT=0.971±0.115 g/cm²; p>0.05). Low bone mass (Z-score> -2,0 or T-score> -1,0) prevalence among individuals was 12,5% (n=3) in the Control group, 26% (n=6) in the T1D conventionally treated group and 11% (n=1) in the T1D-HSCT group. SAT was higher in T1D whereas there was no difference in VAT, IHL and MAT (Control: 34.4±11.7 %; T1D: 34.2±8.5%; T1D-HSCT: 40.3±8.5%; p>0.05). Also, there no difference in MAT lipid composition between groups (p>0.05). SAT had a positive association with femoral neck BMD (+0.0000055 g/cm²; p=0.02). Also, IHL had an inverse relationship with total hip and lumbar spine BMD (-0,012 g/cm²; p=0,03). Other factors such as age and glycemic control also had a negative impact on bone mass. There was a positive correlation between VAT and

IHL ($r=0,40$) whereas no association between IHL and MAT was found ($+0.226\%$, $p>0.05$). Cholesterol ($+0,09\%$; $p=0,0006$) was an important predictor of MAT in L3. Yet, age ($+0,252\%$; $p=0,0006$) had a significant association with saturated fraction of MAT and male gender ($-1,379\%$, $p<0,0001$) was a negative factor for the unsaturated fraction of MAT. Moreover, MAT did not have any association with lumbar spine BMD ($-0,002$ g/cm²; $p=0,16$). Therefore, T1D bone mass was preserved and there were no changes in MAT content, independently of clinical treatment. This could be related to the nutritional status of T1D subjects. SAT accumulation was higher in T1D conventionally treated subjects compared to T1D-HSCT individuals probably due to more intense peripheral hyperinsulinemia. On the other hand, there was no increase in VAT and IHL between groups. The increase in SAT associated with higher BMD whereas it was not observed any relationship between VAT and bone mass. MAT did not have a deleterious impact on bone mass. However, cholesterol was a better predictor of MAT and its saturation compared to glycemic control. Further studies are required to better understand nutritional role and bone-fat interactions in T1D condition.

Key words: Type 1 Diabetes Mellitus. Bone mineral density. Marrow Adipose Tissue. Visceral Adipose Tissue. Subcutaneous Adipose Tissue.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização dos grupos de estudo: Controle, DM1 e DM1-TCTH.....	38
Tabela 2. Frequência absoluta e relativa das variáveis qualitativas do estudo por grupo e os respectivos resultados do teste Exato de Fisher.....	39
Tabela 3. Descrição do total de insulina corrigido pelo quilo de peso corporal (UI/Kg de peso/dia) entre os grupos e tempos pré-TCTH, 1 ano após TCTH e atual.....	41
Tabela 4. Comparação da dose de insulina entre os tempos pré-TCTH, 1 ano após TCTH e atual no grupo DM1-TCTH.....	41
Tabela 5. Descrição e comparação das dosagens bioquímicas entre os grupos Controle, DM1 e DM1-TCTH.....	43
Tabela 6. Descrição e comparação das dosagens séricas relacionadas ao metabolismo ósseo entre os grupos Controle, DM1 e DM1-TCTH.	46
Tabela 7. Descrição e comparação de marcadores ósseo e do tecido adiposo entre os grupos Controle, DM1 e DM1-TCTH.....	47
Tabela 8. Descrição e comparação da densidade mineral óssea (DMO) do quadril total, colo do fêmur, coluna lombar, 1/3 do rádio e do corpo total entre os grupos Controle, DM1 e DM1-TCTH.....	52
Tabela 9. Descrição e comparação da composição corporal obtida pela técnica de DXA entre os grupos Controle, DM1 e DM1-TCTH.	57
Tabela 10. Frequência absoluta e relativa dos índices para avaliação da composição corporal pela DXA por grupos.....	60
Tabela 11. Descrição e comparação das medidas do tecido adiposo da medula óssea (TAMO) do corpo vertebral L3, tecido adiposo subcutâneo (TAS), tecido adiposo visceral (TAV) e do teor de lipídio intra-hepático (LIH) entre os grupos.....	62
Tabela 12. Frequência relativa e absoluta da ocorrência de fratura vertebral nos grupos estudados.	65
Tabela 13. Regressão linear múltipla considerando como variável dependente/resposta as DMO do quadril total, colo do fêmur e da coluna lombar (L1-L4).	66
Tabela 14. Valores da correlação e Pearson por grupo e na totalidade dos indivíduos do estudo das variáveis osteocalcina total, CTx e osteocalcina parcialmente descarboxilada.	70

Tabela 15. Valores da correlação e Pearson por grupo e na totalidade dos indivíduos do estudo das variáveis adiponectina e leptina.	73
Tabela 16. Regressão linear múltipla considerando como variável dependente/resposta as frações total, saturada e insaturada do tecido adiposo da medula óssea (TAMO) da vertebra L3.....	74
Tabela 17. Valores da correlação e Pearson por grupo e na totalidade dos indivíduos do estudo da variável dose de insulina e os diferentes tipos de tecidos adiposos.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Quantificação do tecido adiposo da medula óssea pela técnica de espectroscopia de prótons (1H-MRS).....	35
Figura 2. Quantificação do tecido adiposo subcutâneo (TAS), tecido adiposo visceral (TAV) e o teor de lipídio intra-hepático (LIH) pela técnica de <i>in phase/out phase</i> .Análise estatística .	36
Figura 3. Gráficos tipo box plot das dosagens de glicemia, HbA1c, albumina, cálcio corrigido e fosfatase alcalina nos grupos Controle, DM1 e DM1-TCTH.....	48
Figura 4. Gráficos tipo box plot das dosagens séricas relacionadas ao metabolismo ósseo e dos marcadores da remodelação óssea nos grupos Controle, DM1 e DM1-TCTH.	49
Figura 5. Gráficos tipo box plot dos marcadores do tecido ósseo e do tecido adiposo nos grupos Controle, DM1 e DM1-TCTH.....	50
Figura 6. Gráficos tipo box plot sobre as medidas de DMO dos sítios ósseos avaliados nos grupos Controle, DM1 e DM1-TCTH.....	56
Figura 7. Gráficos tipo box plot sobre a quantificação do tecido adiposo da região abdominal (TAS e TAV) e do teor de lipídio intra-hepático (LIH) nos grupos Controle, DM1 e DM1-TCTH.....	63
Figura 8. Gráficos tipo box plot sobre a tecido adiposo da medula óssea (TAMO) da vertebra L3 nos grupos Controle, DM1 e DM1-TCTH.....	64
Figura 9. Gráficos da associação entre as variáveis independentes e a medida de DMO do quadril total.....	68
Figura 10. Gráficos da associação entre as variáveis independentes e a medida de DMO do colo do fêmur.....	68
Figura 11. Gráficos da associação entre as variáveis independentes e a medida de DMO da coluna lombar (L1-L4).	69
Figura 12. Gráficos de correlação de Pearson entre tecido adiposo visceral (TAV) e lipídio intra-hepático (LIH) por grupo estudado: Controle, DM1 e DM1-TCTH.	71
Figura 13. Gráficos da associação entre as variáveis independentes e a fração total e saturada do tecido adiposo da medula óssea (TAMO) da vertebra L3.....	75

LISTA DE APÊNDICES E ANEXOS

Apêndice 1 – Avaliação antropométrica complementar.

Apêndice 2 – Análise de frequência absoluta e relativa do índice de massa corporal (IMC) por grupo.

Apêndice 3 – Medicamentos utilizados pelos voluntários recrutados e sua frequência de uso.

Apêndice 4 – Tabelas com modelos de regressão linear múltipla considerado como variáveis dependentes ou resposta a DMO e o tecido adiposo da medula óssea (TAMO) da vertebra L3.

Apêndice 5 – Projeto experimental com modelo animal com DM1 farmacologicamente induzido.

Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Anexo 2 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DM1	Diabete Melito do tipo 1
DCCT	<i>The Diabetes Control and Complications Trial</i>
TMO	Transplante de medula óssea
TCTH	Transplante de células tronco hematopoiéticas
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
PTH	Paratormônio
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
OC	Osteocalcina
D-OC	Osteocalcina parcialmente descarboxilada
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-β ligand</i>
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
DM2	Diabete Melito do tipo 2
DXA	Absorciometria de raio-x de dupla energia
25(OH)D	25-Hidroxivitamina D
AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
CTx	Telopectídeo carboxiterminal do colágeno tipo I
HCFMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
UTMO	Unidade de Transplante de Medula Óssea
HbA1c	Hemoglobina glicada
DMO	Densidade mineral óssea
RM	Ressonância Magnética
¹ H-MRS	Técnica de espectroscopia de prótons
IMC	Índice de Massa Corporal
TAS	Tecido adiposo subcutâneo
TAV	Tecido adiposo visceral
LIH	Lipídio intra-hepático

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	22
Diabetes Melito tipo 1.....	22
A interação entre o metabolismo ósseo e energético no DM1	24
JUSTIFICATIVA	29
HIPÓTESE	29
OBJETIVO	30
Objetivo geral	30
Objetivos específicos	30
MATERIAL E MÉTODOS.....	31
Seleção de voluntários e critérios de inclusão	31
Critérios de exclusão.....	32
Avaliação antropométrica	32
Análise bioquímica e hormonal	32
Avaliação da densidade mineral óssea e composição corporal	33
Avaliação do tecido adiposo da medula óssea e da região abdominal	34
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	77
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	88
APÊNDICES	104
ANEXOS	147

INTRODUÇÃO

Diabetes Melito tipo 1

O diabetes melito do tipo 1 (DM1) é uma doença crônica autoimune marcada pela destruição das células β pancreáticas e consequentemente pela incapacidade de secreção de insulina. A prevalência é de cerca de 10 a 15% de todos os casos de diabetes melito. O processo autoimune se inicia anos ou meses antes dos primeiros sinais e sintomas decorrentes da hiperglicemia. No momento do diagnóstico clínico, a quantidade de células β remanescentes é pequena, havendo a destruição de cerca de 70% a 80% do conjunto de células β pancreáticas. O processo de morte celular, apoptose, é desencadeado por mediadores solúveis como citocinas, que são secretadas pelas células imunes infiltradas na ilhota pancreática, e por radicais livres de oxigênio e óxido nítrico, que são produzidos por macrófagos (CNOP *et al.*, 2005; EIZIRIK *et al.*, 2008; PIROT; CARDOZO; EIZIRIK, 2008; COURI; DE OLIVEIRA; SIMÕES, 2012).

O Estudo multicêntrico prospectivo, *The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)*, é um marco na investigação clínica, tendo demonstrado que o controle metabólico rígido do DM1 reduz a prevalência de complicações microangiopáticas (THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1993). Desde então, as principais alternativas terapêuticas para prevenção de complicações crônicas associadas ao DM1, têm sido as múltiplas injeções subcutâneas de insulina e a infusão de insulina por meio de bomba, as quais permitem atingir níveis satisfatórios de controle glicêmico (THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1993; COURI *et al.*, 2012).

A função residual das células β remanescentes no DM1 tem relação com a idade, a duração da doença e o controle metabólico (THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1998). Quando o DM1 se instala na infância o processo de autodestruição das células β pancreáticas ocorre de forma acelerada. Ao contrário, no adulto, o processo de morte celular é mais lento o que permite a manutenção de reserva funcional da ilhota pancreática por tempo mais prolongado (COURI; VOLTARELLI, 2008).

A avaliação da secreção endógena de insulina pode ser feita pela dosagem de peptídeo C, o qual é um dos dois peptídeos da clivagem enzimática da pró-insulina em insulina. Estudos prévios mostram inclusive que concentrações mais elevadas de peptídeo C estão diretamente associadas à redução do risco de desenvolvimento de complicações crônicas do DM1 (THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1998; COURI; FOSS; VOLTARELLI, 2006; RODACKI; MILECH; OLIVEIRA, 2008; VOLTARELLI *et al.*, 2008; COURI *et al.*, 2009).

Ao avaliar as concentrações de peptídeo C, os pesquisadores do DCCT mostraram que o uso da terapia insulínica intensiva também retardou a perda da função das células β remanescentes. Este fato relacionou-se com menor frequência de episódios de hipoglicemia e de complicações microvasculares (THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1998).

Dessa forma, a preservação das células β pancreáticas remanescentes se apresenta como um importante alvo no tratamento do DM1 (BONIFACIO *et al.*, 1990; COURI *et al.*, 2006). Tendo em vista que o controle metabólico rígido do DM1 envolve grande sacrifício do paciente, necessita de equipe técnica multidisciplinar bem treinada e implica em custo significativo, existe grande interesse no desenvolvimento de alternativas terapêuticas. Tratamentos imunomodulatórios passaram a ser propostos objetivando bloquear alguns dos passos do processo autoimune contra a célula β pancreática (BURT *et al.*, 2002; VOLTARELLI *et al.*, 2007; ROSENGREN; RENSTRÖM, 2009; SNARSKI *et al.*, 2011).

Recentemente, as evidências indicam que, no DM1 recém-diagnosticado, a imunossupressão em altas doses, associada à infusão autóloga de células tronco hematopoiéticas, tem a capacidade de amenizar a destruição das células pancreáticas, preservando parcialmente a secreção pancreática de insulina (COURI; VOLTARELLI, 2009; FIORINA; VOLTARELLI; ZAVAZAVA, 2011; LOCASCIO; SPINELLI; KURTZ, 2011; GODFREY *et al.*, 2012). Assim, a “reconfiguração imunológica” realizada por meio do transplante de medula óssea (TMO), referida atualmente como transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH), associada à imunossupressão, surge como terapia promissora e alternativa à terapêutica convencional para o DM1 (FIORINA; VOLTARELLI; ZAVAZAVA, 2011; LOCASCIO; SPINELLI; KURTZ, 2011).

A interação entre o metabolismo ósseo e energético no DM1

Classicamente, o diabetes melito era considerado uma doença do metabolismo energético associada ao catabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. No entanto, este distúrbio também interfere no metabolismo mineral, o que pode ser facilmente demonstrado pelo efeito promotor de perda urinária de cálcio, fósforo e magnésio da hiperglicemia. Por este meio, é possível que o DM leve a alteração na secreção de hormônios calciotróficos, em particular do paratormônio (PTH), e influencie negativamente sobre a massa óssea. No entanto, é possível que o hiperparatireoidismo secundário não seja uma ocorrência frequente no DM uma vez que não foi observado hipersecreção de PTH em estudos funcionais da paratireoide em paciente com diferentes condições de controle metabólico (PAULA *et al.*, 2001; DE PAULA; HOROWITZ; ROSEN, 2010; STARUP-LINDE, 2013).

A atual importância da osteoporose em saúde pública aumentou o interesse em se escrutinar outros mecanismos envolvidos na perda de massa óssea no DM. Surpreendentemente, estudos recentes têm mostrado grande interação entre o metabolismo mineral e o energético. Mecanismos bilaterais de modulação envolvem células (p. ex., adipócitos e osteoblastos), hormônios (p. ex., vitamina D e insulina) e outros fatores (p.ex., fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), leptina, adiponectina e Pref-1) (DUCY *et al.*, 2000; PAULA *et al.*, 2001; TAKEDA *et al.*, 2002; ROSEN ; BOUXSEIN, 2006; ROSEN; KLIBANSKI, 2009; DE PAULA; HOROWITZ; ROSEN, 2010; KARSENTY; OURY, 2010; KARSENTY, 2011; COURTLAND *et al.*, 2013). Nossa compreensão sobre a interação entre o tecido ósseo e os principais sítios envolvidos no controle metabólico ainda é incompleto e multifacetado. O estudo do surgimento de osteoporose no DM, potencialmente pode contribuir não só para o entendimento do processo de perda de resistência óssea, mas também para a compreensão de alterações do metabolismo energético (FAZELI *et al.*, 2013). Um aspecto relevante em textos que tratam da associação entre DM e osteoporose é que o impacto do DM1 e DM tipo 2 (DM2) sobre o esqueleto é diferente. Inclusive, até recentemente se considerava apenas o DM1 como causa de osteoporose secundária enquanto o DM2 chegou a ser aceito como tendo papel protetor quanto ao desenvolvimento de osteoporose. Esta percepção foi recentemente revista após estudos prospectivos terem demonstrado que tanto os indivíduos com DM1 quanto os com DM2 apresentam maior risco de fratura. Não obstante, os mecanismos que levam à fragilidade óssea nestas situações podem ser, pelo menos em

parte, diferentes tendo em vista que se acredita que a perda de massa óssea é uma característica apenas do DM1.

Uma das alterações, frequentemente apresentada por indivíduos com DM1, que limitam o desenvolvimento e manutenção da massa óssea é a perda de peso (TUOMINEN *et al.*, 1999; DE PAULA; HOROWITZ; ROSEN, 2010; PAULA; ROSEN, 2010). O peso corporal exerce efeito positivo sobre a massa óssea, sendo o baixo peso fator de risco para osteoporose. Doenças associadas à perda de peso como a anorexia nervosa (FAZELI *et al.*, 2012) e a indução rápida de perda de peso corporal, como a que ocorre após a cirurgia bariátrica, provocam significativa queda de massa óssea (PEREIRA *et al.*, 2007). Todavia, é importante ressaltar que a redução de massa óssea no DM1 não se deve apenas a fatores mecânicos. As concentrações séricas de PTH, IGF-I, insulina, estrógenos e leptina, também influenciam na conservação da massa óssea nestes indivíduos (KAYATH *et al.*, 1998; PEREIRA *et al.*, 2007; DE PAULA; HOROWITZ; ROSEN, 2010; PAULA; ROSEN, 2010; ROSEN; MOTYL, 2010; FAZELI *et al.*, 2012; MOTYL, MCCAULEY; MCCABE, 2012; MOTYL; ROSEN, 2012; COURTLAND *et al.*, 2013).

Estudos experimentais em camundongos geneticamente modificados, com deleção do receptor de insulina em osteoblastos, mostraram que o silenciamento do receptor de insulina nestas células se associa a prejuízo de formação óssea de um lado e ainda alteração de tolerância à glicose (FERRON *et al.*, 2010; FULZELE *et al.*, 2010). Estes dados permitem fazer a hipótese que a perda óssea no DM1 seja pelo menos em parte decorrente do estado de insulinopenia (FERRON *et al.*, 2010; FULZELE *et al.*, 2010).

A sinalização da insulina no desenvolvimento ósseo está associada com aumento da expressão de Runx2, fator chave no processo de diferenciação de células progenitoras em osteoblastos. A sinalização da insulina suprime o fator de transcrição Twist2, responsável por inibir a expressão de Runx2. Desta forma, a redução da expressão de Twist2 pode ser um mecanismo importante de favorecimento de formação óssea induzido pela insulina. (FULZELE *et al.*, 2010).

Existe convergência de resultados na literatura indicando que a taxa de formação óssea é diminuída no DM1. Em estudos clínicos, isto é revelado pela coincidente observação de valores baixos de osteocalcina (OC) circulante. Por outro lado, os resultados são mais variados quanto a parâmetros que refletem a atividade de resorção óssea, existindo dados compatíveis com resorção normal, reduzida (MCCABE, 2007; GENNARI *et al.*, 2012) ou aumentada (TSENTIDIS *et al.*, 2016).

A OC é uma proteína óssea específica, que além de ser um marcador da formação óssea, quando em sua forma parcialmente descarboxilada (D-OC), parece regular a sensibilidade periférica à insulina, estimular a síntese de insulina e o gasto energético (FERRON *et al.*, 2010; ZANATTA *et al.*, 2014). Além da interação entre o pâncreas e o tecido ósseo, verificou-se que as adipocinas, como a leptina e adiponectina, também exercem complexa influência sobre as células ósseas. Estes peptídeos participam na modulação do apetite, na secreção e sensibilidade à insulina, assim como parecem ter papel significativo na regulação da remodelação óssea (DE PAULA; HOROWITZ; ROSEN, 2010; KARSENTY; OURY, 2010).

Estudos clínicos mostram que no DM1 a concentração sérica de leptina está diminuída (TEIJEIRA-FERNANDEZ *et al.*, 2010). A ação óssea da leptina sobre a manutenção da massa óssea, no entanto, ainda não está completamente elucidada (MARTIN *et al.*, 2007). Possivelmente, os dados conflitantes se devem à complexa interação entre a leptina e o tecido ósseo, a qual ocorre indiretamente por via central e por ação direta em seus receptores em osteoblastos (NG, 2011). Estudos experimentais mostram que a leptina age no núcleo hipotalâmico ventro-medial estimulando o sistema nervoso simpático. Assim, estimula receptores adrenérgicos β_2 (β_2AR) em osteoblastos, promovendo redução da formação óssea (DUCY *et al.*, 2000; TAKEDA *et al.*, 2002; ELEFTERIOU *et al.*, 2005). Além disso, favorece a resorção óssea por aumentar a expressão do fator promotor de diferenciação de osteoclastos, o RANKL, pelas células progenitoras de osteoblastos (NG, 2011). Por outro lado, a ação direta de leptina em seus receptores osteoblásticos tem efeito anabólico, promovendo aumento da proliferação dos osteoblastos e inibindo a formação de osteoclastos, ação oposta à sua atuação por via central (NG, 2011).

Outro aspecto relevante sobre a investigação da relação entre o metabolismo ósseo e energético é a origem comum de adipócitos e osteoblastos da medula óssea a partir de uma mesma célula multipotencial. Desta forma, é possível que o incremento de diferenciação da célula tronco mesenquimal para uma determinada linhagem celular possa ocorrer em detrimento da outra (ROSEN; BOUXSEIN, 2006). Estudos em camundongos mostraram que durante o processo de envelhecimento, ocorre concomitantemente aumento na adiposidade da medula óssea e perda de massa óssea (LAZARENKO *et al.*, 2007). Além disso, neste estudo se observou aumento da expressão do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama 2 (PPAR γ 2) em tecido ósseo (LAZARENKO *et al.*, 2007). O PPAR γ 2 é um fator

crucial para diferenciação de células primordiais em adipócitos (ROSEN; BOUXSEIN, 2006; SADIE-VAN GIJSEN *et al.*, 2012).

Entretanto, a diferenciação da célula mesenquimal da medula óssea em osteoblastos, parece ser favorecida pela expressão e/ou ativação de fatores de transcrição específicos como, por exemplo, Runx2, Osterix e β -catenina (ROSEN; BOUXSEIN, 2006; SADIE-VAN GIJSEN *et al.*, 2012).

A importância do estudo da interação do metabolismo ósseo e energético pode ser ressaltada por dados recentes que mostram que drogas utilizadas no tratamento do DM2 podem se associar à perda de massa óssea e aumento do risco de fratura. A rosiglitazona e a pioglitazona ativadores exógenos do PPAR γ 2, mostraram eficácia na redução da glicemia em longo prazo. No entanto, indivíduos em uso destas drogas apresentam rápida alteração de marcadores de remodelação óssea e queda da densidade mineral óssea. Em longo prazo, o risco de fratura aumenta, em particular em mulheres na pós-menopausa. Estudos experimentais mostram que a rosiglitazona potencializa o aumento de adiposidade da medula óssea e a perda de massa óssea associada ao envelhecimento (LAZARENKO *et al.*, 2007).

Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* mostram a existência de interação entre as células tronco mesenquimais, os osteoblastos e as células tronco hematopoiéticas no microambiente da medula óssea. Esta interação parece ser importante para a manutenção da capacidade de auto renovação das células tronco hematopoiéticas e parece influenciar a sua diferenciação (DE BARROS *et al.*, 2010; ISERN; MÉNDEZ-FERRER, 2011; SHEN; NILSSON, 2012). Esta possibilidade de interação pode ter efeito sobre a migração, proliferação e diferenciação destas células, sendo outro aspecto que poderá auxiliar na elucidação da relação entre adiposidade da medula óssea e perda de massa óssea em indivíduos com DM1. É importante que se investigue o impacto da terapia imunomodulatória e do transplante de células tronco hematopoiéticas sobre a geração de células mesenquimais da medula óssea e conseqüentemente o surgimento de osteoporose.

Portanto, vários são os fatores que podem induzir à perda de massa óssea e à fragilidade óssea nos indivíduos com DM1 (KAWAI; DE PAULA; ROSEN, 2012). No entanto, os mecanismos que contribuem para estes fatos não foram totalmente elucidados. Por esta razão, existe grande interesse no reconhecimento da relação entre o aumento de adiposidade da medula óssea com o desencadeamento de osteoporose no DM1 (ROSEN; BOUXSEIN, 2006). Adicionalmente, é importante que se avalie possíveis impactos de novas propostas terapêuticas do DM1 sobre a saúde óssea. Este aspecto é especialmente relevante no

DM1 por acometer principalmente indivíduos na fase de desenvolvimento. A fase de aquisição de massa óssea, a qual ocorre nas primeiras duas a três décadas de vida, corresponde a um período crucial na determinação da resistência óssea ao longo da vida. Doenças e tratamentos que limitem o pico de massa óssea são determinantes inequívocos do surgimento de osteoporose e predisposição futura à fratura. Na presente proposta de estudo pretende-se contribuir para o entendimento da etiopatogenia da perda de massa óssea no DM1 e do impacto que o TCTH no DM1 pode ter no desenvolvimento e na manutenção da massa óssea.

JUSTIFICATIVA

A identificação precoce dos fatores de risco associados à baixa massa óssea e ao risco de fraturas é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico precoce de osteoporose e de sua prevenção (ABRAHAMSEN *et al.*, 2006).

O DM1 é uma doença classicamente associada à perda de massa óssea e o indivíduo diabético apresenta um conjunto de fatores clínicos que favorecem a ocorrência de fratura (MCCABE, 2007; HOUGH *et al.*, 2016; NAPOLI *et al.*, 2016).

Desta forma, existe grande interesse em se investigar possíveis mecanismos de associação entre estes dois distúrbios e em paralelo desenvolver formas de diagnóstico e tratamento precoces.

HIPÓTESE

O conjunto de alterações metabólicas e hormonais presentes no DM1 favorecem o aumento de adiposidade da medula óssea, em paralelo ocorre prejuízo da atividade osteoblástica dificultando a manutenção da massa óssea. O TCTH pode influenciar este processo intensificando o processo de adipogênese da medula óssea e redução da massa óssea.

OBJETIVO

Objetivo geral

Avaliar a qualidade e quantidade de massa óssea e a interação entre o metabolismo ósseo e o energético em indivíduos com DM1 em insulinoterapia convencional, indivíduos DM1 submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) e em indivíduos normoglicêmicos (controles), os quais foram pareados por idade, peso, altura e gênero.

Objetivos específicos

- a) Avaliar a massa óssea por absorciometria de raios-X de dupla energia (DXA) em coluna lombar, quadril total, fêmur proximal, antebraço e corpo total.
- b) Avaliar parâmetros bioquímicos e hormonais relacionados ao metabolismo ósseo assim como os marcadores ósseos e adipocinas.
- c) Avaliar quantitativamente o tecido adiposo da medula óssea (TAMO) do corpo vertebral (L3) e adiposidade da região abdominal (TAV e TAS) e lipídios intra-hepáticos (LIH).
- d) Verificar a relação entre os diferentes depósitos de tecido adiposo e adipocinas com as medidas de quantidade e qualidade da massa óssea.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo é do tipo transversal e foi desenvolvido durante o período do ano de 2013 até 2016. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e foram informados sobre os objetivos da pesquisa, possíveis desconfortos e todos os procedimentos a que foram submetidos (anexo 1). O protocolo do projeto de pesquisa foi aprovado previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP, ofício nº 211/2012 em 26/03/2012 (anexo 2).

Seleção de voluntários e critérios de inclusão

Realizou-se o recrutamento de indivíduos adultos acima de 18 anos normoglicêmicos e com diagnóstico de DM1 que foram alocados em três grupos pareados por idade, gênero, peso e altura. Foram incluídos 24 indivíduos (11 mulheres e 13 homens) normoglicêmicos, 23 indivíduos (10 mulheres e 13 homens) com o diagnóstico de DM1 e 9 indivíduos (4 mulheres e 5 homens) com diagnóstico de DM1 que no passado foram submetidos ao TCTH autólogo até no máximo seis semanas após o diagnóstico de DM1.

Os indivíduos normoglicêmicos compõem o grupo controle e foram selecionados no campus USP-Ribeirão, sendo a divulgação do trabalho feita por meio de cartazes. Os participantes do grupo DM1 em insulinoterapia convencional foram selecionados nos ambulatórios de Diabetes do Centro Saúde Escola (CSE) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) e foram selecionados aqueles com mais de 5 anos de diagnóstico. E, o grupo DM1 TCTH foi recrutado na Unidade de Transplante de Medula Óssea (UTMO) do HCFMRP-USP. Desde 2003, já foram realizados 27 TCTH em pacientes no serviço. Para a realização deste estudo, todos os pacientes submetidos ao TCTH foram contatados e convidados para participar do estudo. No entanto, nem todos permanecem em seguimento no HCFMRP-USP e moram em diferentes estados e regiões deste país o que limitou o alcance de um número maior de voluntários.

Crítérios de exclusão

Como critérios de exclusão foram considerados os seguintes aspectos: presença de insuficiência renal ou hepática; história de tabagismo; história de uso de medicamentos que interferem no metabolismo mineral como os tiazídicos e os glicocorticóides e história de uso de medicamentos para tratamento de osteoporose como bisfosfonatos.

Avaliação antropométrica

Todos os voluntários foram entrevistados no dia da coleta sendo realizadas as medidas de peso (Kg) e estatura (m) utilizando a balança da marca Welmy® (W200/5 Classe III) e o estadiômetro profissional Sanny®. Posteriormente, foi feito o cálculo de Índice de massa corporal (IMC) (Kg/m^2). Além disso, foi feita avaliação complementar para se obter informações tais como perímetro de cintura (cm) e as pregas cutâneas cujos dados estão expostos no apêndice 1.

Análise bioquímica e hormonal

A coleta de sangue foi realizada pela manhã, com os indivíduos em jejum de 8 a 12 horas, sendo colhidos 20 ml de sangue para a realização dos exames bioquímicos e hormonais. No Laboratório Central do HCFMRP-USP foram feitas as dosagens de cálcio total, fósforo inorgânico, creatinina, glicemia de jejum, colesterol total, triglicerídeos, HDL colesterol, LDL colesterol, fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) pelo aparelho analisador bioquímico automático (KONELAB 60i, Wiener, Thermo Clinical Labsystem ou Ruukintie, Espoo, Finlândia). Também foram realizadas as dosagens de hemoglobina glicada (HbA_{1c}) por HPLC (D-10TM Hemoglobin A_{1c} Program and Dual Program, Hercules, California, USA) e do PTH intacto pelo método de quimioluminescência (Immulate, Siemens, Los Angeles, CA, USA).

No Laboratório de Screening do HCFMRP-USP foi feita a dosagem de IGF-1 pelo método de quimioluminescência (Immulate, Siemens, Los Angeles, CA, USA).

No Laboratório de Minerais e Metabolismo Ósseo do HCFMRP-USP foram realizadas as dosagens de 25-hidroxivitamina-D (25(OH)D) pela técnica de quimioluminescência, em analisador automático (Liaison, Diasorin, Saluggia, VC, Itália) e também as dosagens em

duplicata de osteocalcina (OC) total (Cat.#KAP1381, hOST-EASIA, DIAsource ImmunoAssays, Louvain-la-Neuve, Belgium), osteocalcina parcialmente descarboxilada (D-OC) (Cat.#MK118, Glu-OC EIA kit, Takara Bio Inc., Japan), adiponectina total (Cat.#EZHADP-61K, ELISA Adiponectin human Millipore, Missouri, USA) e leptina (Cat.#TE1016, TecnoMedical Quidel, ELISA Leptin human kit, Gewerbestrasse, Switzerland) pelo método ELISA. O coeficiente de variação (CV) intraensaio dos kits dosados por ELISA foi de 3,6% para a OC total, 4,9% para D-OC, 2,1% para adiponectina e de 5,3% para leptina.

O telopeptídeo carboxi-terminal do colágeno do tipo I (CTX) foi determinado em aparelho automático Elecsys (β -crosslaps/serum assay, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA).

Avaliação da densidade mineral óssea e composição corporal

A densitometria óssea foi realizada no Centro de Imagens do HCFMRP-USP pela técnica de raios-X de dupla energia (DXA) no aparelho Hologic Discovery QDR® Series (Discovery Wi, Waltham, MA, USA). Os exames de DXA foram realizados por duas técnicas do serviço e o CV foi de 0,87% na coluna lombar, 1,46% no quadril total, 1,84% no colo do fêmur, 1,99% do 1/3 do rádio e 0,98% do corpo total.

A densidade mineral óssea (DMO) foi avaliada nos seguintes sítios ósseos: coluna lombar (L1-L4), corpo vertebral L3, quadril total, fêmur proximal, 1/3 do antebraço e corpo total sendo expressa em g/cm^2 . O valor de DMO dos voluntários do gênero masculino com menos de 50 anos e das mulheres pré-menopausadas foi analisado de acordo com os valores de Z-score, sendo considerada massa óssea adequada para a idade quando o Z-score > -2 e massa óssea inadequada para idade quando o Z-score ≤ -2 em pelo um dos sítios ósseos avaliados (LEWIECKI *et al.*, 2008). O valor de T-score foi considerado somente para os participantes com idade acima de 50 anos o que permitiu a classificação óssea em adequada (T-score ≥ -1), osteopenia (T-score entre -1 e -2,5) e osteoporose (T-score $\leq -2,5$) (LEWIECKI *et al.*, 2008).

A avaliação da composição corporal foi feita para obtenção dos dados de massa de gordura corporal (Kg e %), massa magra (Kg) e conteúdo mineral ósseo do corpo total (g). Foi feito o cálculo do índice de massa de gordura (IMG) (KELLY; WILSON; HEYMSFIELD, 2009) e o índice de massa muscular apendicular (IMMA) (BAUMGARTNER *et al.*, 1998). O IMG permite a classificação do gordura corporal entre

deficiência grave e obesidade grau III e o IMMA permite avaliar se a massa muscular apendicular está abaixo ou acima do esperado de acordo com o gênero. A análise de morfometria da coluna vertebral foi realizada pelo Prof. Dr. Marcello Henrique Nogueira-Barbosa para verificar a presença subclínica de fraturas. A avaliação foi feita nos corpos vertebrais de T1 até L5.

Avaliação do tecido adiposo da medula óssea e da região abdominal

Os exames de ressonância magnética (RM) também foram realizados no Centro de Imagens do HCFMRP-USP no aparelho de 1,5 Tesla (Philips Medical System; modelo ACHIEVA).

Para quantificação de gordura na região da coluna lombar se utilizou uma bobina phased-array. As imagens obtidas são pesadas em T1 do tipo gradiente de eco com dois valores de tempo ao eco, em fase (TE=4,6 ms) e fora de fase (TE=2,3 ms). Outros parâmetros são TR=300 ms, 15 cortes sagitais de 4 mm de espessura. Estas imagens são utilizadas para fazer um mapa de fração de gordura e como localizadoras para a espectroscopia; a duração é de 1 minuto.

Na técnica de espectroscopia de prótons ($^1\text{H-MRS}$) está sendo usado um voxel de $1,5 \times 1,5 \times 1,5 \text{ cm}^3$ posicionado sobre o corpo vertebral de L3, técnica PRESS com 8 medidas, sem supressão do sinal da água, TR=2000ms e múltiplos valores de TE=40/60/80ms. Os dados são processados com o software LC model e foi calculada a fração de gordura, a partir da área embaixo da curva do sinal na região de 1.2-1.5 ppm, relacionada com a concentração de água e gordura (HATIPOGLU *et al.*, 2007).; a duração: é de 1 minuto. O valor relatado no presente estudo é a fração de gordura/água+total de gordura (picos nas regiões de 0,9; 1,3; 2,3 e 5,3 ppm), sendo a concentração de água (pico na região de 4,7 ppm) igualmente corrigida ante o efeito de relaxação transversal. Os picos nas regiões de 0,9 e 1,3 ppm são correspondentes à fração saturada, os picos na região de 5,3 ppm correspondem à fração insaturada e o pico de 2,3 ppm corresponde ao lipídio residual. As imagens pesadas em difusão estão sendo adquiridas usando uma sequência spin eco combinada com uma sequência eco planar de disparo único (TR/TE=8000/70ms), sendo considerado três valores de $b=0,500, 1000 \text{ s/mm}^2$ nas três direções principais. Os mapas de ADC são calculados diretamente na máquina de RM e o tempo de realização é de 3 minutos (figura 1).

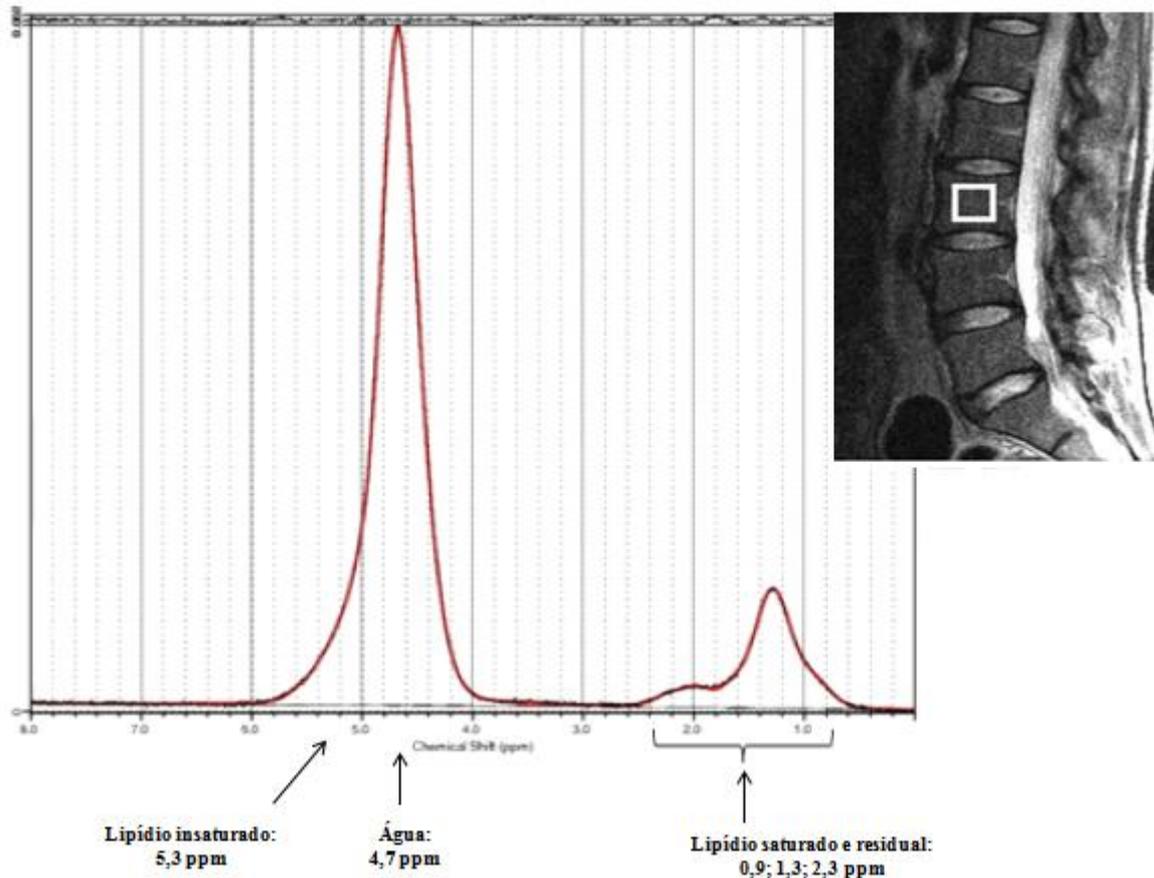


Figura 1. Quantificação do tecido adiposo da medula óssea pela técnica de espectroscopia de prótons (^1H -MRS).

A quantificação do tecido adiposo subcutâneo (TAS), tecido adiposo visceral (TAV) e o teor de lipídio intra-hepático (LIH) foram feitas no software Display. A análise do TAV e do TAS foi realizada pela imagem axi in/out BH inferior. É selecionado o corte da área da região da cicatriz umbilical do indivíduo e a partir da imagem deste corte é feita a segmentação manual em gordura subcutânea e visceral. O cálculo da quantidade de gordura nestas áreas é feito pelo número do voxel e o tamanho do voxel (mm) subcutâneo e visceral. Para análise da gordura hepática seleciona-se a região central com melhor posicionamento do fígado, sendo delimitadas quatro regiões de interesse (ROI) no tamanho 10. Os quatro ROI são posicionados no sentido anti-horário nas quatro extremidades do órgão. O cálculo da porcentagem de gordura de cada ROI é utilizado para se obter a média de % de gordura hepática (FISHBEIN et al., 2006) (figura 2).

As análises dos exames de RM são realizadas com a colaboração dos Profs. Drs. Marcello Henrique Nogueira-Barbosa, Jorge Elias Junior e Carlos Ernesto Garrido Salmon.

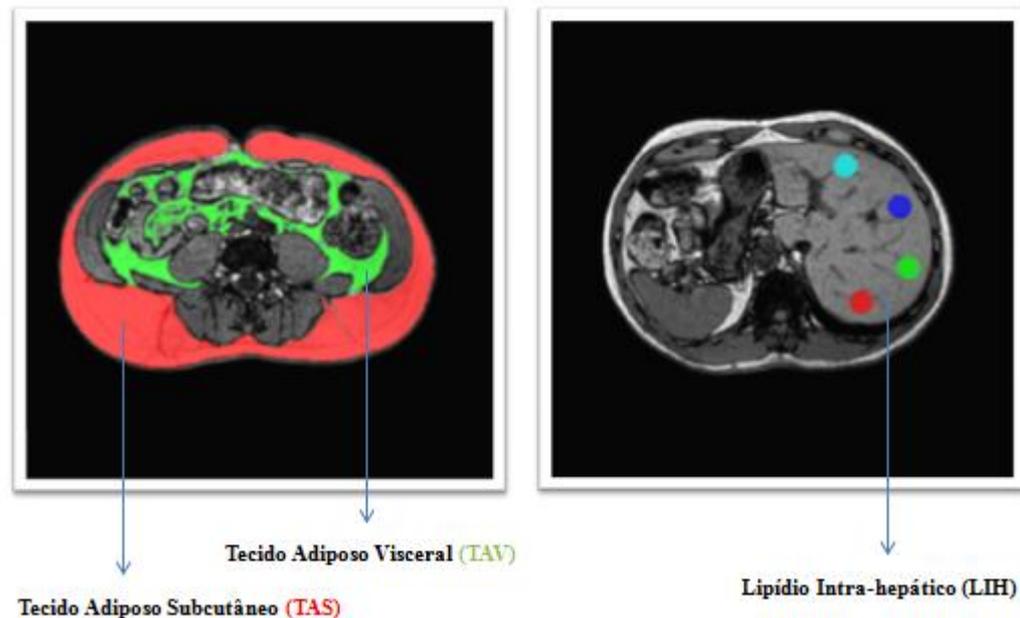


Figura 2. Quantificação do tecido adiposo subcutâneo (TAS), tecido adiposo visceral (TAV) e o teor de lipídio intra-hepático (LIH) pela técnica de *in phase/out phase*. **Análise estatística**

Foram feitas análises de variância simples (ANOVA) com um fator (*one-way*) para comparação entre médias das variáveis. Para a utilização desse modelo foi necessário que os resíduos tivessem distribuição normal com variância constante. Foram utilizados como pós-teste os contrastes ortogonais. Para verificar associação entre diversas variáveis qualitativas e os grupos de estudo foi aplicado o teste “Exato de Fisher”. Foi feita análise exploratória com frequências relativas e absolutas de algumas variáveis. Além disso, foram calculadas correlações de Pearson entre variáveis quantitativas contínuas e foi feita análise de regressão linear múltipla para encontrar uma possível associação entre algumas variáveis independentes e uma determinada variável resposta contínua. A análise estatística dessas metodologias foi feita através dos procedimentos PROC FREQ e PROC REG do software SAS versão 9.4 e os gráficos foram realizados no software R 3.3.1. Para as análises foi adotado o nível de significância de $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS

A caracterização dos grupos estudados está exposta nas tabelas 1 e 2. Os grupos do estudo foram homogêneos em relação à idade, peso e estatura. Somente dois voluntários do grupo controle e dois do grupo DM1 tinham idade > 50 anos. Observou-se também que não houve evidências de diferença significativa quanto ao IMC entre os grupos de estudo (tabela 1). Observou-se que 34% (n=8) dos indivíduos controle, 57% (n=13) do grupo DM1 em insulinoterapia convencional e 22% do grupo DM1-TCTH (n=2) apresentaram $IMC \geq 25$ Kg/m² (apêndice 2).

O tempo de diagnóstico da doença no grupo DM1 variou entre 3 a 47 anos e a média e desvio-padrão foi de 17±11 anos. Com relação aos indivíduos do grupo DM1 submetidos ao TCTH, todos apresentavam no máximo seis semanas de diagnóstico de DM1 no período pré-TCTH. O tempo de pós-TCTH até a coleta de dados do presente estudo variou entre 0,5 a 10 anos, sendo que a média e desvio-padrão foi de 5±4 anos (tabela 1).

Tabela 1. Caracterização dos grupos de estudo: Controle, DM1 e DM1-TCTH

Variáveis	Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
Idade (anos)	Controle	24	32	12	19	29	66	0,29
	DM1	23	32	13	20	28	68	
	DM1-TCTH	9	25	6	20	24	37	
Idade da menarca (anos)	Controle	11	12	1	10	13	14	0,34
	DM1	10	13	2	9	13	15	
	DM1-TCTH	4	12	2	9	12	13	
Tempo de doença ou pós-TCTH (anos)	DM1	23	17	11	3,0	15	47	0,003
	DM1-TCTH	9	5	4	0,5	5	10	
Peso (kg)	Controle	24	67,4	14,4	42,8	66,7	106,1	0,33
	DM1	23	72,3	10,6	52,5	72,3	98,9	
	DM1-TCTH	9	66,9	11,0	48,6	65,1	86,0	
Estatura (m)	Controle	24	1,68	0,08	1,52	1,69	1,83	0,45
	DM1	23	1,69	0,08	1,51	1,71	1,86	
	DM1-TCTH	9	1,72	0,11	1,56	1,71	1,88	
Índice de massa corporal (IMC) (kg/m ²)	Controle	24	23,8	3,7	17,5	24,4	31,9	0,10
	DM1	23	25,3	3,4	19,8	25,9	33,2	
	DM1-TCTH	9	22,5	2,2	19,9	21,6	25,7	

Legenda: desvio padrão (DP); transplante de células tronco-hematopoiéticas (TCTH).

Os grupos também foram homogêneos quanto à proporção entre homens e mulheres (tabela 2). A maioria dos participantes era do gênero masculino e completou até o 2º grau do ensino médio. Não houve diferença do consumo de bebida alcoólica entre os grupos sendo que grande parte dos voluntários consome algum tipo de bebida alcoólica semanalmente. Nos grupos controle e DM1-TCTH, mais de 50% dos participantes fazem atividade física regularmente e no grupo DM1 mais da metade não pratica nenhum tipo de atividade física ($p < 0,05$). O tipo de atividade física mais realizada nos três grupos foram a caminhada e a musculação.

O uso de medicamentos além da insulina exógena não foi usual entre os participantes do estudo (apêndice 3). Uma pequena porcentagem dos voluntários dos grupos avaliados relatou o uso de medicamentos tais como inibidores de bomba de prótons, antagonista dos receptores da angiotensina (ARAs), estatina, cloridrato de nortriptilina, entre outros (apêndice 3). Além disso, a maioria dos indivíduos do grupo DM1-TCTH ($n=6$; 67%) fazem uso de anti-diabético oral além da insulino terapia (sitagliptina).

Tabela 2. Frequência absoluta e relativa das variáveis qualitativas do estudo por grupo e os respectivos resultados do teste Exato de Fisher.

Variáveis	Controle		DM1		DM1-TCTH		p-valor
	n	%	n	%	n	%	
Gênero							
Feminino	11	45,8	10	43,5	4	44,4	1,0
Masculino	13	54,2	13	56,5	5	55,6	
Escolaridade							
Nenhuma	0	0	2	8,7	0	0	0,32
1º grau	0	0	1	4,35	1	11,1	
2º grau	11	50	14	60,9	5	55,6	
Superior	11	50	6	26,1	3	33,3	
Consumo de Álcool							
Não	10	45,5	12	52,2	4	44,4	0,94
Sim	12	54,6	11	47,8	5	55,6	

Variáveis	Controle		DM1		DM1-TCTH		p-valor
	n	%	n	%	n	%	
Frequência							
(Consumo de Álcool)							
Raramente	1	4,55	0	0	1	11,1	0,42
Mensalmente	2	9,09	5	21,7	0	0	
Semanalmente	9	40,9	6	26,1	4	44,4	
Atividade física							
Não	10	45,5	13	56,5	0	0	0,009
Sim	12	54,6	10	43,5	9	100	
Frequência semanal							
(Atividade física)							
2	3	13,6	2	8,7	1	11,1	0,03
3	1	4,55	2	8,7	2	22,2	
4	5	22,7	4	17,4	2	22,2	
5	1	4,55	2	8,7	2	22,2	
6	2	9,09	0	0	0	0	
7	0	0	0	0	2	22,2	
Fraturas não-osteoporóticas*							
Não	19	86,4	11	47,8	7	77,8	0,02
Sim	3	13,6	12	52,2	2	22,2	
Medicamento em uso**							
Não	18	75	11	47,8	3	33,3	0,049
Sim	6	25	12	52,2	6	66,7	
Total	24		23		9		

*informação obtida a partir de relato de próprio voluntário. ** com exceção da insulina e anti-diabéticos oral.
 Legenda: transplante de células tronco-hematopoiéticas (TCTH).

O total de unidades de insulina (UI/kg de peso corporal/dia) utilizada pelo grupo DM1 em insulino-terapia convencional foi significativamente maior (Δ dose de insulina entre grupos: 0,52 UI/kg de peso/dia) quando se comparou com o grupo DM1-TCTH ($p < 0,0001$, tabela 3).

Tabela 3. Descrição do total de insulina corrigido pelo quilo de peso corporal (UI/Kg de peso/dia) entre os grupos e tempos pré-TCTH, 1 ano após TCTH e atual.

Grupo	Tempo	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
DM1	Dose de insulina atual	23	0,80	0,2	0,38	0,8	1,18
DM1-TCTH	Pré-TCTH	9	0,37	0,1	0,21	0,36	0,56
	1 ano pós-TCTH	9	0,10	0,2	0	0	0,45
	Dose de insulina atual	9	0,27	0,3	0	0,23	0,84

Legenda: desvio padrão (DP); transplante de células tronco-hematopoiéticas (TCTH).

O tempo sem insulino-terapia após TCTH variou de 0,7 a 5,5 anos ($2,0 \pm 1,3$ anos). Após 1 ano do TCTH, os indivíduos diabéticos tipo 1 transplantados apresentaram redução significativa no uso de insulina (Δ dose de insulina 1 ano após TCTH: 0,27 UI/Kg de peso/dia; $p = 0,003$). No entanto, observou-se que a dose de insulina no momento da coleta foi maior (Δ dose de insulina: 0,17 UI/Kg de peso/dia; $p = 0,04$) que a dose utilizada por estes indivíduos após 1 ano de transplante. Não houve diferença entre a quantidade de insulina usada no pré-TCTH ($0,37 \pm 0,1$ UI/Kg de peso/dia) e no momento da coleta do estudo (atual: $0,27 \pm 0,3$ UI/Kg de peso/dia) ($p = 0,21$; tabela 4).

Tabela 4. Comparação da dose de insulina entre os tempos pré-TCTH, 1 ano após TCTH e atual no grupo DM1-TCTH.

Comparação		Diferença	EP	IC(95%)		p-valor
Pré-TCTH	- 1 ano pós-TCTH	0,27	0,08	0,11	0,43	0,003
Pré-TCTH	- Atual	0,10	0,08	-0,06	0,26	0,21
1 ano pós-TCTH	- Atual	-0,17	0,08	-0,33	-0,01	0,04

Legenda: erro padrão (EP); intervalo de confiança (IC); transplante de células tronco-hematopoiéticas (TCTH).

A descrição e comparação das dosagens bioquímicas, hormonais, de marcadores ósseos e do tecido adiposo entre os grupos avaliados estão expostas nas tabelas 5 a 7. A glicemia de jejum e os valores séricos de HbA1c foram significativamente maiores nos indivíduos diabéticos tipo 1 com insulino-terapia convencional quando comparado com os

indivíduos normoglicêmicos e também com os diabéticos tipo 1 que foram submetidos ao TCTH (ex.: HbA1c: Controle = $5,3 \pm 0,3$; DM1 = $9,6 \pm 2,3$; DM1-TCTH = $6,3 \pm 0,7$; $p < 0,0001$; tabela 5; figura 3). A Associação Americana de Diabetes (ADA) sugere como meta para indivíduos diabéticos manter os valores de HbA1c abaixo de 7% (GIUGLIANO *et al.*, 2016), o que foi observado na maioria do grupo DM1-TCTH (78%), que apresentou melhor controle glicêmico comparado com os indivíduos do grupo DM1 (4%).

Foi observado que os valores de albumina sérica foram significativamente menores no grupo DM1 em relação aos demais grupos ($p=0,003$) e o cálcio corrigido apresentou valores menores nos indivíduos do grupo DM1-TCTH comparado com os outros grupos ($p=0,03$). A fosfatase alcalina foi significativamente maior no grupo DM1 ($p=0,004$; tabela 5 e figura 3). Não foi observada diferença entre os grupos nos valores séricos de creatinina, AST, ALT, fósforo inorgânico, colesterol, triglicérides, HDL-colesterol e LDL-colesterol ($p > 0,05$) (tabela 5).

Verificou-se que o colesterol estava acima de 200 mg/dL para 29% ($n=7$) do grupo Controle, 30% ($n=7$) do grupo DM1 e 22% ($n=2$) do grupo DM1-TCTH. A porcentagem de indivíduos com triglicérides acima de 150 mg/dL foi próxima (13%; $n=3$) nos grupos Controle e DM1. O LDL-colesterol mostrou-se acima de 100 mg/dL em 17% ($n=4$) do grupo Controle, 30% ($n=7$) do grupo DM1 e 22% ($n=2$) do grupo DM1-TCTH. O HDL-colesterol encontrou-se < 40 mg/dL em 29% ($n=7$) do grupo Controle e em 26% ($n=6$) do grupo DM1.

O IGF-1 encontrou-se menor no grupo DM1 que nos outros grupos ($p=0,03$). Ainda, as concentrações de 25(OH) D foram maiores no grupo DM1-TCTH comparado com os grupos controle e DM1 ($p=0,002$; tabela 6 e figura 4). Foi observado que 21% ($n=5$) do grupo controle e 26% ($n=6$) do grupo DM1 apresentaram valores de 25(OH) D abaixo 20 ng/mL, o que indica a presença de deficiência de vitamina D nestes indivíduos (ROSS *et al.*, 2011).

Os três grupos apresentaram valores séricos de PTH e OC total semelhantes. Porém, o grupo com DM1 em insulino terapia convencional apresentou tendência em ter CTx sérico menor que o grupo controle ($p=0,053$; tabela 6 e figura 4). Não houve diferença nos valores de D-OC entre os grupos avaliados ($p > 0,05$). Da mesma forma, as taxas circulantes de leptina e adiponectina foram semelhantes nos três grupos ($p > 0,05$; tabela 7 e figura 5).

Tabela 5. Descrição e comparação das dosagens bioquímicas entre os grupos Controle, DM1 e DM1-TCTH.

Variáveis	Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
Glicemia de jejum (mg/dL)	Controle	24	87,3	6,9	76	86,5	105	<0,0001
	DM1	23	217,2 [#]	108,2	46	219	480	
	DM1-TCTH	9	107,6 [^]	22,6	70	107	157	
Hemoglobina glicada (HbA1c) (%)	Controle	24	5,3	0,3	4,6	5,3	5,8	<0,0001
	DM1	23	9,6 [#]	2,3	6,6	9,4	16,1	
	DM1-TCTH	9	6,3 [^]	0,7	5,4	6,3	7,6	
Creatinina (mg/dL)	Controle	24	0,96	0,21	0,69	0,93	1,47	0,35
	DM1	23	0,92	0,14	0,68	0,96	1,15	
	DM1-TCTH	9	0,86	0,15	0,67	0,86	1,10	
Aspartato Aminotransferase (AST) (U/L)	Controle	24	22,2	5,8	12,0	21,8	35	0,06
	DM1	23	17,7	6,8	10,7	15,3	39	
	DM1-TCTH	9	19,34	6,69	10,7	18,3	33	
Alanina Aminotransferase (ALT) (U/L)	Controle	24	24,7	13,2	12,8	21,4	56,3	0,43
	DM1	23	19,5	14,5	7,8	15,5	79,1	
	DM1-TCTH	9	22,5	12,2	10,7	19,3	49,9	

Variáveis	Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
Albumina (g/dL)	Controle	24	4,5	0,2	4,1	4,5	4,9	0,003
	DM1	23	4,3 [#] ^	0,2	4,0	4,3	4,7	
	DM1-TCTH	9	4,5	0,2	4,2	4,6	4,7	
Cálcio total (mg/dL)	Controle	24	10,1	0,5	9,0	10,1	11,0	0,13
	DM1	23	9,9	0,5	8,7	9,9	10,8	
	DM1-TCTH	9	9,7	0,5	9,0	9,7	10,4	
Cálcio corrigido (mg/dL)	Controle	24	9,7	0,4	8,9	9,7	10,4	0,03
	DM1	23	9,7	0,4	8,7	9,7	10,4	
	DM1-TCTH	9	9,3 [§] ^	0,4	8,6	9,2	10,0	
Fósforo inorgânico (mg/L)	Controle	24	3,4	0,5	2,3	3,4	4,4	0,10
	DM1	23	3,7	0,7	2,5	3,8	4,7	
	DM1-TCTH	9	3,8	0,6	2,8	3,8	4,8	
Fosfatase alcalina (U/L)	Controle	24	154,5	42,5	91	153	253	0,004
	DM1	23	214,3 [#]	82,2	97	191	467	
	DM1-TCTH	9	160 [^]	34,5	115	165	205	

Variáveis	Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
Colesterol (mg/dL)	Controle	24	189,1	27,6	143	192	247	0,39
	DM1	23	180	35,4	124	173	267	
	DM1-TCTH	9	173,7	28,2	135	168	224	
Triglicérides (mg/dL)	Controle	24	95	57,2	38	80	275	0,17
	DM1	23	85,9	43,6	41	68	203	
	DM1-TCTH	9	59,4	17,3	42	54	98	
HDL-colesterol (mg/dL)	Controle	24	48,2	10,3	30	48	71	0,52
	DM1	23	50,5	17,5	18	47	86	
	DM1-TCTH	9	54,2	7,7	42	56	64,6	
LDL-colesterol (mg/dL)	Controle	24	121,9	22,0	87	119	162	0,21
	DM1	23	112,3	25,2	72	113	161	
	DM1-TCTH	9	107,6	22,6	81	105	148	

[#]diferença estatística entre o grupo DM1 e o grupo Controle;

[§]diferença estatística entre o grupo DM1-TCTH e o grupo Controle.

[^]diferença estatística entre o grupo DM1 e o grupo DM1-TCTH.

* Legenda: desvio padrão (DP); transplante de células tronco-hematopoiéticas (TCTH).

Tabela 6. Descrição e comparação das dosagens séricas relacionadas ao metabolismo ósseo entre os grupos Controle, DM1 e DM1-TCTH.

Variáveis	Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
PTH (pg/mL)	Controle	24	34,4	15,4	12	31,65	72	0,47
	DM1	23	29,5	19,9	3	25	95,1	
	DM1-TCTH	9	37,6	21,7	23,6	28,4	91	
IGF-1 (ng/mL)	Controle	24	243,4	100,4	69,5	232,5	450	0,03
	DM1	23	191,2 [#]	71,1	79	186	328	
	DM1-TCTH	9	269,3 [^]	48,9	191	271	375	
25(OH) D (ng/mL)	Controle	24	26,4	9,2	12,2	24,7	49,0	0,002
	DM1	23	24,9	7,3	12,3	26,1	39,1	
	DM1-TCTH	9	38,3 ^{§ ^}	13,3	24,5	37,6	66,1	
Osteocalcina total (OC) (ng/mL)	Controle	24	11,09	5,11	2,21	11,37	25,71	0,31
	DM1	23	10,81	4,56	2,38	10,68	22,58	
	DM1-TCTH	9	13,54	2,95	9,4	12,93	19,62	
Telopeptídeo carboxi-terminal do colágeno tipo I (CTx) (ng/mL)	Controle	24	0,46	0,16	0,14	0,47	0,8	0,053
	DM1	23	0,35	0,2	0,12	0,3	0,98	
	DM1-TCTH	9	0,49	0,18	0,3	0,52	0,8	

[#]diferença estatística entre o grupo DM1 e o grupo Controle.

[§]diferença estatística entre o grupo DM1-TCTH e o grupo Controle.

[^]diferença estatística entre o grupo DM1 e o grupo DM1-TCTH.

* Legenda: desvio padrão (DP); transplante de células tronco-hematopoiéticas (TCTH).

Tabela 7. Descrição e comparação de marcadores ósseo e do tecido adiposo entre os grupos Controle, DM1 e DM1-TCTH.

Variáveis	Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
Osteocalcina parcialmente descarboxilada (D-OC) (ng/mL)	Controle	24	7,1	4,48	0,8	7,1	16	0,52
	DM1	23	5,61	4,13	1,5	4,7	16	
	DM1-TCTH	9	6,64	4,96	1,4	5,4	16	
Adiponectina (µg/mL)	Controle	24	9,3	5,7	3,4	7,2	28,3	0,38
	DM1	23	14,9	15,6	2,6	9,3	63,7	
	DM1-TCTH	9	9,5	4,3	5,9	9,2	19,1	
Leptina (ng/mL)	Controle	24	7,8	7,7	1,9	3,5	23,9	0,21
	DM1	23	12,8	11,3	1,1	8,4	44	
	DM1-TCTH	9	17,3	17,6	2,4	8,6	63,4	

[#]diferença estatística entre o grupo DM1 e o grupo Controle.

[§]diferença estatística entre o grupo DM1-TCTH e o grupo Controle.

[^]diferença estatística entre o grupo DM1 e o grupo DM1-TCTH.

* Legenda: desvio padrão (DP); transplante de células tronco-hematopoiéticas (TCTH).

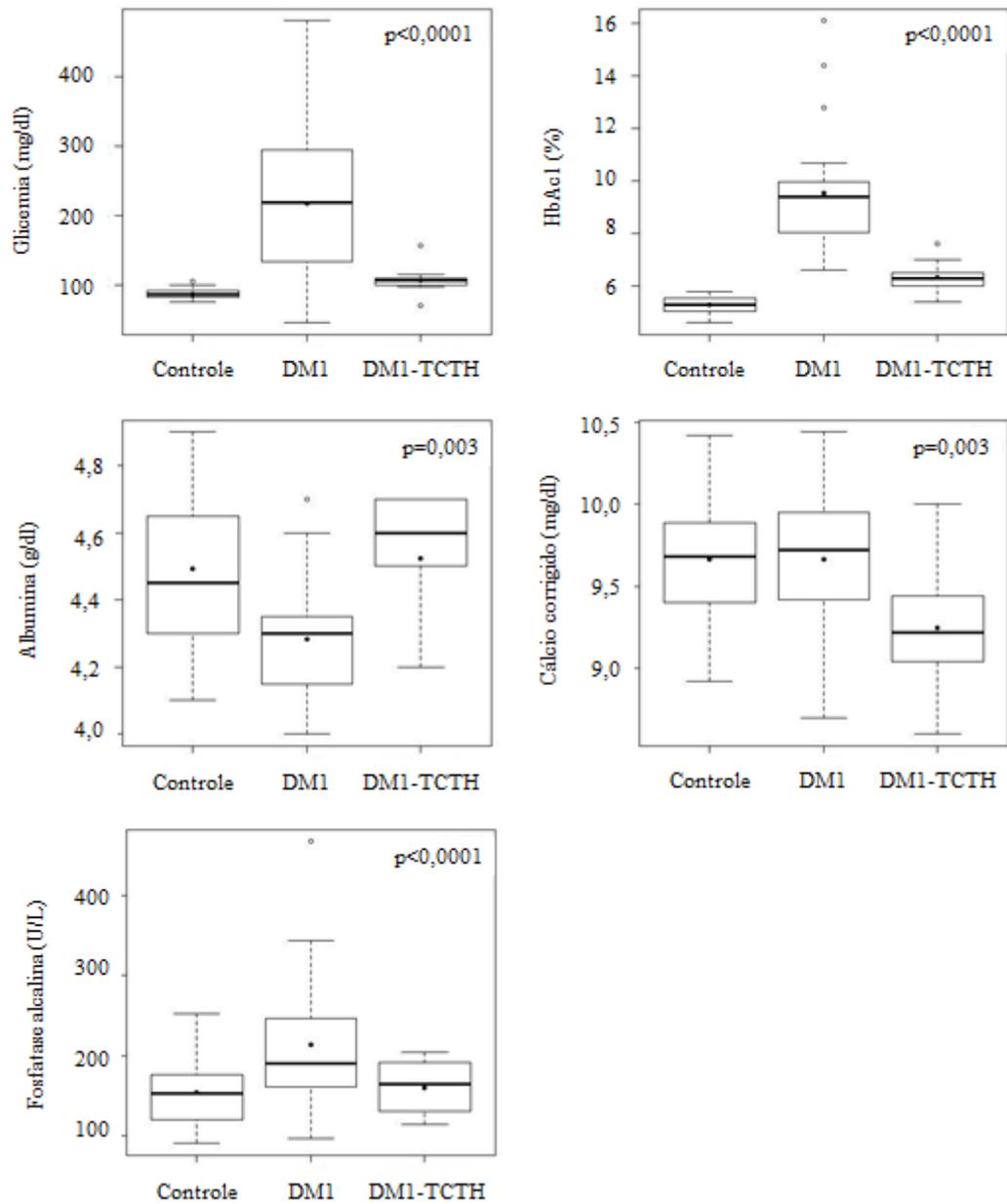


Figura 3. Gráficos tipo box plot das dosagens de glicemia, HbA1c, albumina, cálcio corrigido e fosfatase alcalina nos grupos Controle, DM1 e DM1-TCTH.

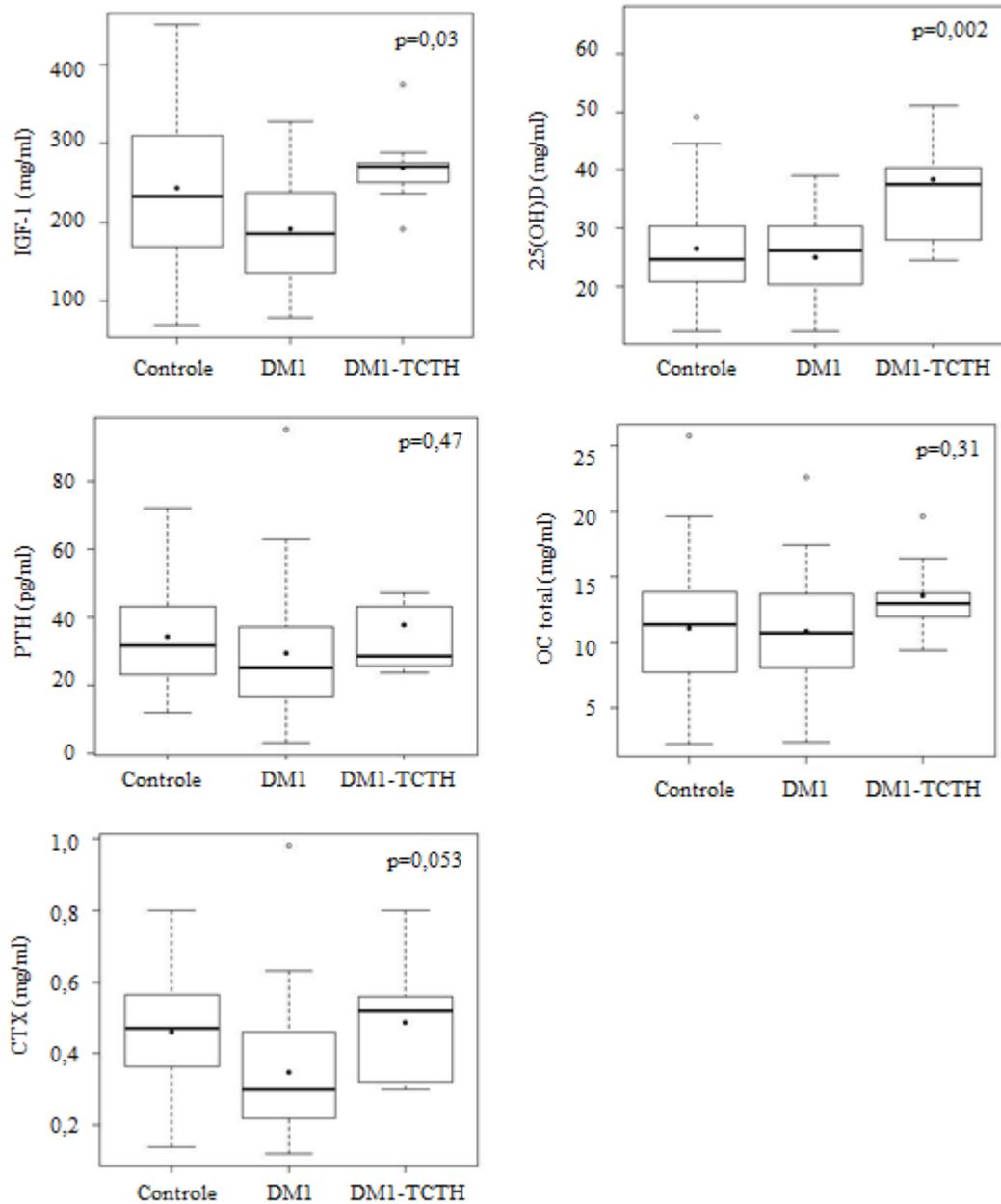


Figura 4. Gráficos tipo box plot das dosagens séricas relacionadas ao metabolismo ósseo e dos marcadores da remodelação óssea nos grupos Controle, DM1 e DM1-TCTH.

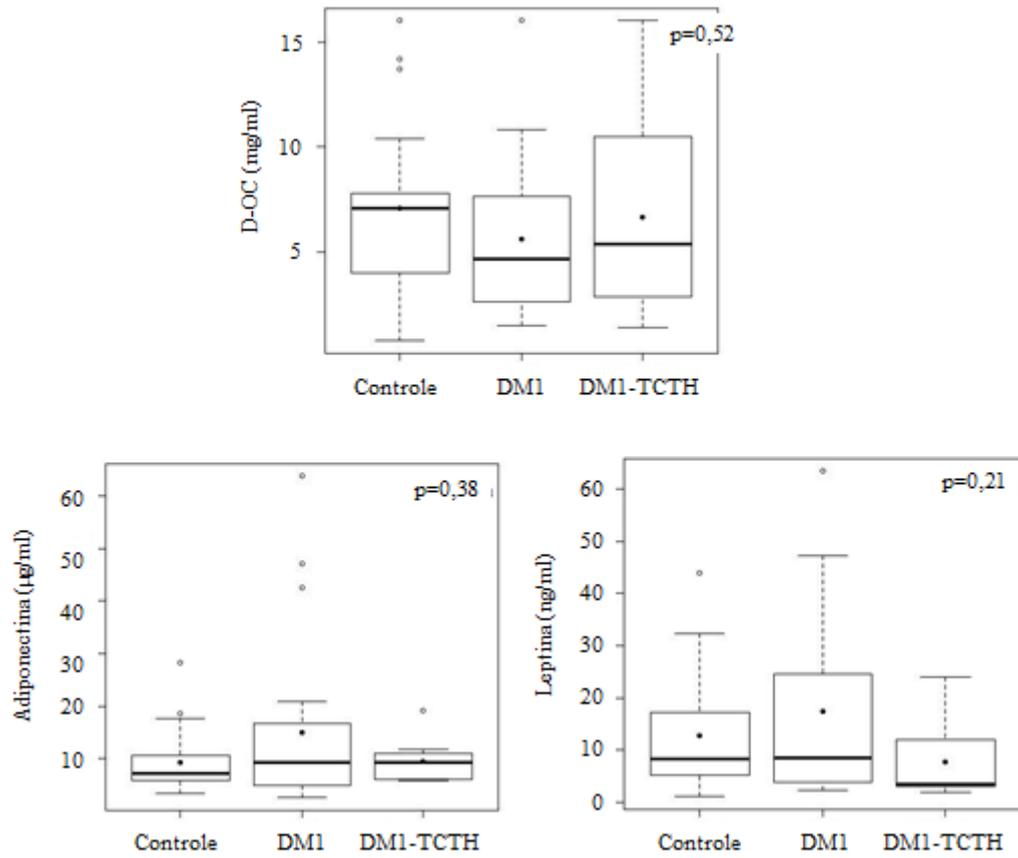


Figura 5. Gráficos tipo box plot dos marcadores do tecido ósseo e do tecido adiposo nos grupos Controle, DM1 e DM1-TCTH.

Os dados de DMO e de composição corporal obtidos pelo DXA estão expostos nas tabelas 8 e 9, respectivamente. Com relação à avaliação óssea, não foi encontrada diferença entre os grupos dos valores absolutos de DMO e dos valores de Z-score ou T-score dos sítios ósseos avaliados, sendo que, em média, estes indivíduos apresentaram massa óssea adequada para idade e gênero (tabela 8 e figura 6). O conteúdo mineral ósseo também foi semelhante quando se compararam os três grupos estudados (tabela 8). Observou-se que a frequência de alteração óssea (Z-score ≤ 2 ou T-score entre -1,0 e -2,5 ou T-score $\leq -2,5$) foi de 12,5% (n=3) dos indivíduos normoglicêmicos (grupo Controle), 26% (n=6) dos indivíduos com DM1 e 11% (n=1) dos indivíduos diabéticos submetidos ao TCTH. Dentre os indivíduos do grupo DM1 que apresentaram redução da massa óssea, dois tinham idade superior a 60 anos.

Sobre a composição corporal, foi encontrado que a massa de gordura e a massa muscular do corpo total (em Kg) foram semelhantes entre os grupos avaliados ($p > 0,05$). Também não foi observada diferença na quantidade de gordura situada nas regiões androide e ginoide ($p > 0,05$). Os membros superiores (braços) e os membros inferiores (pernas) também apresentaram quantidade de gordura e massa muscular similar ($p > 0,05$; tabela 9).

Tabela 8. Descrição e comparação da densidade mineral óssea (DMO) do quadril total, colo do fêmur, coluna lombar, 1/3 do rádio e do corpo total entre os grupos Controle, DM1 e DM1-TCTH.

Variáveis	Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
DMO do quadril total (g/cm ²)	Controle	24	0,995	0,160	0,724	0,976	1,355	0,99
	DM1	23	0,996	0,175	0,677	0,974	1,303	
	DM1-TCTH	9	1,002	0,108	0,851	0,962	1,184	
T-score do quadril total	Controle	24	0,03	1,09	-1,8	0,0	2,1	0,93
	DM1	23	-0,07	1,10	-2,3	0,1	1,8	
	DM1-TCTH	9	0,07	0,70	-0,7	-0,2	1,3	
Z-score do quadril total	Controle	24	0,11	1,02	-1,8	0,0	2,2	0,99
	DM1	23	0,13	1,01	-2,2	0,2	1,8	
	DM1-TCTH	9	0,09	0,74	-0,7	-0,2	1,3	
DMO do colo do fêmur (g/cm ²)	Controle	24	0,881	0,194	0,531	0,880	1,290	0,98
	DM1	23	0,872	0,166	0,644	0,876	1,249	
	DM1-TCTH	9	0,883	0,09	0,682	0,896	0,986	
T-score do colo do fêmur	Controle	24	-0,12	1,48	-2,9	-0,1	2,6	0,91
	DM1	23	-0,26	1,21	-2,1	-0,4	2,3	
	DM1-TCTH	9	-0,09	0,73	-1,5	-0,1	1,2	

Variáveis	Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
Z-score do colo do fêmur	Controle	24	0,08	1,34	-2,9	-0,05	2,7	0,98
	DM1	23	0,06	1,09	-2,0	0,3	2,4	
	DM1-TCTH	9	-0,02	0,71	-1,4	0,1	1,2	
DMO da coluna lombar (L1-L4) (g/cm ²)	Controle	24	0,995	0,138	0,8	0,961	1,280	0,85
	DM1	23	0,977	0,132	0,762	0,979	1,183	
	DM1-TCTH	9	0,971	0,115	0,774	0,971	1,194	
T-score da coluna lombar (L1-L4)	Controle	24	-0,60	1,23	-2,4	-1,0	1,9	0,61
	DM1	23	-0,93	1,18	-3,2	-0,7	0,8	
	DM1-TCTH	9	-0,92	1,08	-2,9	-0,7	0,9	
Z-score da coluna lombar (L1-L4)	Controle	24	-0,50	1,17	-2,3	-0,85	1,9	0,76
	DM1	23	-0,68	1,27	-3,2	-0,4	1,5	
	DM1-TCTH	9	-0,83	1,11	-2,9	-0,6	1,0	
DMO da vertebra L3 (g/cm ²)	Controle	24	1,020	0,146	0,824	0,968	1,303	0,79
	DM1	23	0,994	0,140	0,771	0,969	1,222	
	DM1-TCTH	9	0,995	0,129	0,792	0,976	1,259	
T-score da vertebra L3	Controle	24	-0,60	1,31	-2,5	-1,1	2,0	0,61
	DM1	23	-0,95	1,26	-3,4	-1,1	1,1	
	DM1-TCTH	9	-0,92	1,16	-2,8	-1,2	1,4	

Variáveis	Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
Z-score da vertebra L3	Controle	24	-0,49	1,22	-2,0	-0,9	2,1	0,74
	DM1	23	-0,70	1,33	-3,4	-0,6	1,8	
	DM1-TCTH	9	-0,83	1,16	-2,8	-1,1	1,4	
DMO do 1/3 rádio (g/cm ²)	Controle	24	0,725	0,077	0,617	0,706	0,874	0,97
	DM1	23	0,720	0,108	0,500	0,706	0,978	
	DM1-TCTH	9	0,728	0,085	0,627	0,681	0,869	
T-score do 1/3 rádio	Controle	24	-0,50	0,75	-2,2	-0,3	1,1	0,86
	DM1	23	-0,68	1,49	-4,2	-0,4	3,0	
	DM1-TCTH	9	-0,60	1,04	-2,6	-0,5	1,0	
Z-score do 1/3 rádio	Controle	24	-0,37	0,86	-2,4	-0,15	1,1	0,89
	DM1	23	-0,34	1,43	-4,2	-0,4	3,1	
	DM1-TCTH	9	-0,54	1,06	-2,6	-0,5	1,0	
Conteúdo Mineral Ósseo Corpo total (g)	Controle	24	2228	479	1394	2213	3184	0,37
	DM1	23	2378	438	1802	2352	3145	
	DM1-TCTH	9	2459	478	1729	2529	3189	

Variáveis	Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
DMO do corpo total (g/cm ²)	Controle	24	1,165	0,122	0,901	1,168	1,495	0,43
	DM1	23	1,206	0,135	1,009	1,173	1,487	
	DM1-TCTH	9	1,215	0,09	1,036	1,255	1,329	
T- ou Z-score do corpo total	Controle	24	-0,03	1,12	-2,3	-0,3	2,4	0,49
	DM1	23	0,28	1,21	-1,6	0,1	4,4	
	DM1-TCTH	9	0,43	0,7	-0,5	0,5	1,8	

* Legenda: desvio padrão (DP); transplante de células tronco-hematopoiéticas (TCTH).

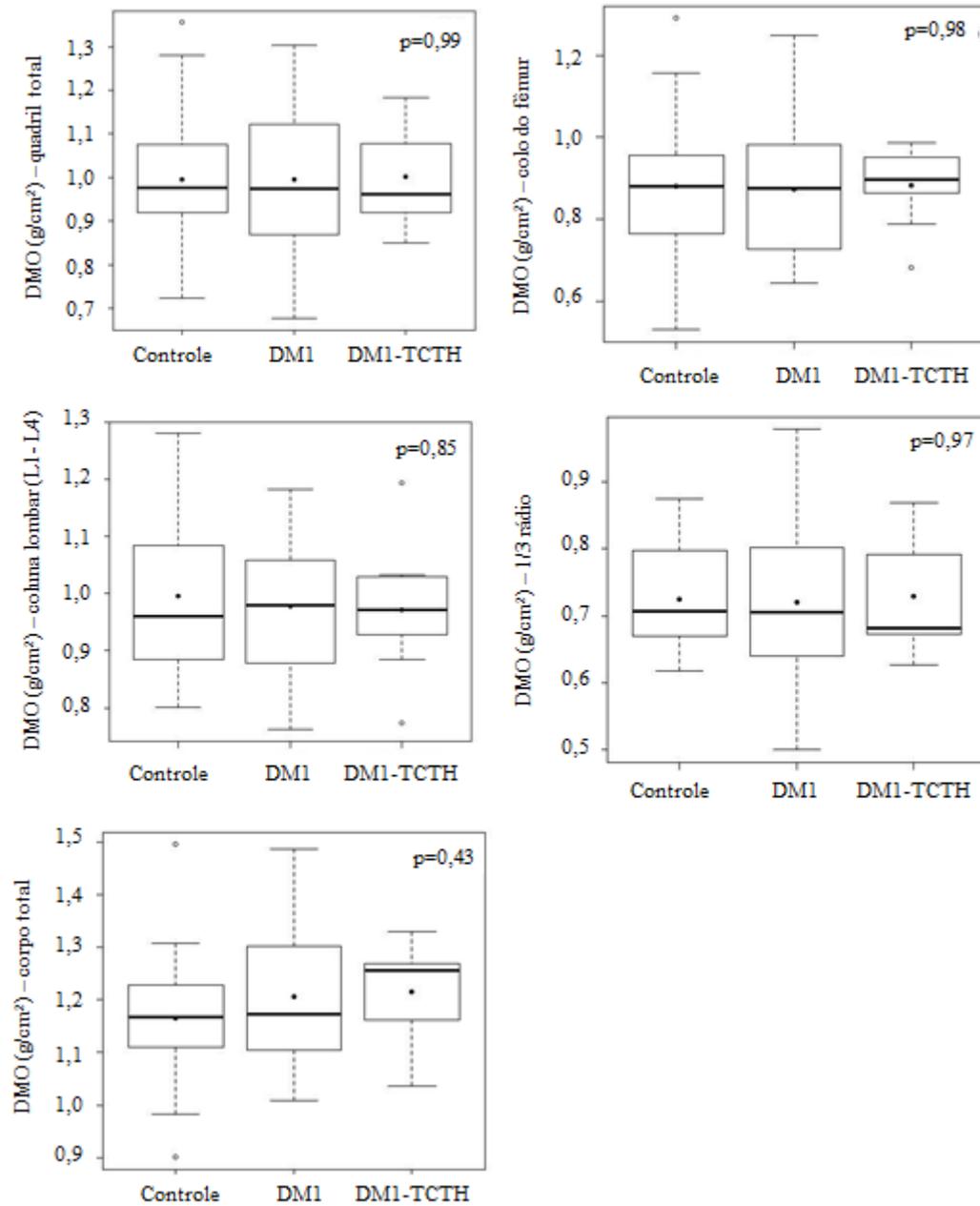


Figura 6. Gráficos tipo box plot sobre as medidas de DMO dos sítios ósseos avaliados nos grupos Controle, DM1 e DM1-TCTH.

Tabela 9. Descrição e comparação da composição corporal obtida pela técnica de DXA entre os grupos Controle, DM1 e DM1-TCTH.

Variáveis	Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
Massa de gordura (Kg) – Corpo Total	Controle	24	20,1	5,5	11,3	19,0	35,6	0,16
	DM1	23	22,4	8,4	10,3	22,0	40,4	
	DM1-TCTH	9	17,4	4,8	10,5	18,2	22,6	
Massa Muscular (Kg) – Corpo Total	Controle	24	43,9	12,0	25,3	43,0	66,1	0,71
	DM1	23	46,4	9,3	34,0	45,2	72,0	
	DM1-TCTH	9	45,3	8,8	35,1	45,8	61,0	
% Gordura corporal	Controle	24	31,0	7,6	16,9	30,0	46,5	0,38
	DM1	23	31,2	10,0	15,5	29,7	50,4	
	DM1-TCTH	9	26,7	6,7	20,3	22,1	35,6	
Massa de gordura (Kg) - região androide	Controle	24	1,54	0,65	0,63	1,59	3,33	0,19
	DM1	23	1,69	0,8	0,63	1,53	3,44	
	DM1-TCTH	9	1,20	0,31	0,58	1,21	1,58	

Variáveis	Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
Massa de gordura (kg) - região ginoide	Controle	24	3,71	0,99	1,92	3,69	5,99	0,29
	DM1	23	4,07	1,61	1,77	3,88	7,38	
	DM1-TCTH	9	3,29	1,11	2,13	2,8	4,52	
Taxa da Massa de Gordura Androide/Ginoide	Controle	24	0,95	0,22	0,59	0,97	1,32	0,70
	DM1	23	0,90	0,16	0,55	0,88	1,27	
	DM1-TCTH	9	0,91	0,19	0,62	0,89	1,20	
Massa de gordura (Kg) – Braços	Controle	24	2,08	0,83	1,08	1,86	4,54	0,23
	DM1	23	2,37	0,96	1,09	2,35	4,74	
	DM1-TCTH	9	1,81	0,65	0,89	1,73	2,77	
Massa Muscular (Kg) – Braços	Controle	24	4,69	2,03	2,13	4,61	7,86	0,88
	DM1	23	4,97	1,87	2,46	4,88	9,52	
	DM1-TCTH	9	4,91	1,94	2,87	4,84	8,20	
Massa de gordura (Kg) – Pernas	Controle	24	7,61	1,95	4,68	7,29	11,42	0,13
	DM1	23	8,85	3,68	3,86	8,50	18,89	
	DM1-TCTH	9	6,74	2,26	3,95	6,06	9,69	

Variáveis	Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
Massa Muscular (Kg) – Pernas	Controle	24	14,34	4,25	6,92	14,8	21,22	0,54
	DM1	23	15,47	3,49	10,12	15,07	24,54	
	DM1-TCTH	9	15,46	2,78	12,39	15,26	20,41	

* Legenda: desvio padrão (DP); transplante de células tronco-hematopoiéticas (TCTH).

A frequência de indivíduos com IMG normal ou em excesso foi próxima entre os grupos controle e DM1. O grupo DM1 em insulinoterapia convencional mostrou maior número de indivíduos com obesidade grau I. Já o grupo DM1-TCTH foi o que apresentou menor frequência de excesso de gordura corporal. Com relação ao IMMA, a maioria do grupo DM1 em insulinoterapia convencional apresentou massa muscular apendicular (MMA) acima do esperado para o gênero (tabela 10).

Tabela 10. Frequência absoluta e relativa dos índices para avaliação da composição corporal pela DXA por grupos.

Índices para análise da composição corporal	Controle (n=24)		DM1 (n=23)		DM1-TCTH (n=9)	
	n	%	n	%	n	%
IMG (kg de massa de gordura/m²)*						
Deficiência leve (Homen:2,3-2,99/Mulher:4-4,49)	0	0	0	0	1	11
Normal (Homem:3-6/Mulher:5-9)	12	50	11	48	7	78
Excesso (Homem:6,1-9/Mulher:9,1-13)	11	46	8	35	1	11
Obeso grau 1 (Homem:9,1-12/Mulher:13,1-17)	1	4	4	17	0	0
	24	100	23	100	9	100
IMMA (kg de massa muscular apendicular/m²)						
(≥50 anos: homem<7,26/mulher<5,45; <50 anos: homem<7,23/mulher<5,67)**						
MMA abaixo do esperado	14	58	8	35	5	56
MMA acima do esperado	10	42	15	65	4	44
	24	100	23	100	9	100

Legenda: transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH); Índice de Massa de Gordura (IMG); Índice de Massa Muscular Apendicular (IMMA). *KELLY; WILSON; HEYMSFIELD (2009). ** BAUMGARTNER et al. (1998).

Observou-se que o tecido adiposo subcutâneo (TAS) foi significativamente maior nos indivíduos com DM1 em insulinoterapia convencional comparado com os indivíduos do grupo DM1-TCTH ($p=0,04$). Ainda, verificou-se também que houve uma tendência dos indivíduos com DM1 apresentarem maior quantidade de TAS do que os indivíduos do grupo Controle ($p=0,06$). No entanto, não foi encontrada diferença na medida do tecido adiposo visceral (TAV) e também no teor de lipídios intra-hepático (LIH) entre os grupos avaliados ($p>0,05$; tabela 11 e figura 7). Os valores de LIH se encontraram abaixo 9% na maioria dos voluntários, sendo que somente dois indivíduos do grupo controle apresentaram $LIH > 9\%$.

Sobre a avaliação do tecido adiposo da medula óssea (TAMO), encontrou-se que a fração total do TAMO no corpo vertebral L3 foi semelhante entre os grupos avaliados ($p>0,05$). Também não foi encontrada diferença na composição do TAMO (fração de gordura saturada e insaturada) na vertebra L3 entre os grupos ($p>0,05$; tabela 11 e figura 8).

Tabela 11. Descrição e comparação das medidas do tecido adiposo da medula óssea (TAMO) do corpo vertebral L3, tecido adiposo subcutâneo (TAS), tecido adiposo visceral (TAV) e do teor de lipídio intra-hepático (LIH) entre os grupos.

Variáveis	Grupos	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo	p-valor
TAMO	- Controle	24	34,4	11,7	15,1	34,2	62,5	0,27
Fração total (vertebra L3) (%)	DM1	23	34,2	8,5	19,9	34,1	50,5	
	DM1-TCTH	9	40,3	8,5	23,1	41	51,6	
TAMO – Fração saturada (%)	Controle	24	21,5	8,4	8,9	22,2	41,3	0,27
	DM1	23	21,8	6,1	11,8	21,0	33,9	
	DM1-TCTH	9	25,9	5,4	14,1	25,8	31,9	
TAMO – Fração insaturada (%)	Controle	24	2,97	1,73	0,2	2,65	7,5	0,23
	DM1	23	2,3	0,84	0,8	2,1	4,2	
	DM1-TCTH	9	2,93	1,5	1,6	2,1	5,6	
TAS (mm ²)	Controle	24	16052	7273	7438	16070	33390	0,04
	DM1	23	21684	13309	3467	21646	55972	
	DM1-TCTH	9	12078 [#]	5219	5022	11431	20797	
TAV (mm ²)	Controle	24	4653	4550	233	3308	16213	0,44
	DM1	23	3867	3508	261	2812	12863	
	DM1-TCTH	9	2754	1700	772	2648	5902	
Taxa TAV/TAS	Controle	24	0,27	0,25	0,03	0,2	1,04	0,45
	DM1	23	0,20	0,14	0,04	0,21	0,54	
	DM1-TCTH	9	0,25	0,18	0,08	0,16	0,60	
LIH (%)	Controle	24	3,0	4,8	0,1	1,4	22,6	0,15
	DM1	23	1,4	0,7	0,7	1,1	3,4	
	DM1-TCTH	9	1,1	0,6	0,7	0,9	2,8	

[#]diferença estatística entre o grupo DM1 e o grupo DM1-TCTH.

*Legenda: desvio padrão (DP); transplante de células tronco-hematopoiéticas (TCTH); tecido adiposo da medula óssea (TAMO); tecido adiposo subcutâneo (TAS); tecido adiposo visceral (TAV); lipídeo intra-hepático (LIH).

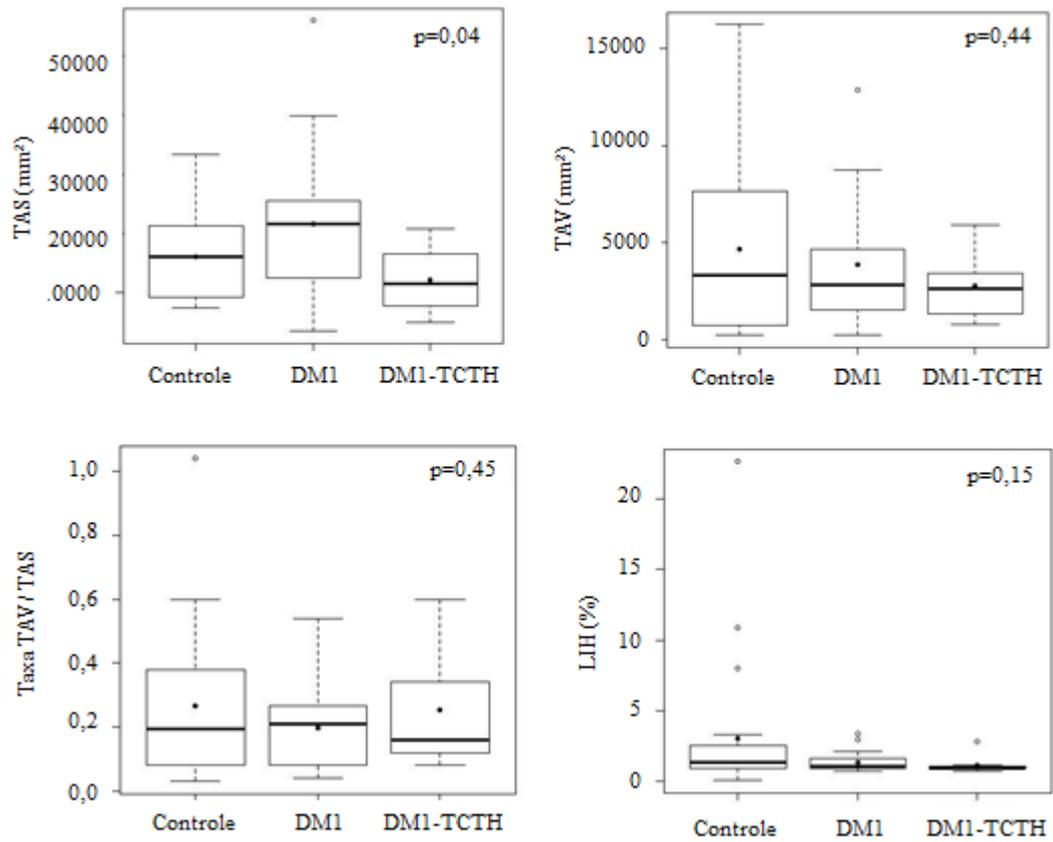


Figura 7. Gráficos tipo box plot sobre a quantificação do tecido adiposo da região abdominal (TAS e TAV) e do teor de lipídio intra-hepático (LIH) nos grupos Controle, DM1 e DM1-TCTH.

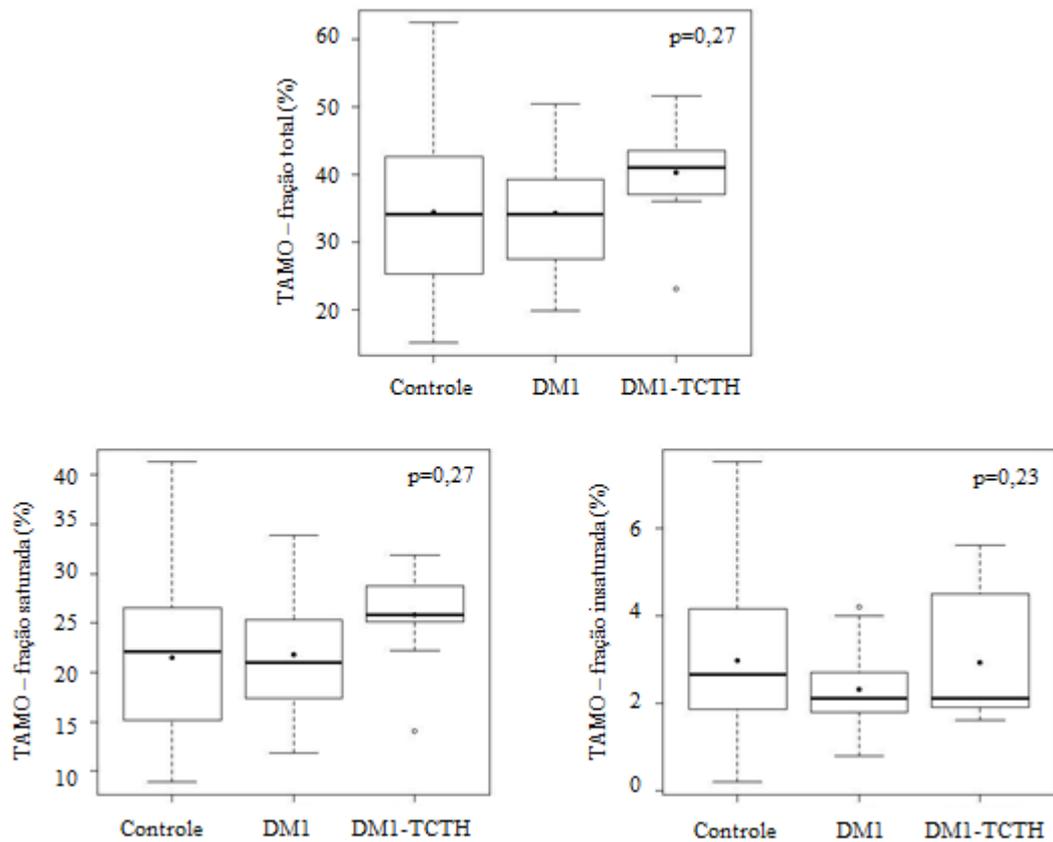


Figura 8. Gráficos tipo box plot sobre a tecido adiposo da medula óssea (TAMO) da vertebra L3 nos grupos Controle, DM1 e DM1-TCTH.

Na avaliação de morfometria da coluna vertebral, verificou-se que somente um voluntário do grupo DM1 em insulinoterapia convencional apresentou fratura visualizada no corpo vertebral L3. Não foi encontrada fratura vertebral no restante dos indivíduos avaliados (tabela 12).

Tabela 12. Frequência relativa e absoluta da ocorrência de fratura vertebral nos grupos estudados.

Grupos	Presença de Fratura Vertebral			
	Sim		Não	
	n	%	n	%
Controle	0	0%	24	100%
DM1	1	4,3%	22	95,6%
DM1-TCTH	0	0%	9	100%

*Legenda: transplante de células tronco-hematopoiéticas (TCTH).

A massa muscular se apresentou como um fator importante para massa óssea, apresentando uma associação positiva significativa com a DMO do quadril total ($0,010 \text{ g/cm}^2$), do colo do fêmur ($0,009 \text{ g/cm}^2$) e da coluna lombar (L1-L4) ($0,012 \text{ g/cm}^2$) ($p < 0,0001$; tabela 13). Foi observado que o teor de LIH teve uma influência negativa significativa sobre a DMO do quadril total ($-0,012 \text{ g/cm}^2$) e da coluna lombar ($-0,012 \text{ g/cm}^2$) ($p = 0,03$; tabela 13). Os modelos de regressão mostraram que a DMO do quadril total também foi influenciada por outros fatores tais como a idade ($-0,004 \text{ g/cm}^2$) e os valores de HbA1c ($-0,014 \text{ g/cm}^2$). Quando no mesmo modelo, estas variáveis explicam 53% das variações da DMO do quadril total (modelo 2; tabela 13). No entanto, verificou-se que o teor de LIH e a massa muscular foram responsáveis por 41% da variabilidade dos valores de DMO do quadril total (modelo 3; tabela 13; figura 9). Não foi observado nenhum efeito significativo do LIH sobre a DMO do colo do fêmur assim como não foi encontrada associação entre o TAV e a DMO (figura 10). No caso da DMO da coluna lombar, o gênero ($-0,162 \text{ g/cm}^2$) se apresentou como fator importante e os valores HbA1c ($-0,013 \text{ g/cm}^2$) tenderam a se associar negativamente com este sítio ósseo. O modelo de regressão mostrou que estas variáveis explicaram 29% da variabilidade dos valores de DMO da coluna lombar (modelo 2; tabela 13; figura 11).

O TAS mostrou ter associação positiva com a DMO do colo do fêmur ($0,000005 \text{ g/cm}^2$; $p = 0,02$) e da coluna (L1-L4) ($0,0000042 \text{ g/cm}^2$; $p = 0,053$; tabela 13). A DMO do colo do fêmur foi influenciada também pela idade ($-0,006 \text{ g/cm}^2$; $p = 0,0001$), sendo que junto com a massa muscular, explicou em 47% esta variável (modelo 2; tabela 13). A HbA1c ($-0,014 \text{ g/cm}^2$; $p = 0,13$) não apresentou uma associação significativa com a DMO do colo do fêmur (tabela 13).

Além disso, foi encontrado que o TAMO da vertebra L3 (-0,002 %) não apresentou efeito significativo sobre a DMO da coluna lombar ($p=0,16$) (apêndice 4). As concentrações séricas de adiponectina e de leptina também não apresentaram influência sobre a DMO ($p>0,05$; tabela 13 e apêndice 4).

Tabela 13. Regressão linear múltipla considerando como variável dependente/resposta as DMO do quadril total, colo do fêmur e da coluna lombar (L1-L4).

Variável dependente/resposta	Parâmetro	GL	Parâmetro	EP	Valor t	Valor p
Modelo 2	Intercepto	1	0,704	0,111	6,34	<0,0001
DMO quadril total (g/cm ²) R ² = 0,53	LIH (%)	1	-0,012	0,005	-2,35	0,02
	Massa muscular – corpo total (Kg)	1	0,013	0,003	4,54	<0,0001
	Idade (anos)	1	-0,004	0,001	-2,66	0,01
	HbA1c (%)	1	-0,014	0,006	-2,14	0,04
	Gênero (M=1 / F=0)	1	-0,066	0,055	-1,19	0,24
Modelo 3	Intercepto	1	0,565	0,075	7,54	<0,0001
DMO quadril total (g/cm ²) R ² = 0,41	LIH (%)	1	-0,012	0,005	-2,2	0,03
	Massa muscular – corpo total (Kg)	1	0,010	0,002	6,03	<0,0001
Modelo 1	Intercepto	1	0,692	0,154	4,51	<0,0001
DMO colo do fêmur (g/cm ²) R ² = 0,57	TAS (mm ²)	1	0,0000055	0,0000023	2,4	0,02
	TAV (mm ²)	1	-0,0000066	0,0000068	-0,97	0,34
	LIH (%)	1	-0,005	0,006	-0,8	0,43
	Adiponectina (µg/mL)	1	0,0003112	0,0022300	0,14	0,89
	Leptina (ng/mL)	1	-0,001	0,002	-0,73	0,47
	Massa muscular – corpo total (Kg)	1	0,015	0,004	3,89	0,0003
	Idade (anos)	1	-0,005	0,002	-2,26	0,03

	IMC (Kg/m ²)	1	-0,011	0,009	-1,18	0,25
	HbA1c (%)	1	-0,014	0,009	-1,56	0,13
	Gênero (M=1/F=0)	1	-0,087	0,073	-1,2	0,23
Modelo 2	Intercepto	1	0,678	0,089	7,62	<0,0001
DMO colo do fêmur (g/cm ²)	Massa muscular – corpo total (Kg)	1	0,009	0,002	5,3	<0,0001
R ² = 0,47	Idade (anos)	1	-0,006	0,001	-4,17	0,0001
Modelo 2	Intercepto	1	0,659	0,101	6,53	<0,0001
DMO coluna lombar (L1-L4) (g/cm ²)	LIH (%)	1	-0,012	0,005	-2,3	0,03
R ² = 0,29	Massa muscular – corpo total (Kg)	1	0,012	0,003	4,26	<0,0001
	HbA1c (%)	1	-0,013	0,007	-1,98	0,053
	Gênero (M=1 / F=0)	1	-0,162	0,055	-2,93	0,0051

Legenda: grau de liberdade (GL); erro padrão (EP); densidade mineral óssea (DMO); lipídio intra-hepático (LIH); hemoglobina glicada (HbA1c).

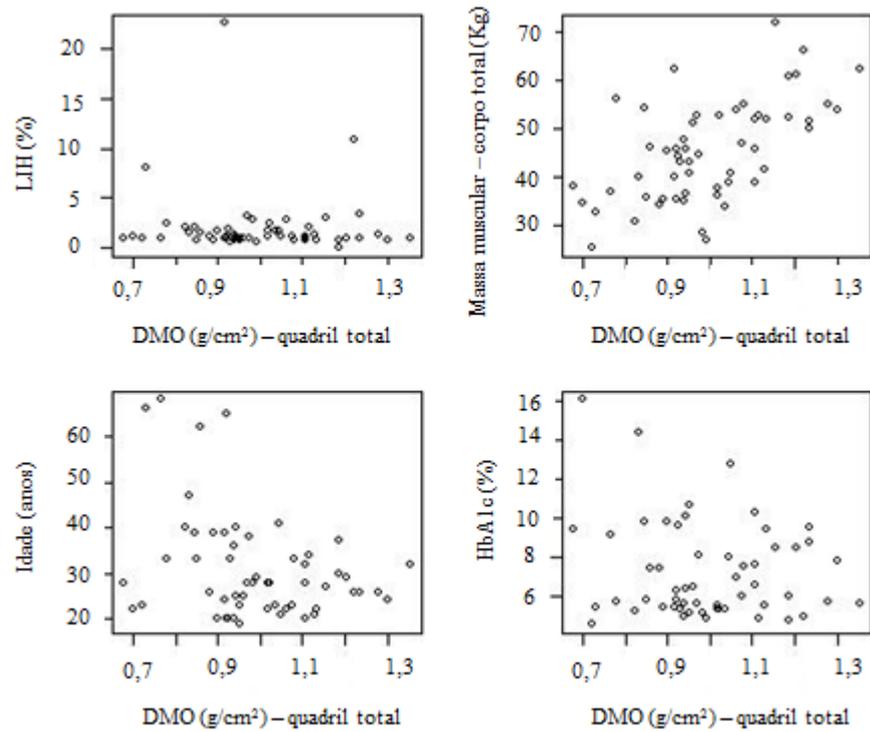


Figura 9. Gráficos da associação entre as variáveis independentes e a medida de DMO do quadril total.

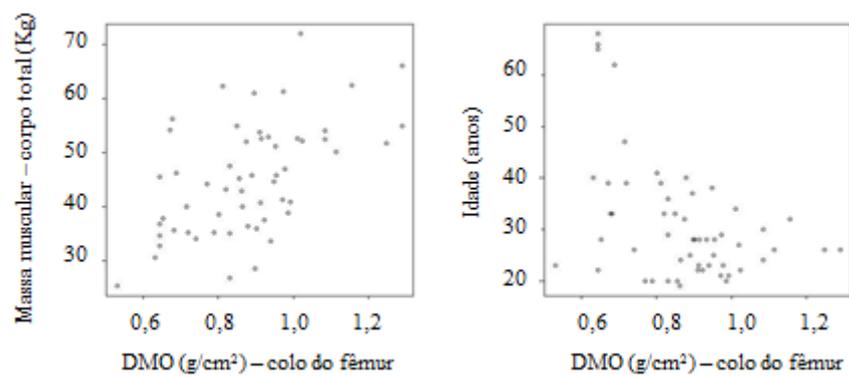


Figura 10. Gráficos da associação entre as variáveis independentes e a medida de DMO do colo do fêmur.

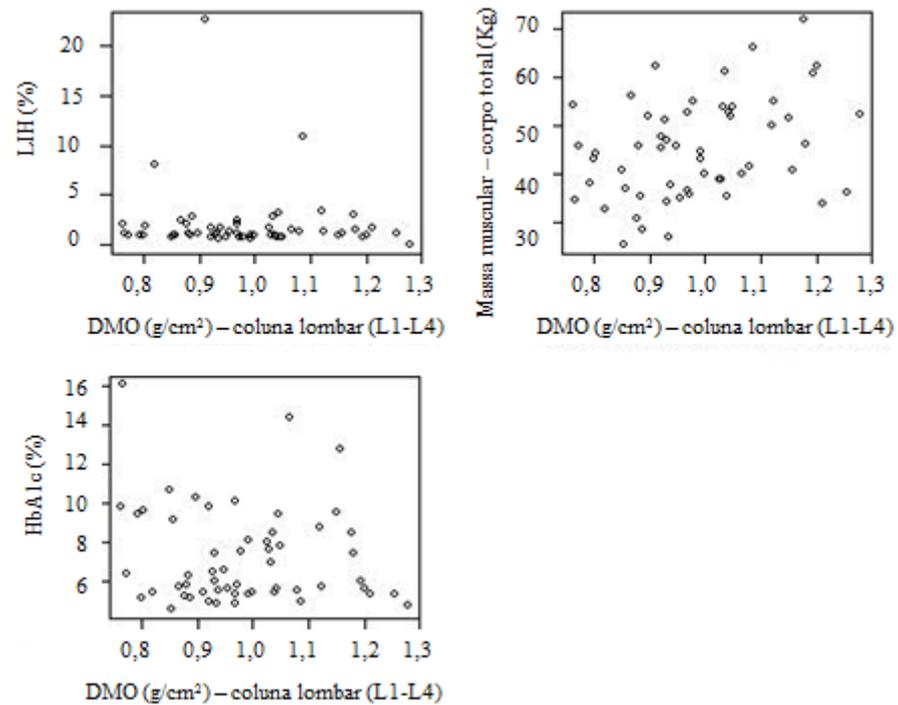


Figura 11. Gráficos da associação entre as variáveis independentes e a medida de DMO da coluna lombar (L1-L4).

Os valores de CTx ($r=0,53$) e de D-OC ($r=0,65$) se correlacionaram de forma mais evidente com o TAV somente no grupo DM1-TCTH (tabela 14). Foi encontrada uma correlação inversa entre os valores de HbA1c e os marcadores de formação e resorção óssea no grupo DM1 em insulino terapia convencional (OC total: $r=-0,48$; CTx: $r=-0,34$). Por outro lado, a D-OC correlacionou-se diretamente com HbA1c no grupo DM1 ($r=0,19$) e inversamente no grupo DM1-TCTH ($r=-0,27$), mas estas correlações se apresentaram fracas (tabela 14).

Os valores de OC total e CTx tiveram uma correlação mais evidente com os valores de IGF-1 nos dois grupos diabéticos. No entanto, esta correlação se apresentou diferente entre estes grupos, sendo positiva no grupo DM1 em insulino terapia convencional (OC total: $r=0,59$; CTx: $r=0,66$) e negativa no grupo DM1-TCTH (OC total: $r=-0,52$; CTx: $r=-0,75$). Observou-se também que OC total, D-OC e CTx se correlacionaram inversamente com os valores de adiponectina e leptina, porém correlações foram fracas (tabela 14).

Tabela 14. Valores da correlação de Pearson por grupo e na totalidade dos indivíduos do estudo das variáveis osteocalcina total, CTx e osteocalcina parcialmente descarboxilada.

Variáveis		Controle	DM1	DM1-TCTH	Total
OC (ng/mL)	TAV (mm ²)	-0,05	-0,11	0,29	-0,08
	TAS (mm ²)	-0,31	-0,37	0,10	-0,34
	LIH (%)	0,48	0,08	-0,21	0,31
	HbA1c (%)	0,14	-0,48	0,02	-0,22
	IGF-1 (ng/mL)	0,17	0,59	-0,52	0,31
	Doses de insulina (UI/kg de peso)	---	-0,27	0,03	-0,35
	Adiponectina (µg/mL)	-0,19	-0,46	-0,40	-0,34
	Leptina (ng/mL)	-0,45	-0,14	-0,19	-0,29
	CTx (ng/mL)	0,46	0,87	0,72	0,65
CTx (ng/mL)	TAV (mm ²)	-0,34	-0,09	0,53	-0,14
	TAS (mm ²)	-0,43	-0,44	-0,34	-0,48
	LIH (%)	0,06	0,13	0,07	0,09
	HbA1c (%)	-0,15	-0,34	-0,08	-0,39
	IGF-1 (ng/mL)	0,52	0,66	-0,75	0,50
	Doses de insulina (UI/kg de peso)	---	-0,14	-0,20	-0,32
	Adiponectina (µg/mL)	-0,19	-0,47	-0,51	-0,43
	Leptina (ng/mL)	-0,42	-0,26	-0,64	-0,38
D-OC (ng/mL)	TAV (mm ²)	-0,08	0,08	0,65	0,05
	TAS (mm ²)	-0,25	0,01	0,22	-0,10
	LIH (%)	0,03	-0,03	0,28	0,06
	HbA1c (%)	0,08	0,19	-0,27	-0,07
	IGF-1 (ng/mL)	0,16	0,37	-0,46	0,21
	Doses de insulina (UI/kg de peso)	---	0,00	0,17	-0,04
	Adiponectina (µg/mL)	-0,17	-0,18	-0,28	-0,19
	Leptina (ng/mL)	-0,42	-0,08	-0,18	-0,21
CTx (ng/mL)	0,31	0,51	0,53	0,45	

Legenda: transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH); osteocalcina (OC); telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo 1 (CTx); osteocalcina parcialmente descarboxilada (D-OC); tecido adiposo visceral (TAV); lipídio intra-hepático (LIH); hemoglobina glicada (HbA1c), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1).

O TAV correlacionou-se diretamente com o teor de LIH, porém esta correlação não se mostrou muito evidente entre os grupos (Controle: $r=0,46$; DM1: $r=0,21$; DM1-TCTH: $r=0,32$) (figura 12).

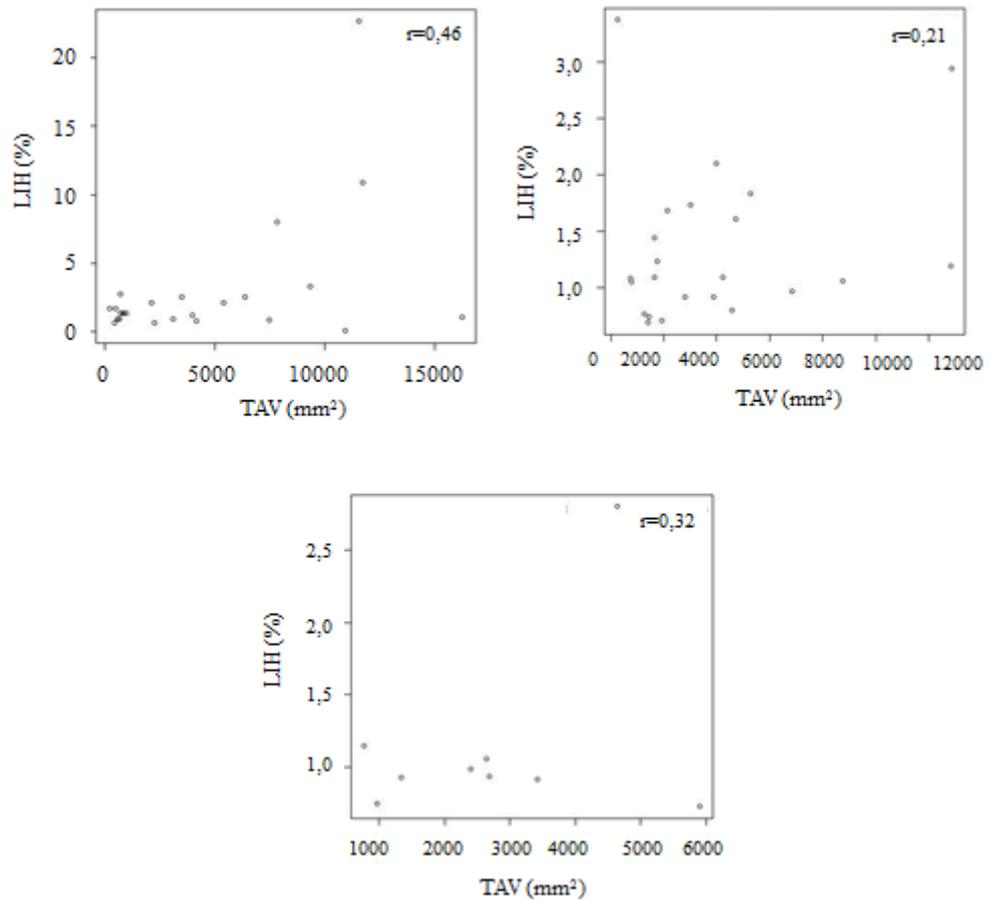


Figura 12. Gráficos de correlação de Pearson entre tecido adiposo visceral (TAV) e lipídio intra-hepático (LIH) por grupo estudado: Controle, DM1 e DM1-TCTH.

As correlações entre adiponectina e o tecido adiposo da região abdominal (visceral e subcutânea) também foram fracas (tabela 15). No entanto, observou-se que a adiponectina se correlacionou mais diretamente com os valores de HbA1c no grupo DM1 em insulinoterapia convencional ($r=0,61$) e no grupo DM1-TCTH esta associação se apresentou inversa ($r=-0,30$). A adiponectina sérica se correlacionou positivamente com o TAMO e com a fração saturada do TAMO da vertebra L3 nos dois grupos diabéticos, em especial, no grupo DM1-TCTH, no qual esta relação foi mais evidente (ex.: fração saturada vs. adiponectina: Controle: $r=-0,23$; DM1: $r=0,46$; DM1-TCTH: $r=0,61$; tabela 15). Verificou-se também que a adiponectina também se correlacionou diretamente com a fração insaturada do TAMO da vertebra L3 nos grupos Controle ($r=0,33$) e DM1 em insulinoterapia convencional ($r=0,50$).

Com relação à leptina sérica, esta apresentou uma correlação mais forte com o TAS (Controle: $r=0,64$; DM1: $r=0,44$; DM1-TCTH: $r=0,74$) do que com o TAV (Controle: $r=0,03$; DM1: $r=0,22$; DM1-TCTH: $r=-0,23$) (tabela 15). No grupo DM1-TCTH, a leptina se correlacionou também diretamente com as doses de insulina ($r=0,71$) e a fração insaturada do TAMO da vertebra L3 ($r=0,71$).

Tabela 15. Valores da correlação e Pearson por grupo e na totalidade dos indivíduos do estudo das variáveis adiponectina e leptina.

Variáveis		Controle	DM1	DM1-TCTH	Total
Adiponectina ($\mu\text{g/mL}$)	TAS (mm^2)	-0,25	0,16	-0,02	0,16
	TAV (mm^2)	-0,25	-0,10	-0,39	-0,14
	HbA1c (%)	-0,08	0,61	-0,30	0,51
	Doses de insulina (UI/kg de peso)	---	-0,33	-0,37	-0,11
	TAMO - fração total (%)	-0,26	0,34	0,68	0,11
	TAMO - fração saturada (%)	-0,23	0,46	0,61	0,18
	TAMO - fração insaturada (%)	0,33	0,50	-0,01	0,20
	Leptina (ng/ml)	TAS (mm^2)	0,64	0,44	0,74
TAV (mm^2)		0,03	0,22	-0,23	0,12
HbA1c (%)		0,02	0,05	0,43	0,18
Doses de insulina (UI/kg de peso)		---	0,12	0,71	0,31
TAMO - fração total (%)		0,14	0,30	0,31	0,16
TAMO - fração saturada (%)		0,08	0,16	0,20	0,08
TAMO - fração insaturada (%)		0,22	-0,06	0,71	0,08

Legenda: transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH); tecido adiposo da medula óssea (TAMO); tecido adiposo subcutâneo (TAS); tecido adiposo visceral (TAV).

O TAMO da vertebra L3 foi influenciado significativamente pelo colesterol sérico (0,083 %) que, junto com o TAV (0,00097 %), explicou 25% da variabilidade do percentual do TAMO na vertebra L3 (modelo 2; tabela 16 e figura 13). Não houve associação entre o TAMO e o LIH (0,226 %, $p=0,65$; apêndice 4). A idade teve efeito positivo sobre a fração saturada do TAMO (0,252 %, $p=0,0006$; tabela 16). Já a fração insaturada do TAMO apresentou associação com o gênero (-1,379 %) e o IGF-1 sérico (0,004%). Estes fatores explicaram cerca de 30% das variações no percentual das frações saturada e insaturada do TAMO da vertebra L3 (tabela 16). A HbA1c não apresentou associação significativa com o TAMO e sua composição lipídica ($p>0,05$; apêndice 4).

Tabela 16. Regressão linear múltipla considerando como variável dependente/resposta as frações total, saturada e insaturada do tecido adiposo da medula óssea (TAMO) da vertebra L3.

Variável dependente/resposta	Parâmetro	GL	Parâmetro	EP	Valor t	Valor p
Modelo 2	Intercepto	1	16,152	7,175	2,25	0,03
TAMO – fração total (%)	TAV (mm ²)	1	0,00097	0,00033	2,94	0,005
R ² = 0,25	Colesterol (mg/dL)	1	0,083	0,040	2,08	0,04
Modelo 2	Intercepto	1	-1,214	5,120	-0,24	0,81
TAMO – fração saturada (%)	Colesterol (mg/dL)	1	0,086	0,026	3,33	0,002
R ² = 0,33	Idade (anos)	1	0,252	0,069	3,65	0,0006
Modelo 2	Intercepto	1	2,586	0,483	5,35	<0,0001
TAMO – fração insaturada (%)	Gênero (M=1 / F=0)	1	-1,379	0,320	-4,31	<0,0001
R ² = 0,30	IGF-1 (ng/mL)	1	0,004	0,002	2,07	0,04

Legenda: grau de liberdade (GL); erro padrão (EP); tecido adiposo visceral (TAV); fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1).

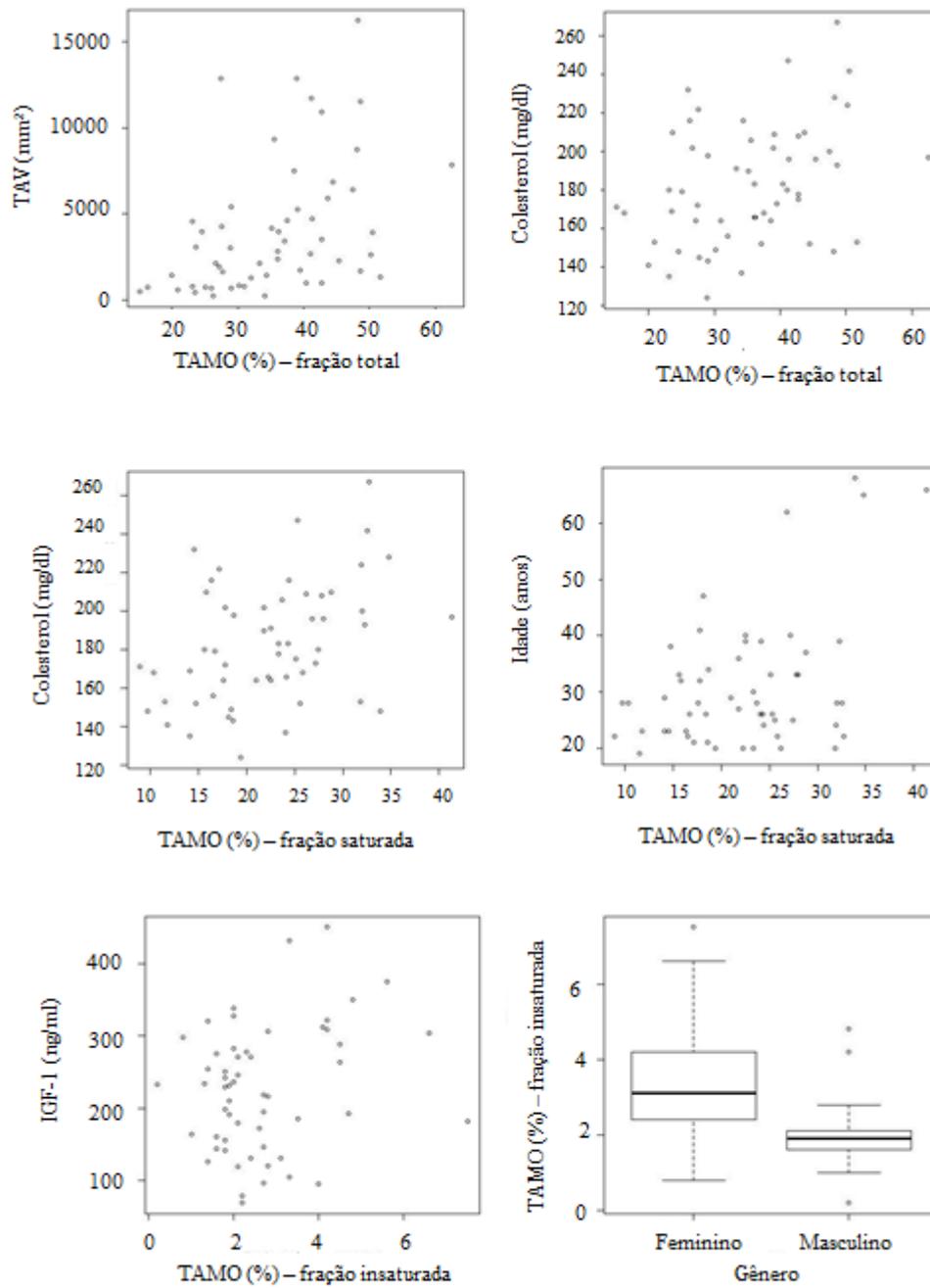


Figura 13. Gráficos da associação entre as variáveis independentes e a fração total e saturada do tecido adiposo da medula óssea (TAMO) da vertebra L3.

As doses de insulina administradas apresentaram uma correlação mais forte com o tecido adiposo da região abdominal do que com o TAMO (tabela 17).

Tabela 17. Valores da correlação e Pearson por grupo e na totalidade dos indivíduos do estudo da variável dose de insulina e os diferentes tipos de tecidos adiposos.

Variáveis		DM1	DM1-TCTH	Total
Doses de insulina (UI/Kg/dia)	TAS (mm ²)	0,26	0,63	0,44
	TAV (mm ²)	0,55	0,24	0,48
	TAMO - fração total (%)	0,05	-0,15	-0,21

Legenda: transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH); tecido adiposo da medula óssea (TAMO); tecido adiposo subcutâneo (TAS); tecido adiposo visceral (TAV).

DISCUSSÃO

O presente estudo teve como proposta avaliar a relação entre a massa óssea e os diferentes depósitos de tecido adiposo em diabéticos do tipo 1 submetidos a dois tipos de tratamento: a insulinoterapia convencional e o TCTH. O perfil dos indivíduos diabéticos em insulinoterapia convencional foi diferente daqueles submetidos ao TCTH. O grupo DM1 em insulinoterapia convencional apresentou pior controle glicêmico, maior necessidade de insulina exógena, maior taxa de gordura corporal e maior quantidade de TAS que o grupo DM1-TCTH. Os diabéticos submetidos ao TCTH permaneceram em média até 2 anos sem a necessidade do uso de insulina exógena. No entanto, os efeitos do TCTH pareceram ser temporários. Ao longo do tempo, o número de pacientes que passaram a apresentar necessidade de insulina foi progressivamente aumentando. Como parte do protocolo de tratamento, a maioria fazia uso da insulina associada à sitagliptina para garantir melhor controle glicêmico, já que este antidiabético oral tem sido associado com a manutenção da função das células β pancreáticas (ZHAO *et al.*, 2014). Além disso, o TAMO não diferiu entre o grupo controle e os diabéticos submetidos às duas abordagens terapêuticas. Neste estudo, não houve prejuízo da massa óssea no DM1, é possível que o novo perfil corporal destes indivíduos, no qual o sobrepeso e obesidade passaram a ser mais frequentes, tenha impacto positivo sobre o esqueleto.

Reduções significativas da massa óssea são frequentemente descritas nos estudos realizados com indivíduos diabéticos tipo 1 (TUOMINEN *et al.*, 1999; VESTERGAARD, 2007; ARMAS *et al.*, 2012; ZHUKOUSKAYA *et al.*, 2013; ABDALRAHAMAN *et al.*, 2015; STARUP-LINDE *et al.*, 2016) assim como nos experimentos com modelos animais de DM1 (BOTOLIN; MCCABE, 2007; MOTYL; MCCABE, 2009). Contudo, muitos dos estudos que mostraram haver um maior risco de fratura e redução da DMO no DM1, foram conduzidos em indivíduos numa faixa etária mais avançada, entre 45 e 70 anos (TUOMINEN *et al.*, 1999; VESTERGAARD, 2007; STARUP-LINDE *et al.*, 2016). Durante o processo de envelhecimento, há aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), redução de IGF-1 e aumento do PTH circulante, fatores os quais podem levar a redução da osteogênese em idosos (MOERMAN *et al.*, 2004; FENG; MCDONALD, 2011). Por outro lado, há também estudos prévios que mostraram haver perda de massa óssea em adultos jovens com DM1 (ARMAS *et al.*, 2012; ZHUKOUSKAYA *et al.*, 2013; ABDALRAHAMAN *et al.*,

2015). No entanto, nestes estudos, a presença de complicações microvasculares e de elevada taxa de glicose sérica pode ter contribuído para deterioração da massa óssea e ocorrência de fratura (ZHUKOUSKAYA *et al.*, 2013; ABDALRAHAMAN *et al.*, 2015). A hiperglicemia está relacionada com o aumento do acúmulo de produtos finais de glicação avançada (AGEs) na matriz orgânica óssea, o que contribui para a sua deterioração (KARIM; BOUXSEIN, 2016). Em humanos, Neumann *et al.* (2014) demonstraram que, independentemente da DMO, a presença de fraturas estava associada com elevadas concentrações de pentosidina, um produto final de glicação, em adultos diabéticos do tipo 1 (NEUMANN *et al.*, 2014). Os AGEs induzem a apoptose dos osteoblastos causando a redução da formação óssea (ALIKHANI *et al.*, 2007) e também modificando a resistência óssea (SAITO *et al.*, 2006).

Todavia, existem também estudos que observaram a manutenção da massa óssea em adultos e crianças com DM1 (KAYATH *et al.*, 1998; BRANDAO *et al.*, 2007; SLADE *et al.*, 2012). Em estudo prospectivo conduzido por Kayath *et al.* (1998) se encontrou um incremento da DMO da coluna lombar de adultos eutróficos com DM1 após os 2 anos de acompanhamento, que ocorreu independentemente do controle glicêmico ou do tempo de diagnóstico. No entanto, aqueles diabéticos tipo 1 com osteopenia ainda permaneceram com DMO menor comparado com os que não exibiram massa óssea reduzida no início do estudo (KAYATH *et al.*, 1998).

No presente estudo, como citado anteriormente, se observou a preservação da DMO nos diabéticos tipo 1 submetidos a ambos os tratamentos em relação ao controle. A massa óssea também não apresentou diferença entre os dois grupos de diabéticos avaliados. A maior parte dos voluntários do estudo foi composta por adultos jovens, sem complicações e que apresentaram concentrações normais de cálcio, PTH e 25(OH)D, fatores diretamente envolvidos na regulação do metabolismo ósseo (DE PAULA; ROSEN, 2012; STARUP-LINDE, 2013). E, apesar do mau controle glicêmico observado, em especial no diabético tipo 1 em insulino terapia convencional, houve baixa incidência de alterações ósseas e fraturas.

Além disso, com relação à remodelação óssea, ao contrário dos estudos que apontaram o prejuízo de formação óssea como mecanismo envolvido na perda da massa óssea nos diabéticos do tipo 1 (BOUILLON *et al.*, 1995; MCCABE, 2007; SLADE *et al.*, 2012; HOUGH *et al.*, 2016; STARUP-LINDE *et al.*, 2016), neste estudo não foi encontrada redução da OC total. Este achado, no entanto, corroborou com outros estudos que também não encontraram redução de OC total em indivíduos eutróficos diabéticos do tipo 1 (THRAILKILL *et al.*, 2012; ABDALRAHAMAN *et al.*, 2015). Por sua vez, a taxa circulante

de CTX tendeu a ser menor no grupo DM1 no presente estudo. As evidências sobre o papel da ressorção no fenótipo ósseo do DM1 ainda são inconsistentes (MCCABE, 2007; HOUGH *et al.*, 2016; KALAITZOGLOU *et al.*, 2016; STARUP-LINDE *et al.*, 2016). Em um estudo com crianças e adolescentes com DM1, período marcado pelo crescimento e desenvolvimento ósseo e no qual normalmente ocorre o diagnóstico da doença, se verificou um aumento do RANKL, sugerindo que a perda de massa óssea foi decorrente de um maior estímulo da atividade osteoclástica (TSENTIDIS *et al.*, 2016). Por outro lado, alguns estudos mostram que tanto a ressorção como também a formação óssea se apresentam diminuídas no período do diagnóstico da doença. Porém, quando há melhora do controle metabólico, ocorre a normalização dos marcadores ósseos (STARUP-LINDE *et al.*, 2016). Os dados obtidos neste estudo estão alinhados com estudos em pacientes eutróficos com DM1, os quais apresentam valores reduzidos de CTX, sugerindo um estado de baixa atividade de remodelação óssea. (GENNARI *et al.*, 2012; THRAILKILL *et al.*, 2012), o que corroborou com o encontrado no presente estudo.

Assim como a OC total, a D-OC também se manteve semelhante entre os indivíduos diabéticos e os controles, o que já havia sido descrito previamente na literatura (THRAILKILL *et al.*, 2012). Estudo experimental com animais com silenciamento do receptor de insulina em osteoblastos (Ob- Δ IR) mostrou que a D-OC está envolvida na regulação do acúmulo de gordura corporal, na produção e na sensibilidade à insulina, sendo considerada como um hormônio originado no tecido ósseo (FULZELE *et al.*, 2010). Por sua vez, é descrito que a insulina atua favorecendo a proliferação das células de formação óssea, aumentando a produção de OC total pela inibição do Twist 2 e também estimulando a liberação de D-OC, o que pode ocorrer por meio da regulação da ressorção óssea devido ao aumento do RANKL produzido pelos osteoblastos e supressão da osteoprotegerina (ROSEN; MOTYL, 2010). No presente estudo, a relação entre D-OC e a dose de insulina administrada não foi observada nos grupos DM1, não corroborando com estudo prévio com diabéticos tipo 1 eutróficos que encontrou correlação positiva entre D-OC e alguns parâmetros relacionados à insulina tais como a necessidade diária de insulina exógena, a taxa de C-peptídeo/glicose sérica e o IGF-1 (THRAILKILL *et al.*, 2012). No entanto, embora alguns estudos mostrem a existência desta relação (FULZELE *et al.*, 2010; THRAILKILL *et al.*, 2012), o papel da D-OC na regulação do metabolismo energético ainda não está bem estabelecido. Estudos sobre o impacto do tratamento com alendronato na remodelação óssea mostram que, mesmo havendo redução da D-OC, não há aumento da incidência de diabetes associado ao uso do

medicamento (HIRAO *et al.*, 2008; SCHAFFER *et al.*, 2011). Isto sugere que a OC não seria um fator determinante no desenvolvimento e/ou controle metabólico do diabetes.

Assim como na obesidade primária, usualmente, a massa óssea se apresenta normal ou elevada no DM2 (TUOMINEN *et al.*, 1999; CUTRIM *et al.*, 2007; DE ARAUJO *et al.*, 2016; SHANBHOGUE *et al.*, 2016; STARUP-LINDE *et al.*, 2016). Apesar disto, diversos estudos mostraram que o risco de fratura também está aumentado no DM2 (VESTERGAARD, 2007; PREMAOR *et al.*, 2011; PRIETO-ALHAMBRA *et al.*, 2012; PREMAOR *et al.*, 2013; COPÊS *et al.*, 2015). Slade *et al.* (2012) também descreveram a manutenção da DMO em adultos jovens diabéticos tipo 1 quando comparados com indivíduos controle. O bom controle glicêmico pode ter colaborado para a manutenção da massa óssea dos indivíduos com DM1 avaliados por estes autores (SLADE *et al.*, 2012). Porém, outro aspecto a ser considerado é o IMC (SLADE *et al.*, 2012) que, em comparação com os outros estudos com adultos diabéticos tipo 1 apresentando redução da DMO (VESTERGAARD, 2007; ZHUKOUSKAYA *et al.*, 2013; ABDALRAHAMAN *et al.*, 2015) , mostrou-se em média mais elevado (SLADE *et al.*, 2012).

O baixo peso sempre foi uma característica comumente descrita nos indivíduos com DM1, em especial, nos recém-diagnosticados com a doença (DE PAULA *et al.*, 2010). E, de uma maneira geral, o IMC e a distribuição de gordura corporal são covariáveis pouco exploradas na investigação de alterações ósseas e risco de fratura no DM1 (VESTERGAARD, 2007). No entanto, a incidência de obesidade e sobrepeso tem aumentado entre os diabéticos do tipo 1 (CONWAY *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2010). Nos Estados Unidos, estudo prospectivo com indivíduos com DM1 mostrou um aumento de 47% nos casos de sobrepeso ao longo de quase 20 anos de acompanhamento, sendo que 20% destes indivíduos apresentaram um aumento de pelo menos 5 kg/m² enquanto somente 7% apresentou perda de pelo menos 2 kg/m² (CONWAY *et al.*, 2010). Recentemente, este aspecto também foi observado no Brasil, em um estudo multicêntrico que avaliou fatores determinantes do regime terapêutico utilizado no tratamento do DM1. Este estudo mostrou uma prevalência relevante de obesidade e sobrepeso, que variou entre 28,5 a 35,1%, independente do regime terapêutico adotado (GOMES *et al.*, 2012).

O acúmulo excessivo de gordura na região abdominal é preocupante já que a hipertrofia dos adipócitos induz à necrose destas células e ao recrutamento de macrófagos para a região, o que contribui para uma resposta inflamatória sistêmica de grau leve, disfunção dos adipócitos e, por fim, exportação de lipídios para outros sítios como fígado e

músculos. Alguns estudos sugerem que este processo se inicia no TAS, sendo que quando sua capacidade máxima de acúmulo de gordura é atingida, há o extravasamento do excesso de gordura para o TAV e os outros órgãos periféricos. Este processo de redistribuição do excesso de gordura e o estado inflamatório sistêmico instalado estão diretamente relacionados com o desenvolvimento do quadro de resistência insulínica e síndrome metabólica no indivíduo obeso (TSATSOULIS *et al.*, 2013; SATTAR; GILL, 2014). Estudos prévios mostraram que características tais como obesidade central, resistência insulínica e hipertensão arterial, que até pouco tempo, eram consideradas características clínicas exclusivas da patologia do DM2, vem aumentando também entre adultos e crianças com DM1 (DIB, 2006; POLSKY; ELLIS, 2015; DA COSTA *et al.*, 2016; MERGER *et al.*, 2016). E, a presença da síndrome metabólica entre os diabéticos tipo 1 parece ser um fator de risco importante para o maior desenvolvimento de complicações macro e microvasculares, tais como doenças cardiovasculares, síndrome do pé diabético, nefropatia, e retinopatia, independentemente do controle glicêmico (MERGER *et al.*, 2016).

No presente estudo, os indivíduos diabéticos e controle foram pareados de acordo com o peso, altura, IMC e gênero. Apesar disto, interessante, foi identificado que a maioria dos diabéticos em tratamento convencional apresentou maior taxa de indivíduos com IMC elevado. A análise da composição corporal pelo DXA mostrou que grande parte dos diabéticos tipo 1 em insulino-terapia convencional apresentou massa muscular acima do esperado quando comparado com o controle e o grupo DM1-TCTH. Além disto, a frequência de obesidade grau I de acordo com IMG no grupo DM1 em tratamento convencional foi maior que nos demais grupos. Contudo, o TAV e o teor de LIH foram semelhantes entre os diabéticos e os controles. A esteatose não foi uma característica dos diabéticos tipo 1 no presente estudo, assim como não foi observada também por Llauradó *et al.* (2015) previamente (LLAURADÓ *et al.*, 2015). Isto indica que no DM1 não existe tendência de maior redistribuição de gordura para um padrão usualmente associado à resistência insulínica (POURHASSAN *et al.*, 2016).

No entanto, o grupo DM1 em insulino-terapia convencional apresentou maior quantidade de TAS. A expansão de TAS observada pode ter sido induzida pelo efeito lipogênico da insulina (JACOB *et al.*, 2006). Em indivíduos não diabéticos a insulina pré-hepática é cerca de 2-4 maior que a periférica. Este perfil se inverte no DM1 tratado com administração periférica de insulina, ou seja, neste a insulinemia periférica é maior que a portal (LEBOVITZ, 2011; FERRANNINI, 2012). Um estudo com diabéticas do tipo 1

mostrou que a ação da insulina administrada não parece estar prejudicada, sendo observada elevada captação de glicose pelo TAS da região do glúteo destas mulheres (ARRIETA-BLANCO *et al.*, 2011), o que poderia explicar a maior quantidade de TAS entre os diabéticos em insulinoterapia convencional. No entanto, outro estudo com DM1 mostrou que ganho de peso corporal no DM1 induziu maior aumento do TAV em relação ao TAS abdominal (JACOB; ADAMS-HUET; RASKIN, 2006), indicando a necessidade de melhor compreensão de como ocorre o acúmulo de gordura nesta condição.

Por sua vez, o TAMO representa um depósito de gordura específico que difere dos depósitos de TAV e TAS, por estar localizada dentro da medula óssea e, assim, pode interagir com este microambiente (HARDOUIN; PANSINI; CORTET, 2014). Esperava-se que o transplante nos diabéticos tivesse alguma influência sobre o TAMO e a saúde óssea. Como já demonstrado previamente em modelo animal, a quantidade de adipócitos está inversamente relacionada com o número de células tronco hematopoiéticas na medula óssea (NAVEIRAS *et al.*, 2009). Entretanto, o fato destes indivíduos terem sido submetidos a um regime de condicionamento imunoablativo não promoveu no longo prazo a proliferação de adipócitos na medula.

Na literatura, o aumento na fração de TAMO é observado em algumas condições associadas à osteoporose tais como envelhecimento, imobilização e anorexia nervosa (BREDELLA *et al.*, 2009; SCHWARTZ *et al.*, 2013; DEVLIN; ROSEN, 2015). Diferentemente do que ocorre com outros nichos de tecido adiposo, se observa expansão de TAMO com restrição alimentar e este sítio não parece ser local de armazenamento de gordura em condições de abundância calórica. O aumento do TAMO também não parece ser uma característica em humanos com DM2 (DEVLIN; ROSEN, 2015). No entanto, estudo experimental mostrou que após 12 semanas consumindo dieta hiperlipídica, os camundongos apresentaram aumento das concentrações séricas de insulina e leptina, ganho significativo de gordura corporal e aumento da fração de gordura na tíbia, porém sem alteração na massa óssea (DOUCETTE *et al.*, 2015). Por outro lado, em estudo recente em mulheres não diabética, mas com amplo espectro de variação de peso não se observou associação entre o TAMO e resistência insulínica (DE PAULA *et al.*, 2015). Estes dados indicaram que em seres humanos o TAMO tem relação diferente com resistência insulínica quando se compara com outros nichos de tecido adiposo.

A interação entre o TAMO e a massa óssea é um aspecto que vem sendo bastante investigado em diversas condições, já que os adipócitos e os osteoblastos originam de um

progenitor em comum, e o fato de compartilharem a mesma origem celular, apresenta impacto na formação de um tipo celular em detrimento do outro (HARDOUIN; PANSINI; CORTET, 2014; NUTTALL *et al.*, 2014; RINKER *et al.*, 2014). Em modelo animal de DM1, farmacologicamente induzido, o TAMO não apresentou alteração na vertebra, porém, se encontrou aumento da adiposidade no fêmur distal dos animais assim como a perda de volume ósseo (MARTIN; MCCABE, 2007). No entanto, estudo experimental com animais com DM1 farmacologicamente induzido mostrou que após a intervenção com dieta hipergordurosa, rica em ácidos graxos de cadeia média, estes apresentaram manutenção do TAMO, redução do tecido adiposo branco e exibiram melhora dos parâmetros ósseos e a massa magra preservada. Já os animais alimentados com dieta hipogordurosa tenderam a ter maior quantidade de TAMO e tiveram significativa redução de tecido adiposo branco, muscular e ósseo (CARVALHO *et al.*, apêndice 5). Em humanos, Slade *et al.* (2012) não observaram diferença do TAMO em nenhum dos sítios avaliados (vertebra, fêmur e tíbia) entre os indivíduos diabéticos tipo 1 e os não-diabéticos (SLADE *et al.*, 2012). Porém, o estudo mostrou que o perfil lipídico teve influência importante sobre o TAMO (SLADE *et al.*, 2012), o que pode ter relação com o estado nutricional destes indivíduos com DM1.

No presente estudo, também não houve aumento do TAMO como descrito em estudos prévios sobre o comportamento deste tecido no DM1 (MCCABE, 2007; DEVLIN; ROSEN, 2015). Além disso, não houve associação significativa entre o TAMO com a DMO da vertebra L3. O TAV e, em especial, o colesterol sérico apresentaram uma associação significativa com o TAMO. Porém, a dose de insulina administrada, os triglicérides e a taxa de glicose sérica não tiveram efeito sobre o TAMO. O mau controle glicêmico associado ao aumento do IMC pode contribuir para o desenvolvimento de um perfil lipídico alterado no DM1 (VAID *et al.*, 2016), assim como ocorre no DM2 (WU; PARHOFER, 2014). No presente estudo, cerca de 30% de diabéticos tipo 1 em insulino terapia convencional apresentaram alterações de LDL-colesterol e somente 13% mostrou aumento de triglicérides, o que corroborou com os achados de Giuffrida *et al.* (2012). Estes autores descreveram que no DM1, a taxa de glicose sérica mostrou ter efeito heterogêneo sobre cada lipoproteína, sendo que o aumento nos valores de triglicérides ocorre posteriormente ao aumento do LDL-colesterol (GIUFFRIDA *et al.*, 2012).

Além disso, não houve diferença na quantidade das frações saturada e insaturada do TAMO entre os diabéticos e controles. Ainda não existe na literatura dados sobre a qualidade de lipídios armazenados no TAMO no DM1. Estudos prévios mostraram que indivíduos com

DM2 com fraturas (PATSCHE *et al.*, 2013) ou idosos com osteoporose (YEUNG *et al.*, 2005) apresentam maior concentração de gordura saturada da medula óssea. Esta não foi uma característica dos diabéticos tipo 1 jovens do presente trabalho, os quais apresentaram em média massa óssea normal e sem presença de fratura vertebral. Como observado nos presentes resultados, a idade e o gênero masculino foram fatores que influenciaram, respectivamente, as frações de gordura saturada e insaturada do TAMO. Isto corrobora com o que foi descrito previamente na literatura, que mostra o aumento da fração saturada do TAMO com envelhecimento e uma menor quantidade de lipídios insaturados no TAMO nos homens (YEUNG *et al.*, 2005; MACIEL *et al.*, 2016). Adicionalmente, como citado anteriormente, os resultados mostraram que o colesterol sérico foi o principal preditor da fração saturada do TAMO. Diferentemente, a fração insaturada do TAMO foi influenciada pela concentração sérica de IGF-1, e não teve associação com o colesterol e frações. Um estudo com mulheres obesas encontrou uma relação inversa entre o TAMO e o IGF-1 (BREDELLA *et al.*, 2011). No presente estudo, esta relação inversa entre a fração saturada do TAMO e o IGF-1 também foi observada (apêndice 4), porém não foi significativa. Contudo, a associação positiva entre o IGF-1 e os lipídios insaturados encontrada corrobora com a sugestão do estudo de Bredella *et al.* (2011) de que o IGF-1 poderia ser tanto um regulador da massa óssea quanto do TAMO. Assim, pode-se criar a hipótese de que o IGF-1 seria um fator importante na manutenção da fração insaturada do TAMO que, por sua vez, é considerada a fração protetora para o tecido ósseo (YEUNG *et al.*, 2005; PATSCHE *et al.*, 2013).

Como já está bem descrito na literatura, a massa muscular exibiu uma associação bastante evidente com a massa óssea, sendo um preditor positivo para a DMO (GJESDAL *et al.*, 2008; HUNTER; PLAISANCE; FISHER, 2014; MADEIRA *et al.*, 2014). Com relação aos depósitos de lipídeos em fígado, mesmo não observando valores de LIH acima de 9%, o que caracterizaria um quadro de esteatose (FISHBEIN *et al.*, 2006; MILIĆ; LULIĆ; ŠTIMAC, 2014), uma maior quantidade de LIH se mostrou como um fator prejudicial à DMO, além da idade e do controle glicêmico que também tiveram efeito negativo sobre a massa óssea. Por sua vez, o TAV não apresentou impacto significativo sobre a DMO como descrito previamente em alguns estudos (BREDELLA *et al.*, 2011; FU *et al.*, 2011; BREDELLA *et al.*, 2012; CAMPOS *et al.*, 2012; COHEN *et al.*, 2013). Enquanto que o TAS, que se mostrou maior no grupo DM1, teve um efeito positivo sobre a DMO como observado previamente em adolescentes (CAMPOS *et al.*, 2012). A ausência de impacto negativo da gordura abdominal sobre a massa óssea pode estar relacionada com o perfil corporal

encontrado no presente estudo que é diferente de grande parte dos estudos prévios os quais avaliaram uma população predominantemente obesa (RUSSELL *et al.*, 2010; BREDELLA *et al.*, 2011; BREDELLA *et al.*, 2012; CAMPOS *et al.*, 2012). No entanto, deve-se de ressaltar que outros estudos não demonstraram associação entre parâmetros ligados à resistência insulínica (p.ex., TAV e HOMA-IR) com massa óssea, sugerindo que a resistência à insulina não se associa com prejuízo de massa óssea (DE PAULA *et al.*, 2015; DE ARAÚJO *et al.*, 2016).

A obesidade está relacionada com aumento da DMO durante a idade adulta, especialmente nas regiões que suportam o peso corporal como o quadril (MAÏOMOUN *et al.*, 2016). No entanto, o tecido adiposo também pode influenciar o esqueleto por meio da secreção de fatores endócrinos. O TAV e o TAS podem ter diferentes efeitos sobre o tecido ósseo por meio da ação das adipocinas (RUSSELL *et al.*, 2010). Neste estudo, ambas adipocinas foram semelhantes entre os grupos e apresentaram efeito negativo sobre os marcadores de remodelação óssea. Porém, este efeito foi sutil já que não se observou redução da massa óssea entre os diabéticos e os controles. A leptina sérica apresentou uma evidente relação com o TAS, corroborando com um estudo com adolescentes obesas (RUSSELL *et al.*, 2010), e também com outros estudos envolvendo a população do *Framingham Heart Study* (LEE *et al.*, 2016) e crianças eutróficas com DM1 (MAJEWSKA *et al.*, 2016). A ação da leptina sobre o metabolismo ósseo é complexa e possui mecanismos aparentemente contraditórios (MOTYL; ROSEN, 2012), podendo atuar via sistema nervoso central e ocasionar a diminuição da formação óssea (WEI; FLAHERTY; KARSENTY, 2015) assim como também agir diretamente nas células de formação óssea promovendo a atividade osteoblástica e aumentando a DMO (BURGUERA *et al.*, 2001; IDELEVICH *et al.*, 2013; TURNER *et al.*, 2013). A leptina também apresenta ações distintas e antagônicas sobre os osteoclastos, sendo uma por meio da sinalização simpática via *Adrb2*, promovendo a diferenciação destas células e a outra via fator de transcrição cocaína-anfetamina dependente (CART), inibindo a osteoclastogênese (ELEFTERIOU *et al.*, 2005). No ser humano existe um fator adicional que dificulta o reconhecimento das ações desta adipocina, que é o desenvolvimento de resistência que se observa frente à elevação de sua taxa na circulação (IWAIEC; TURNER, 2016).

A adiponectina, por outro lado, se relacionou mais evidentemente com o TAMO, especialmente com a fração saturada. Este achado foi contrário aos estudos que mostraram que a adiponectina está associada ao TAV em obesos (RUSSELL *et al.*, 2010; LEE *et al.*,

2016), mas corroborou com o estudo realizado em crianças eutróficas com DM1 que não encontrou a relação entre adiponectina e tecido adiposo abdominal (MAJEWSKA *et al.*, 2016). Altas concentrações de adiponectina são descritas em estudos com diabéticos tipo 1 eutróficos (MAJEWSKA *et al.*, 2016) e também com diabéticos tipo 1 com sobrepeso e bom controle glicêmico (PEREIRA *et al.*, 2012). Na anorexia nervosa, a adiponectina também está elevada, sendo esta uma condição na qual a reserva de gordura corporal é diminuída (MISRA *et al.*, 2007), porém há um aumento na fração do TAMO (BREDELLA *et al.*, 2009). Ao contrário, a adiponectina se encontra reduzida na síndrome metabólica (NTZOUVANI *et al.*, 2016), condição na qual normalmente há acúmulo de gordura na região abdominal e resistência insulínica, mas parece não ter influência sobre o TAMO (DEVLIN; ROSEN, 2015). Estudo experimental com camundongos *Ocn-Wnt10b*, que possuíam maior expressão da *Wnt10b*, proteína inibidora da adipogênese, depois de submetidos à restrição calórica não apresentaram aumento do TAMO e da adiponectina sérica. No entanto, o tecido adiposo branco destes animais não apresentou alteração da expressão de reguladores da secreção da adiponectina tais como o *Gstkl* e o *Erp44*, indicando que a maior parte da adiponectina circulante foi proveniente do TAMO (CAWTHORN *et al.*, 2014). Assim, é possível se fazer uma hipótese que no DM1 o TAMO também possa contribuir mais ativamente para manutenção dos níveis circulantes de adiponectina. Por sua vez, as evidências sobre a ação da adiponectina sobre a massa óssea também são inconsistentes entre os estudos *in vitro* e *in vivo*. Há aqueles que mostram que a adiponectina teria efeito positivo, estimulando a osteoblastogênese (OSHIMA *et al.*, 2005; LUO *et al.*, 2006; WILLIAMS *et al.*, 2009) e inibindo a osteoclastogênese (OSHIMA *et al.*, 2005). Enquanto outros estudos indicam a existência de uma associação negativa entre a adiponectina e a massa óssea (MISRA *et al.*, 2007; KANAZAWA, 2012), o que, em parte, pode ser devido ao favorecimento da resorção óssea (WANG *et al.*, 2013).

É necessário pontuar que este estudo é do tipo transversal, sendo que o acompanhamento em longo prazo seria interessante para melhorar a compreensão dos mecanismos envolvidos na saúde óssea no diabetes tipo 1. O número de participantes recrutados foi próximo ao de outros estudos da área (BREDELLA *et al.*, 2009; FAZELI *et al.*, 2012; SLADE *et al.*, 2012; PATSCH *et al.*, 2013). Provavelmente o número de voluntários inseridos no presente estudo pode ter contribuído para não se ter observado significância em algumas relações como, por exemplo, entre a DMO da coluna lombar e o TAMO. No entanto, se pode dizer que o desenvolvimento deste estudo trouxe achados instigantes por mostrar a

preservação da massa óssea entre os diabéticos tipo 1 e sua relação com os diversos depósitos de gordura. A avaliação da composição corporal foi importante por permitir melhor compreensão da contribuição da massa muscular e do tecido adiposo para a massa óssea, o que é um aspecto pouco abordado entre os estudos que se limitam ao uso do IMC (IWAIEC; TURNER, 2016). Além disso, possibilitou avaliar o papel da composição do TAMO no DM1 que somente havia sido investigada em indivíduos com DM2 e idosos com alterações ósseas (YEUNG *et al.*, 2005; PATSCH *et al.*, 2013) e em indivíduos jovens normoglicêmicos (MACIEL *et al.*, 2016).

CONCLUSÃO

O presente estudo mostra resultados que se chocam com dados anteriores que indicam prejuízo de massa óssea no DM1. O peso corporal tem papel positivo sobre a massa óssea e estudos recentes indicam que a perfil da população de diabéticos do tipo 1 vem acompanhando o padrão da população em geral que é de aumento de peso. Possivelmente, este é um fator influenciador na massa óssea da população avaliada no presente estudo. Enquanto os diversos nichos de tecido adiposo têm sido minuciosamente estudados do DM2 existem poucos dados sobre os subtipos destes tecidos no DM1 e em particular sua relação com a massa óssea. Nossos dados contribuem nesta linha de pesquisa mostrando que no DM1 mesmo com peso normal ou sobrepeso não existe tendência de acúmulo de tecido adiposo visceral. Ao contrário, no DM1 em regime de tratamento convencional e em uso de dose plena de insulina apresenta aumento de tecido adiposo subcutâneo. É possível que a hiperinsulinemia periférica provocada por uso de aplicação subcutânea seja pelo menos em parte responsável por esta ocorrência. Estes resultados são estimulantes para novos estudos que determinem a possível ação do tecido adiposo subcutâneo como gerador de resistência à insulina no DM1. Indivíduos jovens com DM1 não apresentam alterações nem de quantidade nem de qualidade de lipídios na medula óssea.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABDALRAHAMAN, N. et al. Deficits in Trabecular Bone Microarchitecture in Young Women With Type 1 Diabetes Mellitus. **J Bone Miner Res**, v. 30, n. 8, p. 1386-93, Aug 2015.

ABRAHAMSEN, B. et al. Ten-year prediction of osteoporosis from baseline bone mineral density: development of prognostic thresholds in healthy postmenopausal women. The Danish Osteoporosis Prevention Study. **Osteoporos Int**, v. 17, n. 2, p. 245-51, 2006.

ALIKHANI, M. et al. Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. **Bone**, v. 40, n. 2, p. 345-53, 2007.

ARMAS, L. A.; AKHTER, M.P.; DRINCIC, A.; RECKER, R.R.. Trabecular bone histomorphometry in humans with Type 1 Diabetes Mellitus. **Bone**, v. 50, n. 1, p. 91-6, 2012.

ARRIETA-BLANCO, F. et al. Insulin action in adipose tissue in type 1 diabetes. **Int J Gen Med**, v. 4, p. 153-7, 2011.

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

BONIFACIO, E. et al. Quantification of islet-cell antibodies and prediction of insulin-dependent diabetes. **Lancet**, v. 335, n. 8682, p. 147-9, 1990.

BOTOLIN, S.; MCCABE, L. R. Bone loss and increased bone adiposity in spontaneous and pharmacologically induced diabetic mice. **Endocrinology**, v. 148, n. 1, p. 198-205, 2007.

BOUILLON, R. et al. Influence of age, sex, and insulin on osteoblast function: osteoblast dysfunction in diabetes mellitus. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 80, n. 4, p. 1194-202, 1995.

BRANDAO, F. R. et al. Bone metabolism is linked to disease duration and metabolic control in type 1 diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 78, n. 3, p. 334-9, 2007.

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

BREDELLA, M. A. et al. Determinants of bone microarchitecture and mechanical properties in obese men. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 11, p. 4115-22, 2012.

BREDELLA, M. A. et al.. Determinants of bone mineral density in obese premenopausal women. **Bone**, v. 48, n. 4, p. 748-54, 2011.

BURGUERA, B. et al. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. **Endocrinology**, v. 142, n. 8, p. 3546-53, 2001.

BURT, R. K.; OYAMA, Y.; TRAYNOR, A.; KENYON, N. S. Hematopoietic stem cell therapy for type 1 diabetes: induction of tolerance and islet cell neogenesis. **Autoimmun Rev**, v. 1, n. 3, p. 133-8, 2002.

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

CAWTHORN, W. P. et al. Bone marrow adipose tissue is an endocrine organ that contributes to increased circulating adiponectin during caloric restriction. **Cell Metab**, v. 20, n. 2, p. 368-75, 2014.

CNOP, M. et al. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. **Diabetes**, v. 54 Suppl 2, p. S97-107, 2005.

COHEN, A. et al. Abdominal fat is associated with lower bone formation and inferior bone quality in healthy premenopausal women: a transiliac bone biopsy study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, n. 6, p. 2562-72, 2013.

CONWAY, B. et al. Temporal patterns in overweight and obesity in Type 1 diabetes. **Diabet Med**, v. 27, n. 4, p. 398-404, 2010.

COPÊS, R. M. et al. Obesity and Fractures in Postmenopausal Women: A Primary-care Cross-Sectional Study at Santa Maria, Brazil. **J Clin Densitom**, v. 18, n. 2, p. 165-71, 2015 2015.

COURI, C. E.; DE OLIVEIRA, M. C.; SIMÕES, B. P. Risks, benefits, and therapeutic potential of hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diabetes. **Curr Diab Rep**, v. 12, n. 5, p. 604-11, 2012.

COURI, C. E.; FOSS, M. C.; VOLTARELLI, J. C. Secondary prevention of type 1 diabetes mellitus: stopping immune destruction and promoting beta-cell regeneration. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 10, p. 1271-80, 2006.

COURI, C. E. et al. C-peptide levels and insulin independence following autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. **JAMA**, v. 301, n. 15, p. 1573-9, 2009.

COURI, C. E.; VOLTARELLI, J. C. Potential role of stem cell therapy in type 1 diabetes mellitus. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 52, n. 2, p. 407-15, 2008.

COURI, C. E.; VOLTARELLI, J. C. Stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus: a review of recent clinical trials. **Diabetol Metab Syndr**, v. 1, n. 1, p. 19, 2009.

COURTLAND, H. W. et al. Low levels of plasma IGF-1 inhibit intracortical bone remodeling during aging. **Age (Dordr)**, v. 35, n. 5, p. 1691-703, 2013.

CUTRIM, D. M.; PEREIRA, F. A.; DE PAULA, F. J.; FOSS, M. C. Lack of relationship between glycemic control and bone mineral density in type 2 diabetes mellitus. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, n. 2, p. 221-7, 2007.

DA COSTA, V. M. et al. Overweight among children and adolescent with type I diabetes mellitus: prevalence and associated factors. **Diabetol Metab Syndr**, v. 8, p. 39, 2016.

DE ARAUJO, I. M. et al. Marrow Adipose Tissue Spectrum in Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. **Eur J Endocrinol**, 2016.

DE BARROS, A. P. et al. Osteoblasts and bone marrow mesenchymal stromal cells control hematopoietic stem cell migration and proliferation in 3D in vitro model. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e9093, 2010.

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

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

DE PAULA, F. J.; ROSEN, C. J. Vitamin D safety and requirements. **Arch Biochem Biophys**, v. 523, n. 1, p. 64-72, 2012.

DEVLIN, M. J.; ROSEN, C. J. The bone-fat interface: basic and clinical implications of marrow adiposity. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 3, n. 2, p. 141-7, 2015.

DIB, S. A. [Insulin resistance and metabolic syndrome in type 1 diabetes mellitus]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 50, n. 2, p. 250-63, 2006.

DOUCETTE, C. R. et al. A High Fat Diet Increases Bone Marrow Adipose Tissue (MAT) But Does Not Alter Trabecular or Cortical Bone Mass in C57BL/6J Mice. **J Cell Physiol**, v. 230, n. 9, p. 2032-7, 2015.

DUCY, P. et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. **Cell**, v. 100, n. 2, p. 197-207, 2000.

EIZIRIK, D. L. et al. Use of a systems biology approach to understand pancreatic beta-cell death in Type 1 diabetes. **Biochem Soc Trans**, v. 36, n 3, p. 321-7, 2008.

ELEFTERIOU, F. et al. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. **Nature**, v. 434, n. 7032, p. 514-20, 2005.

FAZELI, P. K. et al. Marrow fat and preadipocyte factor-1 levels decrease with recovery in women with anorexia nervosa. **J Bone Miner Res**, v. 27, n. 9, p. 1864-71, 2012.

FAZELI, P. K. et al. Marrow fat and bone--new perspectives. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, n. 3, p. 935-45, 2013.

FENG, X.; MCDONALD, J. M. Disorders of bone remodeling. **Annu Rev Pathol**, v. 6, p. 121-45, 2011.

FERRANNINI, E. Physiology of glucose homeostasis and insulin therapy in type 1 and type 2 diabetes. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 41, n. 1, p. 25-39, 2012

FERRON, M. et al. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. **Cell**, v. 142, n. 2, p. 296-308, 2010.

FIORINA, P.; VOLTARELLI, J.; ZAVAZAVA, N. Immunological applications of stem cells in type 1 diabetes. **Endocr Rev**, v. 32, n. 6, p. 725-54, 2011.

FISHBEIN, M. H.; MOGREN, C.; GLEASON, T.; STEVENS, W.R. Relationship of hepatic steatosis to adipose tissue distribution in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 42, n. 1, p. 83-8, 2006.

FU, X. et al. Associations of fat mass and fat distribution with bone mineral density in pre- and postmenopausal Chinese women. **Osteoporos Int**, v. 22, n. 1, p. 113-9, 2011.

FULZELE, K. et al. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. **Cell**, v. 142, n. 2, p. 309-19, 2010.

GENNARI, L. et al. Circulating sclerostin levels and bone turnover in type 1 and type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 5, p. 1737-44, 2012.

GIUFFRIDA, F. M. et al. Heterogeneous behavior of lipids according to HbA1c levels undermines the plausibility of metabolic syndrome in type 1 diabetes: data from a nationwide multicenter survey. **Cardiovasc Diabetol**, v. 11, p. 156, 2012.

GIUGLIANO, D.; MAIORINO, M. I.; BELLASTELLA, G.; ESPOSITO, K. Comment on American Diabetes Association. Approaches to Glycemic Treatment. Sec. 7. In Standards of Medical Care in Diabetes-2016. *Diabetes Care* 2016;39(Suppl. 1):S52-S59. **Diabetes Care**, v. 39, n. 6, p. e86-7, 2016.

GJESDAL, C. G. et al. Impact of lean mass and fat mass on bone mineral density: The Hordaland Health Study. **Maturitas**, v. 59, n. 2, p. 191-200, 2008.

GODFREY, K. J. et al. Stem cell-based treatments for Type 1 diabetes mellitus: bone marrow, embryonic, hepatic, pancreatic and induced pluripotent stem cells. **Diabet Med**, v. 29, n. 1, p. 14-23, 2012.

GOMES, M. B. et al. Regional differences in clinical care among patients with type 1 diabetes in Brazil: Brazilian Type 1 Diabetes Study Group. **Diabetol Metab Syndr**, v. 4, n. 1, p. 44, 2012.

HARDOUIN, P.; PANSINI, V.; CORTET, B. Bone marrow fat. **Joint Bone Spine**, v. 81, n. 4, p. 313-9, 2014.

HATIPOGLU, H. G.; SELVI, A.; CILIZ, D.; YUKSEL, E. Quantitative and diffusion MR imaging as a new method to assess osteoporosis. **AJNR Am J Neuroradiol**, v. 28, n. 10, p. 1934-7, 2007.

HIRAO, M. et al. Response of serum carboxylated and undercarboxylated osteocalcin to alendronate monotherapy and combined therapy with vitamin K2 in postmenopausal women. **J Bone Miner Metab.** v. 26, n.3, p.:260-4, 2008.

HOUGH, F. S. et al. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Mechanisms and evaluation of bone fragility in type 1 diabetes mellitus. **Eur J Endocrinol**, v. 174, n. 4, p. R127-38, 2016.

HUNTER, G. R.; PLAISANCE, E. P.; FISHER, G. Weight loss and bone mineral density. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 21, n. 5, p. 358-62, 2014.

IDLEVICH, A.; SATO, K.; BARON, R. What are the effects of leptin on bone and where are they exerted? **J Bone Miner Res**, v. 28, n. 1, p. 18-21, 2013.

ISERN, J.; MÉNDEZ-FERRER, S. Stem cell interactions in a bone marrow niche. **Curr Osteoporos Rep**, v. 9, n. 4, p. 210-8, 2011.

IWANIEC, U. T.; TURNER, R. T. Influence of body weight on bone mass, architecture and turnover. **J Endocrinol.** v.230, n.3, p.R115-30, 2016.

JACOB, A. N.; ADAMS-HUET, B.; RASKIN, P. The visceral and subcutaneous fat changes in type 1 diabetes: a pilot study. **Diabetes Obes Metab**, v. 8, n. 5, p. 524-30, 2006.

JACOB, A. N.; SALINAS, K.; ADAMS-HUET, B.; RASKIN, P. Potential causes of weight gain in type 1 diabetes mellitus. **Diabetes Obes Metab**, v. 8, n. 4, p. 404-11, 2006.

KALAITZOGLU, E. et al. Effects of Type 1 Diabetes on Osteoblasts, Osteocytes, and Osteoclasts. **Curr Osteoporos Rep**, v. 14, n. 6, p. 310-319, 2016.

KANAZAWA, I. Adiponectin in metabolic bone disease. **Curr Med Chem**, v. 19, n. 32, p. 5481-92, 2012.

KARIM, L.; BOUXSEIN, M. L. Effect of type 2 diabetes-related non-enzymatic glycation on bone biomechanical properties. **Bone**, v. 82, p. 21-7, 2016.

KARSENTY, G. Bone endocrine regulation of energy metabolism and male reproduction. **C R Biol**, v. 334, n. 10, p. 720-4, 2011.

KARSENTY, G.; OURY, F. The central regulation of bone mass, the first link between bone remodeling and energy metabolism. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 11, p. 4795-801, 2010.

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

KAYATH, M. J.; TAVARES, E. F.; DIB, S. A.; VIEIRA, J. G. Prospective bone mineral density evaluation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **J Diabetes Complications**, v. 12, n. 3, p. 133-9, 1998.

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

LAZARENKO, O. P. et al. Rosiglitazone induces decreases in bone mass and strength that are reminiscent of aged bone. **Endocrinology**, v. 148, n. 6, p. 2669-80, 2007.

LEBOVITZ, H. E. Insulin: potential negative consequences of early routine use in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**. v.34, Suppl 2:S225-30, 2011.

LEE, J. J. et al. Adipose Tissue Depots and Their Cross-Sectional Associations With Circulating Biomarkers of Metabolic Regulation. **J Am Heart Assoc**, v. 5, n. 5, 2016.

LEWIECKI, E. M. et al. International Society for Clinical Densitometry 2007 Adult and Pediatric Official Positions. **Bone**, v. 43, n. 6, p. 1115-21, 2008.

LIU, L. L. et al. Prevalence of overweight and obesity in youth with diabetes in USA: the SEARCH for Diabetes in Youth study. **Pediatr Diabetes**, v. 11, n. 1, p. 4-11, 2010.

LLAURADÓ, G. et al. Liver fat content and hepatic insulin sensitivity in overweight patients with type 1 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 100, n. 2, p. 607-16, 2015.

LOCASCIO, S. A.; SPINELLI, J.; KURTZ, J. Hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of autoimmunity in type 1 diabetes. **Curr Stem Cell Res Ther**, v. 6, n. 1, p. 29-37, 2011.

LUO, X. H. et al. Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway. **J Bone Miner Res**, v. 21, n. 10, p. 1648-56, 2006.

MACIEL, J. G. et al. Marrow Fat Quality Differences by Sex in Healthy Adults. **J Clin Densitom**, n. e27637728, 2016.

MADEIRA, E. et al. Lean mass as a predictor of bone density and microarchitecture in adult obese individuals with metabolic syndrome. **Bone**, v. 59, p. 89-92, 2014.

MAÏMOUN, L. et al. Impact of obesity on bone mass throughout adult life: Influence of gender and severity of obesity. **Bone**, v.90, p.23–30, 2016.

MAJEWSKA, K. A. et al. Serum leptin and adiponectin levels in children with type 1 diabetes mellitus - Relation to body fat mass and disease course. **Adv Med Sci**, v. 61, n. 1, p. 117-22, 2016.

MARTIN, A. et al. Opposite effects of leptin on bone metabolism: a dose-dependent balance related to energy intake and insulin-like growth factor-I pathway. **Endocrinology**, v. 148, n. 7, p. 3419-25, 2007.

MARTIN, L. M.; MCCABE, L. R. Type I diabetic bone phenotype is location but not gender dependent. **Histochem Cell Biol**, v. 128, n. 2, p. 125-33, 2007.

MCCABE, L. R. Understanding the pathology and mechanisms of type I diabetic bone loss. **J Cell Biochem**, v. 102, n. 6, p. 1343-57, 2007.

MERGER, S. R. et al. Prevalence and comorbidities of double diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 119, p. 48-56, 2016.

MILIĆ, S.; LULIĆ, D.; ŠTIMAC, D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. **World J Gastroenterol**, v. 20, n. 28, p. 9330-7, 2014.

MISRA, M. et al. Relationships between serum adipokines, insulin levels, and bone density in girls with anorexia nervosa. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 6, p. 2046-52, 2007.

MOERMAN, E. J.; TENG, K.; LIPSCHITZ, D. A.; LECKA-CZERNIK, B. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. **Aging Cell**, v. 3, n. 6, p. 379-89, 2004.

MOTYL, K.; MCCABE, L. R. Streptozotocin, type I diabetes severity and bone. **Biol Proced Online**, v. 11, p. 296-315, 2009.

MOTYL, K. J.; MCCAULEY, L. K.; MCCABE, L. R. Amelioration of type I diabetes-induced osteoporosis by parathyroid hormone is associated with improved osteoblast survival. **J Cell Physiol**, v. 227, n. 4, p. 1326-34, 2012.

MOTYL, K. J.; ROSEN, C. J. Understanding leptin-dependent regulation of skeletal homeostasis. **Biochimie**, v. 94, n. 10, p. 2089-96, 2012.

NAPOLI, N. et al. Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. **Nat Rev Endocrinol**, 2016.

NAVEIRAS, O. et al. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. **Nature**, v. 460, n. 7252, p. 259-63, 2009.

NEUMANN, T. et al. High serum pentosidine but not esRAGE is associated with prevalent fractures in type 1 diabetes independent of bone mineral density and glycaemic control. **Osteoporos Int**, v. 25, n. 5, p. 1527-33, 2014.

NG, K. W. Regulation of glucose metabolism and the skeleton. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 75, n. 2, p. 147-55, 2011.

NTZOUVANI, A. et al. Reduced circulating adiponectin levels are associated with the metabolic syndrome independently of obesity, lipid indices and serum insulin levels: a cross-sectional study. **Lipids Health Dis**, v. 15, n. 1, p. 140, 2016.

NUTTALL, M. E. et al. Adipocytes and the regulation of bone remodeling: a balancing act. **Calcif Tissue Int**, v. 94, n. 1, p. 78-87, 2014.

OSHIMA, K. et al. Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 331, n. 2, p. 520-6, 2005.

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

PAULA, F. J.; LANNA, C. M.; SHUHAMA, T.; FOSS, M. C. Effect of metabolic control on parathyroid hormone secretion in diabetic patients. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 9, p. 1139-45, 2001.

PAULA, F. J.; ROSEN, C. J. Obesity, diabetes mellitus and last but not least, osteoporosis. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 54, n. 2, p. 150-7, 2010.

PEREIRA, F. A. et al. Impact of marked weight loss induced by bariatric surgery on bone mineral density and remodeling. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, n. 4, p. 509-17, 2007.

PEREIRA, R. I. et al. Adiponectin dysregulation and insulin resistance in type 1 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 4, p. E642-7, 2012.

PIROT, P.; CARDOZO, A. K.; EIZIRIK, D. L. Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 52, n. 2, p. 156-65, 2008.

POLSKY, S.; ELLIS, S. L. Obesity, insulin resistance, and type 1 diabetes mellitus. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 22, n. 4, p. 277-82, 2015.

POURHASSAN, M. et al. Impact of weight loss-associated changes in detailed body composition as assessed by whole-body MRI on plasma insulin levels and homeostatis model assessment index. **Eur J Clin Nutr**, 2016.

PREMAOR, M. O. et al. The association between fracture site and obesity in men: a population-based cohort study. **J Bone Miner Res**, v. 28, n. 8, p. 1771-7, 2013.

PREMAOR, M. O. et al. Risk factors for nonvertebral fracture in obese older women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 8, p. 2414-21, 2011.

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

RINKER, T. E. et al. Interactions between mesenchymal stem cells, adipocytes, and osteoblasts in a 3D tri-culture model of hyperglycemic conditions in the bone marrow microenvironment. **Integr Biol (Camb)**, v. 6, n. 3, p. 324-37, 2014.

RODACKI, M.; MILECH, A.; OLIVEIRA, J. E. [C-peptide residual secretion makes difference on type 1 diabetes management?]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 52, n. 2, p. 322-33, 2008.

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

ROSEN, C. J.; KLIBANSKI, A. Bone, fat, and body composition: evolving concepts in the pathogenesis of osteoporosis. **Am J Med**, v. 122, n. 5, p. 409-14, 2009.

ROSEN, C. J.; MOTYL, K. J. No bones about it: insulin modulates skeletal remodeling. **Cell**, v. 142, n. 2, p. 198-200, 2010.

ROSENGREN, A. H.; RENSTRÖM, E. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in type 1-diabetes. **Islets**, v. 1, n. 1, p. 81-3, 2009.

ROSS, A. C. et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 1, p. 53-8, 2011.

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

SADIE-VAN GIJSEN, H. et al. Depot-specific and hypercaloric diet-induced effects on the osteoblast and adipocyte differentiation potential of adipose-derived stromal cells. **Mol Cell Endocrinol**, v. 348, n. 1, p. 55-66, 2012.

SAITO, M.; FUJII, K.; MORI, Y.; MARUMO, K. Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats. **Osteoporos Int**, v. 17, n. 10, p. 1514-23, 2006.

SATTAR, N.; GILL, J. M. Type 2 diabetes as a disease of ectopic fat? **BMC Med**, v. 12, p. 123, 2014.

SCHAFER, A. L. et al. Change in undercarboxylated osteocalcin is associated with changes in body weight, fat mass, and adiponectin: parathyroid hormone (1-84) or alendronate therapy

in postmenopausal women with osteoporosis (the PaTH study). **J Clin Endocrinol Metab**, v.96, n.12, p.E1982-9, 2011.

SCHWARTZ, A. V. et al. Vertebral bone marrow fat associated with lower trabecular BMD and prevalent vertebral fracture in older adults. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, n. 6, p. 2294-300, 2013.

SHANBHOGUE, V. V.; MITCHELL, D. M.; ROSEN, C. J.; BOUXSEIN, M. L. Type 2 diabetes and the skeleton: new insights into sweet bones. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 4, n. 2, p. 159-73, 2016.

SHEN, Y.; NILSSON, S. K. Bone, microenvironment and hematopoiesis. **Curr Opin Hematol**, v. 19, n. 4, p. 250-5, 2012.

SLADE, J. M.; COE, L. M.; MEYER, R. A.; MCCABE, L. R. Human bone marrow adiposity is linked with serum lipid levels not T1-diabetes. **J Diabetes Complications**, v. 26, n. 1, p. 1-9, 2012.

SNARSKI, E. et al. Independence of exogenous insulin following immunoablation and stem cell reconstitution in newly diagnosed diabetes type I. **Bone Marrow Transplant**, v. 46, n. 4, p. 562-6, 2011.

STARUP-LINDE, J. Diabetes, biochemical markers of bone turnover, diabetes control, and bone. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 4, p. 21, 2013.

STARUP-LINDE, J. et al. Bone structure and predictors of fracture in type 1 and type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, p. jc20153882, 2016.

TAKEDA, S. et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. **Cell**, v. 111, n. 3, p. 305-17, 2002.

TEIJEIRA-FERNANDEZ, E. et al. Diabetic and nondiabetic patients express similar adipose tissue adiponectin and leptin levels. **Int J Obes (Lond)**, v. 34, n. 7, p. 1200-8, 2010.

THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. **N Engl J Med**, v. 329, n. 14, p. 977-86, 1993.

THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. **Ann Intern Med**, v. 128, n. 7, p. 517-23, 1998.

THRAILKILL, K. M. et al. Determinants of undercarboxylated and carboxylated osteocalcin concentrations in type 1 diabetes. **Osteoporos Int**, v. 23, n. 6, p. 1799-806, 2012.

TSATSOULIS, A.; MANTZARIS, M. D.; BELLOU, S.; ANDRIKOULA, M. Insulin resistance: an adaptive mechanism becomes maladaptive in the current environment - an evolutionary perspective. **Metabolism**, v. 62, n. 5, p. 622-33, 2013.

TSENTIDIS, C. et al. Higher levels of s-RANKL and osteoprotegerin in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus may indicate increased osteoclast signaling and predisposition to lower bone mass: a multivariate cross-sectional analysis. **Osteoporos Int**, v. 27, n. 4, p. 1631-43, 2016.

TUOMINEN, J. T.; IMPIVAARA, O.; PUUKKA, P.; RÖNNEMAA, T. Bone mineral density in patients with type 1 and type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 22, n. 7, p. 1196-200, 1999.

TURNER, R. T. et al. Peripheral leptin regulates bone formation. **J Bone Miner Res**, v. 28, n. 1, p. 22-34, 2013.

VAID, S.; HANKS, L.; GRIFFIN, R.; ASHRAF, A. P. Body mass index and glycemic control influence lipoproteins in children with type 1 diabetes. **J Clin Lipidol**, v. 10, n. 5, p. 1240-7, 2016.

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

VOLTARELLI, J. C. et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for type 1 diabetes. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1150, p. 220-9, 2008.

VOLTARELLI, J. C. et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. **JAMA**, v. 297, n. 14, p. 1568-76, 2007.

WANG, F. et al. Deficiency of adiponectin protects against ovariectomy-induced osteoporosis in mice. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68497, 2013.

WEI, J.; FLAHERTY, S.; KARSENTY, G. Searching for additional endocrine functions of the skeleton: genetic approaches and implications for therapeutics. **Expert Rev Endocrinol Metab**, v. 10, n. 4, p. 413-424, 2015.

WILLIAMS, G. A. et al. In vitro and in vivo effects of adiponectin on bone. **Endocrinology**, v. 150, n. 8, p. 3603-10, 2009.

WU, L.; PARHOFER, K. G. Diabetic dyslipidemia. **Metabolism**, v. 63, n. 12, p. 1469-79, 2014.

YEUNG, D. K. et al. Osteoporosis is associated with increased marrow fat content and decreased marrow fat unsaturation: a proton MR spectroscopy study. **J Magn Reson Imaging**, v. 22, n. 2, p. 279-85, 2005.

ZANATTA, L. C.; BOGUSZEWSKI, C. L.; BORBA, V. Z.; KULAK, C. A. Osteocalcin, energy and glucose metabolism. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 58, n. 5, p. 444-51, 2014.

ZHAO, Y. et al. Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor sitagliptin maintains β -cell function in patients with recent-onset latent autoimmune diabetes in adults: one year prospective study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 99, n. 5, p. E876-80, 2014.

ZHUKOUSKAYA, V. V. et al. Prevalence of morphometric vertebral fractures in patients with type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 36, n. 6, p. 1635-40, 2013.

APÊNDICES

Apêndice 1. Avaliação antropométrica complementar.

Para se realizar a medida de perímetro de cintura (cm) uma fita métrica não extensível foi posicionada no ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca (Kamimura et al, 2006) e a avaliação das pregas cutâneas (tricipital, bicipital, subescapular, supra ilíaca) da marca Lange® para estimativa do percentual corpóreo. Observou-se que não houve evidências de diferença significativa entre os grupos de estudo, mostrando que os grupos são homogêneos em relação ao perímetro de cintura (tabela 1.1 e 1.2; figura 1.1). O perímetro de cintura foi elevado em 46% dos controles (homem=7; mulher=4), 57% nos DM1 em insulinoterapia convencional (homem=5; mulher=8) e 11% nos DM1-TCTH (homem=0; mulher=1), considerando a classificação para síndrome metabólica (SM) da Federação Internacional de Diabetes (IDF) sobre a medida de perímetro de cintura (homen: ≥ 90 cm e mulher: ≥ 80 cm) (ALBERTI et al., 2006). Além disso, verificou-se a concordância de métodos (pregas cutâneas *versus* densitometria óssea) para cálculo do percentual de gordura corporal, calculado pelo coeficiente de correlação de concordância de Lin. Observa-se uma concordância alta entre os métodos (78,5%) (tabela 1.3 e 2.4; figura 1.2).

Tabela 1.1 Descrição do perímetro de cintura por grupo.

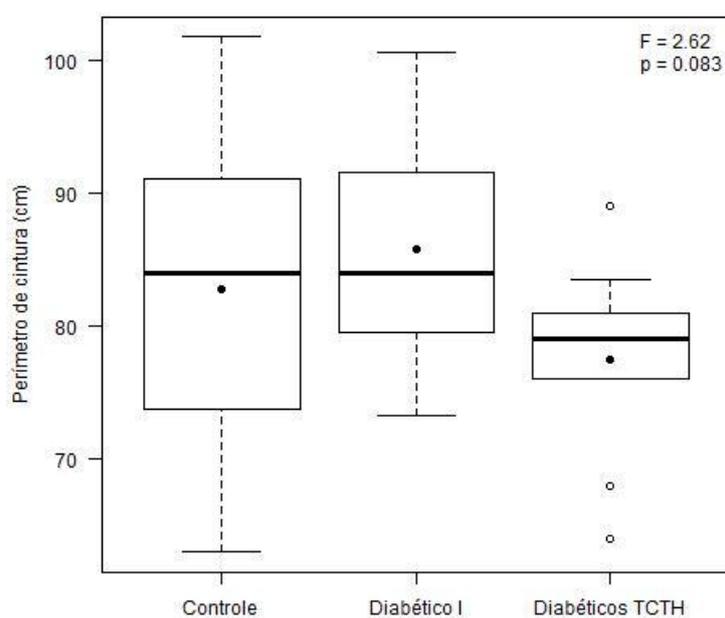
Grupo	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Controle	24	82,76	10,69	63	83,9	101,7
DM1	22	85,76	8,02	73.2	84	100,5
DM1-TCTH	9	77,44	7,6	64	79	89

Legenda: desvio-padrão (DP); transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH).

Tabela 1.2 Modelo ANOVA one-way para comparação do perímetro de cintura entre grupos.

Fonte de Variação	GL	SQ	MQ	Valor F	Valor p
Modelo	2	446,75	223,38	2,62	0,083
Erro	52	4440,49	85,39		
Total	54	4887,25			

Legenda: grau de liberdade (GL); soma de quadrados (SQ); média de quadrados (MQ).

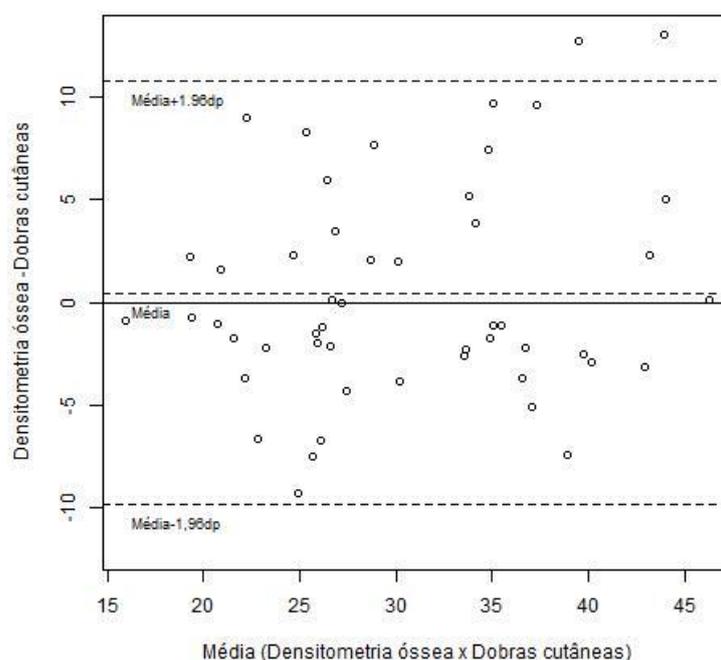
**Figura 1.1** Boxplot e o respectivo resultado da Anova para variável perímetro de cintura.**Tabela 1.3** Descrição do percentual de gordura por dois métodos de estimação, nos indivíduos em estudo com ambas medidas estimadas.

Método	n	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
Dobras cutâneas	50	30,3	7,5	16,4	29,5	46,2
Densitometria óssea	50	30,8	8,5	15,5	29,6	50,4

Legenda: desvio-padrão (DP).

Tabela 1.4 Coeficiente de correlação de concordância de Lin.

Coeficiente de Lin	Intervalo de confiança	
	IC (95%)	
0,7852	0,6495	0,8724

**Figura 1.2** Gráfico de Bland e Altman: concordância de métodos (pregas cutâneas *versus* densitometria óssea).**REFERÊNCIAS:**

KAMIMURA, M.A.; BAXMANN, A.; SAMPAIO, L.R.; CUPPARI, L. Avaliação Nutricional in CUPPARI, L. **Nutrição Clínica no Adulto**. 2ª edição. Barueri: Ed. Manole, 2005.

ALBERTI, G.; ZIMMET, P. SHAW, J.; GRUNDY, S. et al. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. International Diabetes Federation, 2006.

Apêndice 2. Análise de frequência absoluta e relativa do Índice de Massa Corporal (IMC) por grupo.

Tabela 2.1 Frequência absoluta e relativa das faixas de classificação do Índice de Massa Corporal (IMC) por grupos.

Faixas de classificação do IMC	Controle (n=24)		DM1 (n=23)		DM1-TCTH (n=9)	
	n	%	n	%	n	%
< 18,49 Kg/m² (Baixo peso)	2	8	0	0	0	0
18,5 – 24,9 Kg/m² (Eutrofia)	13	54	9	39	7	78
25,0 – 29,9 Kg/m² (Sobrepeso)	8	34	13	57	2	22
30,0 – 34,9 Kg/m² (Obesidade grau I)	1	4	1	4	0	0
35,0 – 39,9 Kg/m² (Obesidade grau II)	0	0	0	0	0	0
≥ 40 Kg/m² (Obesidade grau III)	0	0	0	0	0	0
Total	24	100	23	100	9	100

Legenda: transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH); índice de massa corporal (IMC).

Apêndice 3. Medicamentos utilizados pelos voluntários recrutados e sua frequência de uso.

Tabela 3.1 Tipos de medicamentos utilizados pelos voluntários dos grupos de estudo.

Medicamento		Frequência de medicamentos					
Nome	Tipo	Controle		DM1		DM1-TCTH	
		n	%	n	%	n	%
Ácido Acetilsalicílico (AAS)	Anti-inflamatórios não-esteroides (AINE)	0	0	1	5,5%	0	0
Aciclovir	Nucleosídeo sintético análogo da purina	0	0	0	0	1	33,3%
Alondipina	Molécula do grupo dos bloqueadores dos canais de cálcio (Ca ²⁺)	0	0	1	5,5%	0	0
Aplause	Fitoterápico (<i>Actaea racemosa L.</i>)	0	0	1	5,5%	0	0
Captopril	Inibidor da enzima conversora da angiotensina I (ECA I)	0	0	1	5,5%	0	0
Depakene	Valproato de sódio	1	16,6%	0	0	0	0
Domperidona	Antidopaminérgico, (modificadores da motilidade gastrointestinal)	0	0	1	5,5%	0	0
Enalapril	Inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA)	0	0	1	5,5%	0	0
Finasterida	Antiandrógeno inibidor da 5-alfarredutase	0	0	1	5,5%	0	0
Ginseng	Raiz medicinal	1	16,6%	0	0	0	0
Labirin	Dicloridrato de betaistina	0	0	1	5,5%	0	0

Nome	Medicamento Tipo	Frequência de medicamento					
		Controle		DM1		DM1-TCTH	
		n	%	n	%	n	%
Losartana	Antagonistas dos receptores da angiotensina (ARAs)	1	16,6%	1	5,5%	0	0
Nortriptilina	Cloridrato de nortriptilina	1	16,6%	2	11,1%	0	0
Omeprazol	Inibidor de bomba de próton	1	16,6%	4	22,2%	0	0
Pantoprazol		0	0	1	5,5%	0	0
Sinvastatina	Estatina (inibidor da hidroximetilglutaril coenzima A redutase)	1	16,6%	1	5,5%	0	0
Tâmisa 20	Contraceptivo oral de baixa dose (75 mcg gestodeno + 20 mcg etinilestradiol)	0	0	1	5,5%	0	0
Trezor	Rosuvastatina cálcica (inibidor hidroximetilglutaril coenzima A redutase)	0	0	0	0	1	33,3%
Vitamina D		0	0	0	0	1	33,3%

Legenda: Diabetes Melito do tipo 1 (DM1); transplante de célula tronco-hematopoiética (TCTH).

Apêndice 4. Tabelas com modelos de regressão linear múltipla considerando como variáveis dependentes ou resposta a DMO e o tecido adiposo da medula óssea (TAMO) da vertebra L3.

Tabela 4.1 Regressão linear múltipla considerando como variável dependente/resposta DMO do quadril total (g/cm^2) – modelo 1.

Parâmetro	GL	Parâmetro	EP	Valor t	Valor p
Intercepto	1	0,768	0,142	5,42	<0,0001
TAS (mm^2)	1	0,0000028	0,0000021	1,3	0,20
TAV (mm^2)	1	-0,0000038	0,0000062	-0,61	0,55
LIH (%)	1	-0,011	0,005	-2,11	0,04
Adiponectina ($\mu\text{g/mL}$)	1	-0,0016300	0,0020600	-0,79	0,43
Leptina sérica (ng/mL)	1	-0,002	0,002	-1,09	0,28
Massa muscular – corpo total (kg)	1	0,017	0,004	4,57	<0,0001
Idade (anos)	1	-0,001	0,002	-0,62	0,54
IMC (Kg/m^2)	1	-0,013	0,009	-1,49	0,14
HbA1c (%)	1	-0,010	0,008	-1,23	0,22
Gênero (M=1 / F=0)	1	-0,130	0,067	-1,93	0,06

$$R^2 = 0,58$$

Legenda: grau de liberdade (GL); erro padrão (EP); tecido adiposo subcutâneo (TAS); tecido adiposo visceral (TAV); lipídio intra-hepático (LIH), índice de massa corporal (IMC); hemoglobina glicada (HbA1c).

Tabela 4.2 Regressão linear múltipla considerando como variável dependente/resposta DMO da coluna lombar (L1-L4) (g/cm²) – modelo 1.

Parâmetro	GL	Parâmetro	EP	Valor t	Valor p
Intercepto	1	0,830	0,147	5,63	<0,0001
TAS (mm ²)	1	0,0000042	0,0000021	1,99	0,053
TAV (mm ²)	1	0,0000019	0,0000064	0,3	0,77
LIH (%)	1	-0,011	0,005	-2,02	0,049
Adiponectina (µg/mL)	1	0,0002748	0,0020500	0,13	0,89
Leptina sérica (ng/mL)	1	-0,002	0,002	-1,43	0,16
Massa muscular – corpo total (kg)	1	0,016	0,004	4,44	<0,0001
TAMO - fração total (%)	1	-0,002	0,002	-1,42	0,16
Idade (anos)	1	0,002	0,002	1,03	0,31
IMC (Kg/m ²)	1	-0,015	0,009	-1,69	0,09
HbA1c (%)	1	-0,014	0,008	-1,67	0,10
Gênero (M=1 / F=0)	1	-0,224	0,066	-3,38	0,0015

$$R^2 = 0,42$$

Legenda: grau de liberdade (GL); erro padrão (EP); tecido adiposo subcutâneo (TAS); tecido adiposo visceral (TAV); lipídio intra-hepático (LIH), índice de massa corporal (IMC); hemoglobina glicada (HbA1c).

Tabela 4.3 Regressão linear múltipla considerando como variável dependente/resposta DMO do corpo total (g/cm²) – modelo 1.

Parâmetro	GL	Parâmetro	EP	Valor t	Valor p
Intercepto	1	0,998	0,120	8,29	<0,0001
TAS (mm ²)	1	0,0000019	0,0000018	1,08	0,29
TAV (mm ²)	1	0,0000042	0,0000053	0,8	0,43
LIH (%)	1	-0,007	0,005	-1,55	0,13
Adiponectina (µg/mL)	1	0,0015900	0,0017500	0,91	0,37
Leptina sérica (ng/mL)	1	0,000	0,001	-0,2	0,84
Massa muscular – corpo total (kg)	1	0,011	0,003	3,64	0,0007
Idade (anos)	1	-0,002	0,002	-1,12	0,27
IMC (Kg/m ²)	1	-0,013	0,007	-1,76	0,08
HbA1c (%)	1	0,002	0,007	0,31	0,76
Gênero (M=1 / F=0)	1	-0,031	0,057	-0,55	0,59

$$R^2 = 0,51$$

Legenda: grau de liberdade (GL); erro padrão (EP); tecido adiposo subcutâneo (TAS); tecido adiposo visceral (TAV); lipídio intra-hepático (LIH), índice de massa corporal (IMC); hemoglobina glicada (HbA1c).

Tabela 4.3.1 Regressão linear múltipla considerando como variável dependente/resposta DMO do corpo total (g/cm²) – modelo 2.

Parâmetro	GL	Parâmetro	EP	Valor t	Valor p
Intercepto	1	0,890	0,073	12,18	<0,0001
Adiponectina (µg/mL)	1	0,0021400	0,0013100	1,63	0,11
Massa muscular – corpo total (kg)	1	0,008	0,001	6,01	<0,0001
Idade (anos)	1	-0,003	0,001	-2,37	0,02

$$R^2 = 0,45$$

Legenda: grau de liberdade (GL); erro padrão (EP).

Tabela 4.4 Regressão linear múltipla considerando como variável dependente/resposta o tecido adiposo da medula óssea (TAMO) -fração total (%) – modelo 1.

Parâmetro	GL	Parâmetro	EP	Valor t	Valor p
Intercepto	1	15,833	17,595	0,9	0,37
TAS (mm ²)	1	-0,00004	0,00016	-0,27	0,79
TAV (mm ²)	1	0,00087	0,00067	1,3	0,20
LIH (%)	1	0,226	0,498	0,45	0,65
IGF-1 (ng/mL)	1	-0,009	0,021	-0,42	0,68
Colesterol	1	0,087	0,050	1,73	0,09
Triglicérides	1	-0,014	0,045	-0,32	0,75
D-OC (ng/mL)	1	0,014	0,315	0,04	0,97
Idade (anos)	1	0,124	0,180	0,69	0,49
IMC (Kg/m ²)	1	-0,073	0,602	-0,12	0,90
HbA1c (%)	1	0,212	0,611	0,35	0,73
Gênero (M=1 / F=0)	1	-0,436	3,104	-0,14	0,89

$$R^2 = 0,25$$

Legenda: grau de liberdade (GL); erro padrão (EP); tecido adiposo subcutâneo (TAS); tecido adiposo visceral (TAV); lipídio intra-hepático (LIH), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1); osteocalcina parcialmente descarboxilada (D-OC); índice de massa corporal (IMC); hemoglobina glicada (HbA1c).

Tabela 4.5 Regressão linear múltipla considerando como variável dependente/resposta o tecido adiposo da medula óssea (TAMO) -fração saturada (%) – modelo 1.

Parâmetro	GL	Parâmetro	EP	Valor t	Valor p
Intercepto	1	6,922	11,832	0,58	0,56
TAS (mm ²)	1	-0,00001	0,00011	-0,06	0,95
TAV (mm ²)	1	0,00027	0,00045	0,6	0,55
LIH (%)	1	0,362	0,335	1,08	0,29
IGF-1 (ng/mL)	1	-0,012	0,014	-0,86	0,39
Colesterol	1	0,072	0,034	2,13	0,04
Triglicérides	1	-0,017	0,030	-0,55	0,58
D-OC (ng/mL)	1	0,107	0,212	0,51	0,62
Idade (anos)	1	0,119	0,121	0,98	0,33
IMC (Kg/m ²)	1	-0,127	0,405	-0,31	0,75
HbA1c (%)	1	0,313	0,411	0,76	0,45
Gênero (M=1 / F=0)	1	1,803	2,087	0,86	0,39

$$R^2 = 0,30$$

Legenda: grau de liberdade (GL); erro padrão (EP); tecido adiposo subcutâneo (TAS); tecido adiposo visceral (TAV); lipídio intra-hepático (LIH), índice de massa corporal (IMC); hemoglobina glicada (HbA1c).

Tabela 4.6 Regressão linear múltipla considerando como variável dependente/resposta o tecido adiposo da medula óssea (TAMO) - fração insaturada (%) – modelo 1.

Parâmetro	GL	Parâmetro	EP	Valor t	Valor p
Intercepto	1	3,377	2,441	1,38	0,17
TAS (mm ²)	1	0,00001	0,00002	0,43	0,67
TAV (mm ²)	1	0,00005	0,00009	0,56	0,58
LIH (%)	1	-0,014	0,069	-0,2	0,84
IGF-1 (ng/mL)	1	0,005	0,003	1,75	0,09
Colesterol	1	0,002	0,007	0,28	0,78
Triglicérides	1	0,005	0,006	0,75	0,46
D-OC (ng/mL)	1	0,030	0,044	0,68	0,50
Idade (anos)	1	0,029	0,025	1,17	0,25
IMC (Kg/m ²)	1	-0,129	0,084	-1,54	0,13
HbA1c (%)	1	-0,019	0,085	-0,22	0,83
Gênero (M=1 / F=0)	1	-1,417	0,431	-3,29	0,002

$$R^2 = 0,37$$

Legenda: grau de liberdade (GL); erro padrão (EP); tecido adiposo subcutâneo (TAS); tecido adiposo visceral (TAV); lipídio intra-hepático (LIH), índice de massa corporal (IMC); hemoglobina glicada (HbA1c).

Apêndice 5. Projeto experimental com modelo animal com DM1 farmacologicamente induzido.

Os resultados do projeto intitulado “*High Fat Diet rich in Medium Chain Fatty Acid Rescued Trabecular and Cortical Bone Loss and Reduces Marrow Adipose Tissue (MAT) in Streptozotocin-induced Type 1 Diabetic Mice*” que foi desenvolvido durante estágio no Maine Medical Center Research Institute (MMCRI), no laboratório do Dr. Clifford J. Rosen, com o suporte financeiro da FAPESP (nº 2014/14505-0). O trabalho está sob revisão na revista *Endocrinology* da Endocrine Society (ENDO).

High fat diet attenuates trabecular and cortical bone loss in male streptozotocin-induced type 1 diabetic mice

Adriana Lelis Carvalho^{1,2}, Victoria E. DeMambro¹, Anyonya Guntur¹, Phuong Le¹, Kenichi Nagano³, Roland Baron³, Francisco José Albuquerque de Paula², Clifford J. Rosen¹, Katherine J. Motyl^{1,4*}

¹Center for Clinical and Translational Research, Maine Medical Center Research Institute, Scarborough, Maine 04074.

² Internal Medicine Department, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Brazil.

³Department of Oral Medicine, Infection and Immunity, Harvard School of Dental Medicine, Harvard University, Boston, Massachusetts 02115.

⁴Center for Molecular Medicine, Maine Medical Center Research Institute, Scarborough, Maine 04074.

Abbreviated Title: High fat diet lessens bone loss in type 1 diabetes.

Key terms: Type 1 Diabetes Mellitus, Bone Mass, High Fat Diet, Bone Marrow Adipose Tissue.

Word count: 4,721

Number of figures and tables: 7 figures, 2 tables and 1 supplemental table.

**Address all correspondence and requests for reprints to:*

Dr. Katherine J. Motyl, Maine Medical Center Research Institute, 81 Research Drive, Scarborough, ME 04074–7205.

e-mail: motylk@mmc.org.

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose.

Contract grant number: This work was supported in part by NIH grants AR067858 to KJM, DK092759 to CJR, AR068095 to AG, NIGMS P30 GM106391 and NIH/NIGMS P30 GM103392. ALC received financial support from FAPESP (2013/09853-6 and 2014/14505-0). FJAP received financial support from CNPq (307901/2014-9) and FAPESP (2014/15864-3).

Abstract

There is a growing and alarming prevalence of obesity and the metabolic syndrome in type I diabetic patients (T1DM), particularly in adolescence. In general, low bone mass, a higher risk of fractures and increased marrow adipose tissue (MAT) are features of diabetic osteopathy in insulin deficient subjects. On the other hand, type 2 diabetes (T2DM) is associated with a normal or higher bone mass, a greater risk of peripheral fractures and no apparent changes in MAT. Therefore, in this study we sought to determine the effect of weight gain on bone turnover and lean mass in insulin deficient mice. We evaluated the impact of a 6-week high-fat (HFD) rich in medium chain fatty acids or low-fat diet (LFD) on bone mass and MAT in a streptozotocin (STZ)-induced model using male C57BL/6J mice at 8 weeks of age. Dietary intervention was initiated after diabetes confirmation. At the endpoint, lower non-fasting glucose level was observed in diabetic mice fed with high fat diet compared to diabetic mice fed the low fat diet (STZ-LFD). Compared to euglycemic controls, the STZ-LFD had marked polydipsia and polyphagia, as well as reduced lean mass, fat mass and bone parameters. Interestingly, STZ-HFD mice had higher bone mass, namely less cortical bone loss and greater trabecular bone mass than STZ-LFD. Thus, we found that a HFD, rich in medium chain fatty acids, protects against bone loss in a streptozotocin-induced T1DM mouse model. Whether this may also translate to T1DM patients who are overweight or obese in respect to maintenance of bone mass remains to be determined through longitudinal studies.

Introduction

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is associated with low bone mineral density (BMD) and increased fracture risk [1]. Several studies have shown that bone loss in T1DM occurs because of reduced bone formation, while the effects on bone resorption are less clear [2, 3]. There are several characteristics of T1DM that may have a significant impact on bone, such as hypoinsulinemia and high glucose levels [2, 4]. Due to the positive effects of insulin and IGF-1 on bone formation, decreased insulin signaling has been considered as one of the most critical factors in the pathogenesis of T1DM-bone loss [5]. However, mice with an osteoblast-specific knockout of insulin receptor only have a mild low bone mass phenotype in adult mice [6]. Moreover, adult mice with a global knockout of insulin receptor, made normoglycemic by knock in of the human insulin receptor in liver, brain and pancreas, also have a normal bone phenotype [7]. Hyperglycemia, on the other hand, can impair osteoblast differentiation in culture and elevated advanced glycation end products (AGES) have been associated with fractures in patients with T1DM [8, 9]. Moreover, high glucose levels have also been positively linked to greater marrow adiposity in non-diabetic women [10].

T1DM critically impacts whole body energy economy, leading to weight loss due to increased proteolysis and lipolysis. Bone catabolism is a well-known complication of weight loss and occurs because of an array of factors, including decreased mechanical loading and nutritional and hormonal changes [11-14]. In conditions of chronic (i.e., anorexia nervosa) as well as acute weight loss (i.e., bariatric surgery) a negative remodeling balance is a well-documented occurrence [15-17]. Low body weight is frequent clinical manifestation during the onset of T1DM [18]. However, recent publications have pointed out the alarming rise in obesity in T1DM individuals [19, 20]. In one prospective study, 18 years of follow-up showed that 20% of T1DM subjects enrolled in the study had gained at least 5 kg/m^2 while only 7% had lost at least 2 kg/m^2 . The number of overweight individuals increased in 47% during the period of the follow-up [20]. As a consequence, there has been a growing prevalence of abdominal obesity, insulin resistance and arterial hypertension among T1DM children and adults that paradoxically were previously considered to be pathognomonic of T2DM [21-23]. The increase in metabolic syndrome characteristics in T1DM patients appear to be an important risk factor for the development of macrovascular and microvascular comorbidities such as cardiovascular diseases, diabetic foot syndrome, nephropathy, and retinopathy, independently of glucose control [23]. However, the effect of high body weight or obesity on bone mass and bone turnover in T1DM is still unknown.

Obesity is characterized by excessive body fat accumulation and despite higher or normal BMD, fracture risk is also increased in obese subjects [24]. The intake of a diet rich in saturated fats is well-documented to be associated with greater body fat content, insulin resistance [25] and also with reduction of BMD [26, 27]. Hence, we sought to determine the impact of weight gain on bone mass in streptozotocin (STZ)-induced T1DM mice. We hypothesized that high fat feeding would not be able to counteract classical type 1 diabetic bone loss and may in fact make it worse. For this, we submitted eight-week-old male T1DM and control mice to 6-week high saturated fat diet (HFD) rich in medium chain fatty acid (MCFA) or low fat diet (LFD). In brief, although HFD is generally deleterious to bone, we found that HFD actually attenuated trabecular and cortical bone loss from STZ-induced diabetes, without significantly affecting insulin levels. Blood glucose was lower and body weights were higher in HFD-fed STZ mice compared to LFD-fed STZ mice, suggesting glycemic control and/or body weight played a protective role in Type I diabetic bone disease.

Material and Methods

The study protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committees (IACUC) of the Maine Medical Center Research Institute (MMCRI). All animals were maintained on a 14-h light and 10-h dark cycle in a barrier animal facility at MMCRI. Mice were given water and food (see below for detailed description of diets) *ad libitum* and housed 3-4 per cage. All mice had body weight measured weekly during the experiment.

Diabetes Induction and Dietary Intervention

Six-week-old male C57BL/6J mice were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). At 8 weeks of age, they were administered 5 daily intraperitoneal (IP) injections of streptozotocin (STZ) (50 mg/kg body weight in 0.1 M citrate buffer pH 4.5; Sigma-Aldrich) to induce diabetes or vehicle (0.1 M citrate buffer pH 4.5) injections. All mice received standard diet (2018 Teklad Global 18% Protein Rodent Diet, Harlan Laboratories) until diabetes confirmation. Twelve days after the first injection, non-fasting blood glucose levels were assessed using an Accu-Check Compact® glucometer (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). The blood glucose cut-off was 16.7 mmol/L (300 mg/dL) for including animals in STZ groups. Non-fasting glucose levels were also checked at the endpoint of the

study. After diabetes confirmation, mice were divided into four different groups for 6 weeks of diet intervention (Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, Supplemental Table I):

- I. **Control Low Fat Diet (CON-LFD):** mice injected with vehicle solution (n=11), then fed with custom formulated low fat diet (Research Diets D15022202) containing 11% Kcal from fat, and 73% Kcal from carbohydrate comprised of corn starch and an amount of sucrose matched with HFD.
- II. **Control High Fat Diet (CON-HFD):** mice injected with vehicle solution (n=11), then fed with a high fat diet (Research Diets D12331i) containing 58% Kcal from hydrogenated coconut oil, and 26% Kcal from sucrose.
- III. **STZ Low Fat Diet (STZ-LFD):** mice injected with STZ solution (n=9), then fed with custom formulated 11% kcal from fat diet (Research Diets D15022202).
- IV. **STZ High Fat Diet (STZ-HFD):** mice injected with STZ solution (n=14), then fed with 58% Kcal from fat diet (Research Diets D12331i).

Metabolic Cage System

One week before the end of the study, mice from CON-LFD (n=7), CON-HFD (n=7), STZ-LFD (n=6), and STZ-HFD (n=8) groups were placed individually into metabolic cages for 5 days to assess metabolic and behavioral measurements using the Promethion metabolic cage system (Sable Systems International, North Las Vegas, NV) located in the Physiology Core at MMCRI. Data acquisition and instrument control were performed using Meta Screen version 1.7.2.3, and the raw data obtained were processed with ExpeData version 1.5.4 (Sable Systems International, North Las Vegas, NV) using an analysis script detailing all aspects of data transformation [28].

Dual-energy X-ray absorptiometry (DXA)

Bone mineral density (aBMD), lean mass, and fat mass assessment were performed on each mouse by a PIXImus dual-energy X-ray densitometer (GE Lunar) at the baseline (0), 2 weeks from the baseline (1) and at the endpoint of the study (2). The PIXImus was calibrated daily with a mouse phantom provided by the manufacturer. Mice were placed ventral side down with each limb and tail positioned away from the body. Full-body scans were obtained, and the head was excluded from analyses because of concentrated mineral content in skull and teeth. X-ray absorptiometry data were processed and analyzed with Lunar PIXImus 2 (version 2.1) software [28].

Insulin Assay

Serum insulin levels were measured using a commercially available kit from Crystal Chem Inc. (Downers Grove, IL), according to the manufacturer's instructions. The assay sensitivity was 0.05 ng/mL. The intra- and inter-assay variability was ≤ 10 ng/mL. All measurements were performed in duplicate.

Micro-computed tomography (μ CT)

Micro-architecture of the distal trabecular bone and midshaft cortical bone of the femur was analyzed by μ CT (resolution 10 μ m, VivaCT-40, Scanco Medical AG, Bassersdorf, Switzerland). Measurements included bone volume/total volume (BV/TV), trabecular number (Tb.N.), trabecular thickness (Tb.Th.), trabecular separation (Tb.Sp.), and connectivity density (Conn.D). Cortical region scans at the midpoint of each femur, with an isotropic pixel size of 21 μ m and slice thickness of 21 μ m, enabled calculation of average bone area (BA), total cross-sectional area (TA), bone area/total area (BA/TA), and cortical thickness (Ct.Th.). All scans were analyzed using the software of the manufacturer (Scanco Medical AG, version 4.05) [28].

Histomorphometry analysis

Mice were intraperitoneally injected ip with calcein (20 mg/kg) and demeclocycline (20 mg/kg) on days 9 and 2 before sacrifice, respectively, to determine bone formation rate [29]. Left tibias were removed, placed in 70% ethanol and maintained in the dark at room temperature. Tibias were dehydrated with acetone and embedded in methyl methacrylate. Undecalcified 4- μ m-thick sections were obtained by microtome and stained with Von Kossa method for showing the mineralized bone. Consecutive section was left unstained for the analysis of fluorescence labeling and was stained with Toluidine Blue for the analysis of osteoblasts, osteoid and adipocytes. Another consecutive section was stained with tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and counterstained with Toluidine Blue for the analysis of osteoclasts. Bone histomorphometric analysis was performed in the proximal tibia under 200X magnification in a 0.9 mm high x 1.3 mm wide region 200 μ m away from the growth plate using OsteoMeasure analyzing software (Osteometrics Inc., Decatur, GA, USA). The structural parameters [bone volume (BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N) and trabecular separation (Tb.Sp)] were obtained from 3 consecutive sections and the

average from these 3 data was assigned as individual data. The structural, dynamic and cellular parameters were calculated and expressed according to the standardized nomenclature [30] as follows: bone volume (BV/TV, %), trabecular thickness (Tb.Th, μm), trabecular number (Tb.N, /mm), trabecular separation (Tb.Sp, μm), mineralizing surface per bone surface (MS/BS, %), mineral apposition rate (MAR, $\mu\text{m}/\text{day}$), bone formation rate per bone surface (BFR/BS, $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{year}$), bone formation rate per bone volume (BFR/BV, %/year), bone formation rate per trabecular volume (BFR/TV, %/ year), osteoblast surface (Ob.S/BS, %), osteoblast number per trabecular area (N.Ob/T.Ar, / mm^2), osteoblast number per bone perimeter (N.Ob/B.Pm, /mm), osteoid volume (OV/BV, %), osteoid surface (OS/BS, %), osteoid thickness (O.Th, μm), osteoclast surface (Oc.S/BS, %), osteoclast number per trabecular area (N.Oc/T.Ar, / mm^2) osteoclast number per bone perimeter (N.Oc/B.Pm, /mm), and eroded surface (ES/BS, %).

Histological and Immunohistochemical analysis

Pancreas and adipose tissues were placed in 10% neutral buffered formalin (Sigma-Aldrich) for 48 hours and then kept in 70% ethanol. Tissue sections of 5 μm were deparaffinized and dehydrated in a graded series (100% to 70%) of ethanol washes and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Langerhans islets were identified and counted using Image J software. Pancreas tissue sections were rinsed in boiled 10 mM citrate buffer solution (pH 6.0) for 20 minutes at room temperature. Sections were quenched for 60 minutes in 1% of 30% hydrogen peroxidase in PBS and washed in TNT wash buffer solution (Tris-buffer 2M, NaCl, Tween 20, dH₂O). A non-specific blocking solution (10% BSA, goat serum, and Triton X-100 BioRad® in PBS) was added and slides were incubated in humidified chamber for 60 minutes at 4°C. Later, sections were incubated with insulin antibody (primary antibody; Cell Signaling Technology®) diluted in blocking solution (1:50) overnight at 4°C. Slides were washed in TNT wash buffer and a secondary antibody (goat anti-rabbit IgG biotin labeled) diluted in blocking solution (1:200) was added for 30 minutes at room temperature and washed again. Next, slides were incubated Streptavidin-HRP diluted in blocking solution (SA-HRP; Perkin Elmer) (1:100) for 30 minutes at room temperature and sections were washed again. Then, Vector® DAB solution, a peroxidase substrate, was added and sections were checked under the microscope until pancreatic insulin expression by β -cells was properly visualized (brown signal). Slides were counterstained with hematoxylin solution Gill n°1 (Sigma-Aldrich).

Real-time PCR

Bone marrow was flushed out from the freshly dissected femur and flash frozen in liquid nitrogen separate from the cortical bone. Bone was crushed under liquid nitrogen conditions. Total RNA was prepared using the standard TRIzol (Sigma-Aldrich) method for tissues. cDNA was generated using the High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. mRNA expression analysis was carried out using an iQ SYBR Green Supermix with an iQ5 thermal cycler and detection system (Bio-Rad Laboratories). Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) was used as an internal standard control gene for all quantification [31]. Primers were designed and tested to be 95% to 100% efficient by PrimerDesign.

Statistical Analyses

Graphpad Prism® software was used to perform statistical tests. Data are presented as mean \pm SEM. Two-way ANOVA with Sidak post hoc test were performed after testing for normal distribution. Where noted, a Pearson correlation test was performed between main outcomes. $\alpha \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results

HFD reduced blood glucose levels in diabetic mice

All mice injected with STZ had high non-fasting glucose levels (>300 mg/dL or 16.7 mmol/L) 12 days after the first injection. Non-fasting glucose levels were still higher in the STZ groups compared to CON groups after 6 weeks of dietary intervention (Figure 1A). However, STZ mice fed with LFD exhibited significantly higher (>600 mg/dL or 33.3 mmol/L) glucose levels compared to those STZ mice fed with HFD (438 ± 70 mg/dL or 24.1 ± 3.9 mmol/L). There was no difference in glucose levels between CON groups fed with LFD or HFD (Figure 1A).

Body weight and Body Composition Analysis

As expected, STZ-LFD mice had significantly lower body weight and body weight gain compared to CON-LFD, and CON-HFD mice gained more weight than CON-LFD mice during the study. Interestingly, STZ-HFD gained body weight throughout the study, whereas

STZ-LFD mice did not (Figure 1B). There were no differences in body composition between groups at the baseline and at 2 weeks after baseline (data not shown). At the endpoint, fat mass was significantly reduced in both STZ groups compared to CON groups, and CON-HFD mice gained a greater amount of fat mass than CON-LFD mice (Figure 1C). However, lean mass was only reduced in STZ-LFD group compared to CON-LFD group. There was no difference in lean mass between STZ-HFD and CON-HFD mice and both CON groups (Figure 1D).

Effect of Dietary Intervention on Bone Mass and Marrow Adipocytes

In order to determine if the changes in blood glucose and body composition in the STZ groups impacted bone parameters, we addressed BMD by DXA and trabecular and cortical microarchitecture of the femur by microCT (Figure 2). It was observed that STZ-HFD had no temporal reduction in femoral aBMD (Δ value: 0.010 ± 0.007) during the study while the STZ-LFD mice had (Δ value: -0.001 ± 0.007) ($p=0.002$, STZ-LFD vs STZ-HFD Δ aBMD). At the endpoint, femoral aBMD and also BMC measurements were greater in STZ-HFD than in STZ-LFD mice, although still lower than CON mice (Figure 2B). MicroCT data also corroborated with DXA results showing that STZ-HFD did not lose as much cortical and trabecular bone as those STZ mice consuming LFD. Femoral cortical area fraction (Ct.Ar/Tt.Ar), cortical bone area (Ct.Ar), and cortical thickness (Ct.Th) parameters were significantly lower in the STZ-LFD group compared to the CON-LFD group. Surprisingly, there was no significant difference in these parameters between STZ-HFD and CON-HFD mice (Figure 2, C, D and F). HFD also significantly improved Ct.Ar /Tt.Ar and Ct.Th within the diabetic mouse groups.

Femoral trabecular bone volume fraction (BV/TV), trabecular number (Tb.N), and trabecular connectivity density (Conn.D) parameters were lower in both STZ groups compared to CON mice. However, STZ-HFD mice had a higher femoral trabecular BV/TV, thickness (Tb.Th), Conn.D, and Tb.N compared to STZ-LFD group (Figure 2, H, I, J and L). Structure model index (SMI) was higher in both STZ groups compared to CON groups but SMI was lower in STZ-HFD mice than in STZ-LFD mice (Figure 2K). Furthermore, femoral trabecular separation (Tb.Sp) was higher in the STZ groups compared to CON groups but those STZ consuming HFD had lower Tb.Sp compared to the STZ-LFD (data not shown).

In respect to expression of key skeletal genes, we observed that *runt-related transcription factor 2* (*Runx2*) bone expression was significantly reduced in the STZ-LFD

mice compared to CON-LFD group (Figure 3A), but there was no difference in *bone gamma-carboxyglutamate protein (Bglap)* mRNA expression between groups (Figure 3B). Both STZ groups exhibited higher *receptor activator of nuclear factor Kappa-B ligand (Rankl)* expression compared to CON groups (Figure 3C). However, *osteoprotegerin (Opg)* mRNA expression was only significant higher in the STZ-HFD group compared to CON-HFD group (Figure 3D).

Dynamic histomorphometric parameter analysis showed that mineralizing surface (MS) and bone formation rate (BFR) were lower in STZ-LFD group compared to CON-LFD. However, STZ and CON mice fed with HFD had a similar MS and BFR (Table 1). Additionally, osteoclast number (N.Oc) was higher in STZ-LFD compared to CON-LFD but it was not significant ($p=0.08$). However, eroded surface (ES/BS) was significantly higher in STZ-LFD compared to CON-LFD and there was no difference between STZ-HFD and CON-HFD. Moreover, histomorphometry data showed that dietary intervention had no significant effect on marrow adipocytes. Adipocyte volume (Ad.V/TV) had a tendency to be higher in STZ-LFD mice compared to CON-LFD mice but it was not significant ($p=0.07$) while adipocyte number had no difference between groups (Figure 4A, 4B and 4C). Also, there was no difference in *fatty acid binding protein 4 (Fabp4)* mRNA expression in the marrow adipose tissue between groups. Conversely, we did observe higher expression of *Adipoq* in STZ-LFD mice compared to CON-LFD and STZ-HFD group (Figure 4D and 4E).

HFD did not affect insulin levels in diabetic mice

Serum insulin levels were lower in STZ groups compared to Control groups at the endpoint of the study, as expected. The type of diet consumed (LFD vs. HFD) did not have any impact on serum insulin levels ($p=0.66$). In order to further characterize the effect of HFD on insulin status in STZ-diabetes, we performed immunohistochemistry (IHC) staining with insulin antibody. IHC analysis demonstrated that STZ mice had lower expression of insulin by pancreatic β -cells compared to the CON groups which corroborated with serum insulin levels data presented previously. However, there were no overt differences in islets or insulin staining between LFD and HFD STZ groups (Figure 5).

Metabolic and Behavioral Outcomes

Regarding behavioral evaluation, there was no difference in 24-hour wheel distance meters between groups (Figure 6A). STZ-LFD mice tended to walk less distance meters in

24-hour compared to CON-LFD but it was not significant ($p=0.14$) (Figure 6B). There was no other significant observation in behavioral parameters such as wheel meters run, wheel speed, % spent running, walking speed, % spent walking, % spent staying still, % spent sleeping, and hours of sleep (data not shown). Moreover, STZ-LFD mice had a higher expenditure energy (EE) compared to CON-LFD and STZ-HFD mice when it was adjusted by lean mass, and CON-HFD mice also had a higher adjusted EE compared to CON-LFD group (Figure 6C). Respiratory quotient (RQ) was different between CON and STZ mice fed with LFD. RQ value was similar between CON-HFD and both STZ groups which indicated the use of fat as an energy source (Figure 6D). Furthermore, STZ-LFD mice had greater water and food intake compared to CON-LFD. However, polydipsia and polyphagia were attenuated in STZ-HFD mice (Figure 7A and 7B). As expected, total calorie intake per body weight was significant higher in both STZ groups compared to CON groups, but STZ-HFD had lower total calorie intake than STZ-LFD mice (Figure 7C). Concerning macronutrients intake profile, STZ-LFD mice had a higher carbohydrate intake compared to CON-LFD and STZ-HFD mice (Figure 7D). On the other hand, STZ-HFD group had a greater fat intake than mice from CON-HFD and STZ-LFD groups (Figure 7E). Protein intake was higher in both STZ groups compared to CON groups, and STZ-LFD also had a greater protein consumed than STZ-HFD (Figure 7F).

Bone mass, body composition and marrow adipocytes

Body weight had no correlation with femoral aBMD in Control-HFD mice. In contrast, there was a positive correlation between body weight and femoral aBMD in the STZ groups (e.g. STZ-HFD group: $r=0.90/p<0.0001$; Table 2). Lean Mass was strongly correlated with femoral aBMD (e.g. Control-HFD: $r=0.80/p=0.003$; STZ-LFD: $r=0.82/p=0.005$; STZ-HFD: $r=0.89/p<0.0001$) and body fat mass was not correlated with femoral aBMD on any group of the study. However, we did observe a positive correlation between fat mass and femoral BMC in STZ-HFD ($r=0.60/p=0.02$). Yet, fat mass had an inverse correlation with femoral BMC in Control-HFD group but it was not significant ($r=-0.56/p=0.07$). Additionally, there were trends toward a correlation between adipocytic histomorphometry parameters and femoral aBMD and BMC in Control-HFD mice (e.g. Ad.V vs. aBMD: $r=0.78/p=0.11$ and Ad.V vs. BMC: $r=0.85/p=0.06$) but there was no statistical significance. These correlations were weak in STZ-HFD with no statistical significance. There were no correlations between adipocytic measures and body fat mass (Table 2).

Discussion

We conducted a 6-week dietary intervention to evaluate how nutritional status impacts bone mass in the streptozotocin (STZ)-induced T1DM mouse model. Surprisingly, although HFD feeding generally causes a modest reduction of bone mass, we found that HFD actually attenuated trabecular and cortical bone loss in STZ-diabetic mice. The diabetes-induced reduction of bone formation rate and increase in eroded surface in the LFD mice was not apparent in the HFD-STZ treated mice. HFD also rescued body weight and lean mass, as well as reduced random fed glucose levels in diabetic mice, indicating that glycaemia and body weight may contribute significantly to diabetic bone outcomes.

Previous studies have reported reduced bone parameters in both T1DM animal models and in human bone biopsies [32-34]. T1DM mouse models appear to be more susceptible to trabecular than cortical bone loss, which is consistent with more rapid bone turnover in response to nutritional, hormonal or environmental factors than cortical bone [32]. Similarly, young women with T1DM exhibit decreased trabecular bone volume and number [35]. However, in our study we observed both trabecular and cortical bone loss from STZ in the LFD fed mice (Figure 2), which may be related to the duration of the study. In this study, mice were maintained for six weeks after diabetes confirmation, which was two weeks longer than our previous studies examining T1DM bone loss in mice [32, 36-38]. Histomorphometric parameters demonstrated that bone loss in STZ-LFD group was related to a reduction in bone formation activity and also to an increase in bone resorption, consistent with down-regulation of *Runx2* and up-regulation of *Rankl* (Table I, Figure 3). Our findings are similar to other studies showing that bone loss in type 1 diabetic animal model is related to reduction in osteoblast activity and also to a greater osteoclast activity [33][39-41]. Tsentidis et al. [42] observed high levels of total sRANKL and OPG in T1DM children and adolescents presenting with lower BMD which was associated with increased osteoclast signaling in this population. It is unknown whether bone resorption could be related to diabetes duration and may be an area of interest for future research.

In the present study, STZ mice fed with HFD exhibited a different skeletal outcome, with improvement in femoral aBMD and trabecular and cortical μ CT parameters (Figure 2). This is somewhat surprising because previous work had demonstrated reduced trabecular and cortical bone parameters after a HFD [43, 44]. HFD had no effect on trabecular or cortical bone volume or area fraction, respectively, in the control non-diabetic mice in this study (Figure 2). In contrast to our study, most of the studies have adopted a HFD rich in long chain

saturated fatty acids (LCFA) that, differently from MCFA, induces a higher body weight gain, a higher endogenous glucose production and a lower glucose rate of disappearance, which could, in addition to duration of the study, explain why we did not observe bone changes with HFD alone [25, 45, 46]. However, in the STZ mice, HFD significantly increased several of the trabecular and cortical parameters, indicating that the effects of the diet on bone could be unique depending upon whether glucose metabolism was affected or not by the composition of the diet consumed (Figure 1).

Indeed, bone mass changes in diabetes are likely multifactorial, with hyperglycemia, hypoinsulinemia, nutritional status and presence of diabetes-related complications all contributing to the skeletal pathology [4, 47]. High glucose levels are associated with advanced glycation end-products (AGEs) that accumulate in the bone organic matrix causing its deterioration [48]. AGEs are thought to alter bone formation activity by inducing osteoblast apoptosis [49]. In diabetic animals, high pentosidine content in the bone tissue was associated with changes in biomechanical properties such as bone stiffness and maximum stress to bone failure, even though there was no reduction in BMD [50]. Neumann et al. [9] demonstrated that the presence of fractures was associated with elevated pentosidine levels in adult T1DM subjects, independently of BMD. In our study, as expected, multiple doses of STZ caused a decrease in insulin production leading to hyperglycemic conditions (Figure 1, Figure 5). After 6 weeks of a diet challenge, STZ-HFD mice exhibited lower non-fasting glucose levels compared to LFD feeding group (Figure 1). It is well-known that diet composition influences postprandial glucose levels, with the amount and/or type of carbohydrates having the most impact on glycemic control. Dietary fat has also an effect on postprandial hyperglycemia in T1DM subjects [51]. Interestingly, we did not find any rescue effect of HFD feeding on the serum levels of insulin or insulin staining histologically in the pancreas (Figure 5), indicating high glucose, rather than low insulin, was likely playing an important role in the pathophysiology of the skeletal loss.

In the present study, STZ mice with LFD exhibited classical symptoms of diabetic decompensation including loss of adipose tissue and lean mass after dietary challenge, as seen previously [33]. Conversely, our findings showed that STZ mice fed a HFD had an increase in body weight mostly due to lean mass preservation, as whole body adiposity loss was similar between both STZ groups (Figure 1). A low respiratory quotient (RQ) indicated that all STZ mice were using fat as an energy source (Figure 6) [52, 53]. The difference between the STZ-LFD mice and the STZ-HFD mice was that the source of the fat used for energy was the food

with the HFD, rather than the preexisting fat depots within the body. Other side effects of polyphagia, polydipsia and polyuria were attenuated with HFD treatment in the STZ mice, indicating slightly better glycemic control (Figure 7).

Both spontaneous and pharmacologically-induced T1DM mouse models have increased marrow fat content [32]. These findings suggest a trend towards adipogenesis in preference to osteogenesis among marrow skeletal progenitor cells. On the contrary, clinical studies have demonstrated no change in total MAT content in vertebral body or femoral bone marrow in T1DM [54]. In our hands, we observed a trend toward increased adipocyte volume and *Fabp4* expression, as well as a significant increase in *Adipoq* in STZ-LFD mice compared to CON-LFD (Figure 4). These trends were absent in the HFD mice, suggesting glucose control may be a significant contributor to marrow adipose tissue as described previously in non-diabetic women [10].

The type of fatty acids in the diet might also influence the effects of high glucose on the skeleton. Some studies have investigated the influence of the source of dietary fat on bone metabolism and showed that saturated and polyunsaturated (PUFAs) fat produce different outcomes on skeletal health [27, 55, 56]. For instance, saturated LCFA intake is associated with reduction in total areal BMC and lumbar spine BMD in non-diabetic animals [27] and a decreased femoral BMD in men [26]. On the other hand, dietary PUFAs seem to have beneficial effects on bone mass [27, 56, 57]. However, most of the studies regarding saturated fat rich in MCFA are related to its metabolic effects such as reduced body fat mass and enhanced insulin sensitivity [58-60]. To our knowledge, there has only been one short-term study that has evaluated the effect of HFD rich in MCFA on non-diabetic mouse bone, and it was unchanged after 2 weeks of dietary intervention [43]. Further investigations concerning the impact of MCFAs on bone mass and bone turnover are needed, particularly those that focus on the intestinal microbiome since alterations due to dietary influences in these mice might contribute to changes in bone mass.

The increase in obesity and overweight appears to be a trend among type 1 diabetic patients and this could lead to a greater susceptibility of developing complications related to excessive body fat accumulation [19-23]. On the other hand, our studies suggest that weight gain in mice with T1DM may actually lessen glucose toxicity and improve the skeletal phenotype. Notwithstanding, our animal model may not be the best approach for investigating the impact of obesity in T1DM. Future studies should consider investigate the role of other

type of diet on T1DM bone mass, in particular, those diets rich in saturated LCFA which seem to induce a higher fat mass gain and more evident metabolic disorders [25, 45, 46].

In conclusion, HFD intervention had distinct outcomes in streptozotocin-induced T1DM C57BL/6J male mice. Diabetic mice fed with LFD not only exhibited classical symptoms of diabetes such as polyphagia, polydipsia and hyperglycemia but also bone loss with a marked reduction in bone formation. But, interestingly, HFD was able to preserve lean mass and attenuate hyperglycemia in streptozotocin-induced T1DM, although it did not produce body fat accumulation in this animal model, as would have been expected. Furthermore, we are the first to show that HFD was protective against trabecular and cortical bone loss in STZ mice. The type of dietary fat in a HFD might be important for T1DM bone health and will need to be investigated further. The bone-fat interaction in diabetes is multifactorial, with both body weight and glycemic control predominantly contributing. Future studies are necessary to better understand the complexity surrounding the relationship between nutritional status and skeletal remodeling in diabetes.

Acknowledgments

ALC received financial support from FAPESP (2013/09853-6 and 2014/14505-0). FJAP received financial support from CNPq (307901/2014-9) and FAPESP (2014/15864-3). Research reported in this publication was supported by the following National Institutes of Health awards: NIAMS award number AR067858 to KJM, NIDDK award number DK092759 to CJR, NIAMS award number AR068095 to AG, NIGMS award number GM103392 to Dr. Robert Friesel (MMCRI) and NIGMS award number GM106391 to Dr. Don Wojchowski (MMCRI). The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health. We thank Terry Henderson for technical assistance.

References

1. Tuominen, J.T., et al., *Bone mineral density in patients with type 1 and type 2 diabetes*. Diabetes Care, 1999. **22**(7): p. 1196-200.
2. Hough, F.S., et al., *MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Mechanisms and evaluation of bone fragility in type 1 diabetes mellitus*. Eur J Endocrinol, 2016. **174**(4): p. R127-38.

3. McCabe, L.R., *Understanding the pathology and mechanisms of type I diabetic bone loss*. J Cell Biochem, 2007. **102**(6): p. 1343-57.
4. de Paula, F.J., M.C. Horowitz, and C.J. Rosen, *Novel insights into the relationship between diabetes and osteoporosis*. Diabetes Metab Res Rev, 2010. **26**(8): p. 622-30.
5. Kawai, M. and C.J. Rosen, *The IGF-I regulatory system and its impact on skeletal and energy homeostasis*. J Cell Biochem, 2010. **111**(1): p. 14-9.
6. Fulzele, K., et al., *Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition*. Cell, 2010. **142**(2): p. 309-19.
7. Irwin, R., et al., *Normal bone density obtained in the absence of insulin receptor expression in bone*. Endocrinology, 2006. **147**(12): p. 5760-7.
8. Botolin, S. and L.R. McCabe, *Chronic hyperglycemia modulates osteoblast gene expression through osmotic and non-osmotic pathways*. J Cell Biochem, 2006. **99**(2): p. 411-24.
9. Neumann, T., et al., *High serum pentosidine but not esRAGE is associated with prevalent fractures in type I diabetes independent of bone mineral density and glycaemic control*. Osteoporos Int, 2014. **25**(5): p. 1527-33.
10. de Paula, F.J., et al., *The Relationship of Fat Distribution and Insulin Resistance with Lumbar Spine Bone Mass in Women*. PLoS One, 2015. **10**(6): p. e0129764.
11. Komori, T., *Animal models for osteoporosis*. Eur J Pharmacol, 2015. **759**: p. 287-94.
12. Devlin, M.J. and C.J. Rosen, *The bone-fat interface: basic and clinical implications of marrow adiposity*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2015. **3**(2): p. 141-7.
13. Cao, J.J., *Effects of obesity on bone metabolism*. J Orthop Surg Res, 2011. **6**: p. 30.
14. Basso, N., et al., *The effect of reloading on bone volume, osteoblast number, and osteoprogenitor characteristics: studies in hind limb unloaded rats*. Bone, 2005. **37**(3): p. 370-8.
15. Bredella, M.A., et al., *Increased bone marrow fat in anorexia nervosa*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(6): p. 2129-36.
16. Devlin, M.J., et al., *Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice*. J Bone Miner Res, 2010. **25**(9): p. 2078-88.
17. Reid, I.R., *Fat and bone*. Arch Biochem Biophys, 2010. **503**(1): p. 20-7.
18. Association, A.D., *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2009. **32 Suppl 1**: p. S62-7.

19. Liu, L.L., et al., *Prevalence of overweight and obesity in youth with diabetes in USA: the SEARCH for Diabetes in Youth study*. *Pediatr Diabetes*, 2010. **11**(1): p. 4-11.
20. Conway, B., et al., *Temporal patterns in overweight and obesity in Type 1 diabetes*. *Diabet Med*, 2010. **27**(4): p. 398-404.
21. Polsky, S. and S.L. Ellis, *Obesity, insulin resistance, and type 1 diabetes mellitus*. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2015. **22**(4): p. 277-82.
22. da Costa, V.M., et al., *Overweight among children and adolescent with type I diabetes mellitus: prevalence and associated factors*. *Diabetol Metab Syndr*, 2016. **8**: p. 39.
23. Merger, S.R., et al., *Prevalence and comorbidities of double diabetes*. *Diabetes Res Clin Pract*, 2016. **119**: p. 48-56.
24. Paula, F.J. and C.J. Rosen, *Obesity, diabetes mellitus and last but not least, osteoporosis*. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2010. **54**(2): p. 150-7.
25. Petro, A.E., et al., *Fat, carbohydrate, and calories in the development of diabetes and obesity in the C57BL/6J mouse*. *Metabolism*, 2004. **53**(4): p. 454-7.
26. Corwin, R.L., et al., *Dietary saturated fat intake is inversely associated with bone density in humans: analysis of NHANES III*. *J Nutr*, 2006. **136**(1): p. 159-65.
27. Macri, E.V., et al., *High-fat diets affect energy and bone metabolism in growing rats*. *Eur J Nutr*, 2012. **51**(4): p. 399-406.
28. Motyl, K.J., et al., *Propranolol Attenuates Risperidone-Induced Trabecular Bone Loss in Female Mice*. *Endocrinology*, 2015. **156**(7): p. 2374-83.
29. de Paula, F.J., et al., *VDR haploinsufficiency impacts body composition and skeletal acquisition in a gender-specific manner*. *Calcif Tissue Int*, 2011. **89**(3): p. 179-91.
30. Dempster, D.W., et al., *Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee*. *J Bone Miner Res*, 2013. **28**(1): p. 2-17.
31. Vengellur, A. and J.J. LaPres, *The role of hypoxia inducible factor 1alpha in cobalt chloride induced cell death in mouse embryonic fibroblasts*. *Toxicol Sci*, 2004. **82**(2): p. 638-46.
32. Botolin, S. and L.R. McCabe, *Bone loss and increased bone adiposity in spontaneous and pharmacologically induced diabetic mice*. *Endocrinology*, 2007. **148**(1): p. 198-205.
33. Motyl, K. and L.R. McCabe, *Streptozotocin, type I diabetes severity and bone*. *Biol Proced Online*, 2009. **11**: p. 296-315.

34. Starup-Linde, J., et al., *Bone structure and predictors of fracture in type 1 and type 2 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2016: p. jc20153882.
35. Abdalrahaman, N., et al., *Deficits in Trabecular Bone Microarchitecture in Young Women With Type 1 Diabetes Mellitus*. J Bone Miner Res, 2015. **30**(8): p. 1386-93.
36. Motyl, K.J. and L.R. McCabe, *Leptin treatment prevents type 1 diabetic marrow adiposity but not bone loss in mice*. J Cell Physiol, 2009. **218**(2): p. 376-84.
37. Motyl, K.J., L.K. McCauley, and L.R. McCabe, *Amelioration of type 1 diabetes-induced osteoporosis by parathyroid hormone is associated with improved osteoblast survival*. J Cell Physiol, 2012. **227**(4): p. 1326-34.
38. Motyl, K.J., et al., *CCAAT/enhancer binding protein beta-deficiency enhances type 1 diabetic bone phenotype by increasing marrow adiposity and bone resorption*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011. **300**(5): p. R1250-60.
39. Coe, L.M., et al., *The bone marrow microenvironment contributes to type 1 diabetes induced osteoblast death*. J Cell Physiol, 2011. **226**(2): p. 477-83.
40. Coe, L.M., et al., *Bisphosphonate treatment of type 1 diabetic mice prevents early bone loss but accentuates suppression of bone formation*. J Cell Physiol, 2015. **230**(8): p. 1944-53.
41. Yee, C.S., et al., *Sclerostin antibody treatment improves fracture outcomes in a Type 1 diabetic mouse model*. Bone, 2016. **82**: p. 122-34.
42. Tsentidis, C., et al., *Higher levels of s-RANKL and osteoprotegerin in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus may indicate increased osteoclast signaling and predisposition to lower bone mass: a multivariate cross-sectional analysis*. Osteoporos Int, 2016. **27**(4): p. 1631-43.
43. Doucette, C.R., et al., *A High Fat Diet Increases Bone Marrow Adipose Tissue (MAT) But Does Not Alter Trabecular or Cortical Bone Mass in C57BL/6J Mice*. J Cell Physiol, 2015. **230**(9): p. 2032-7.
44. Beamer, W.G., et al., *BMD regulation on mouse distal chromosome 1, candidate genes, and response to ovariectomy or dietary fat*. J Bone Miner Res, 2011. **26**(1): p. 88-99.
45. Omar, B., G. Pacini, and B. Ahren, *Differential development of glucose intolerance and pancreatic islet adaptation in multiple diet induced obesity models*. Nutrients, 2012. **4**(10): p. 1367-81.

46. De Vogel-van den Bosch, J., et al., *High-fat diets rich in medium- versus long-chain fatty acids induce distinct patterns of tissue specific insulin resistance*. J Nutr Biochem, 2011. **22**(4): p. 366-71.
47. Shanbhogue, V.V., et al., *Type 2 diabetes and the skeleton: new insights into sweet bones*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2016. **4**(2): p. 159-73.
48. Karim, L. and M.L. Bouxsein, *Effect of type 2 diabetes-related non-enzymatic glycation on bone biomechanical properties*. Bone, 2016. **82**: p. 21-7.
49. Alikhani, M., et al., *Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways*. Bone, 2007. **40**(2): p. 345-53.
50. Saito, M., et al., *Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats*. Osteoporos Int, 2006. **17**(10): p. 1514-23.
51. Bell, K.J., et al., *Impact of fat, protein, and glycemic index on postprandial glucose control in type 1 diabetes: implications for intensive diabetes management in the continuous glucose monitoring era*. Diabetes Care, 2015. **38**(6): p. 1008-15.
52. Arch, J.R., et al., *Some mathematical and technical issues in the measurement and interpretation of open-circuit indirect calorimetry in small animals*. Int J Obes (Lond), 2006. **30**(9): p. 1322-31.
53. McClave, S.A., et al., *Clinical use of the respiratory quotient obtained from indirect calorimetry*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2003. **27**(1): p. 21-6.
54. Slade, J.M., et al., *Human bone marrow adiposity is linked with serum lipid levels not T1-diabetes*. J Diabetes Complications, 2012. **26**(1): p. 1-9.
55. Bielohuby, M., et al., *Short-term exposure to low-carbohydrate, high-fat diets induces low bone mineral density and reduces bone formation in rats*. J Bone Miner Res, 2010. **25**(2): p. 275-84.
56. Bonnet, N., E. Somm, and C.J. Rosen, *Diet and gene interactions influence the skeletal response to polyunsaturated fatty acids*. Bone, 2014. **68**: p. 100-7.
57. Farina, E.K., et al., *Protective effects of fish intake and interactive effects of long-chain polyunsaturated fatty acid intakes on hip bone mineral density in older adults: the Framingham Osteoporosis Study*. Am J Clin Nutr, 2011. **93**(5): p. 1142-51.
58. Schönfeld, P. and L. Wojtczak, *Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective*. J Lipid Res, 2016. **57**(6): p. 943-54.

59. St-Onge, M.P., et al., *Medium chain triglyceride oil consumption as part of a weight loss diet does not lead to an adverse metabolic profile when compared to olive oil.* J Am Coll Nutr, 2008. **27**(5): p. 547-52.
60. Wein, S., et al., *Medium-chain fatty acids ameliorate insulin resistance caused by high-fat diets in rats.* Diabetes Metab Res Rev, 2009. **25**(2): p. 185-94.

FIGURES AND LEGENDS

Figure 1

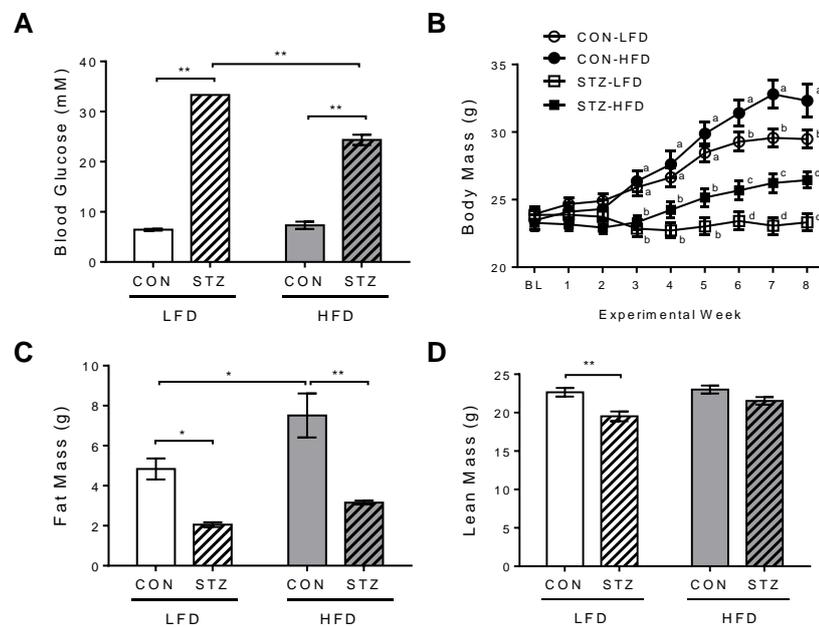


Figure 1. Effects of HFD on glucose levels, body mass and body composition. HFD reduced non-fasting blood glucose levels in STZ mice after 6 weeks of dietary intervention (A). Body mass weekly evolution showing that STZ-HFD group had gained more weight than STZ-LFD group (B). Changes in body composition were observed at the endpoint of the study (C and D). Fat mass (C) was significant reduced in STZ mice while lean mass (D) was only lower in STZ-LFD compared to CON-LFD. p-value: * <0.05 ; ** <0.0001 . n = 9 to 14.

Figure 2

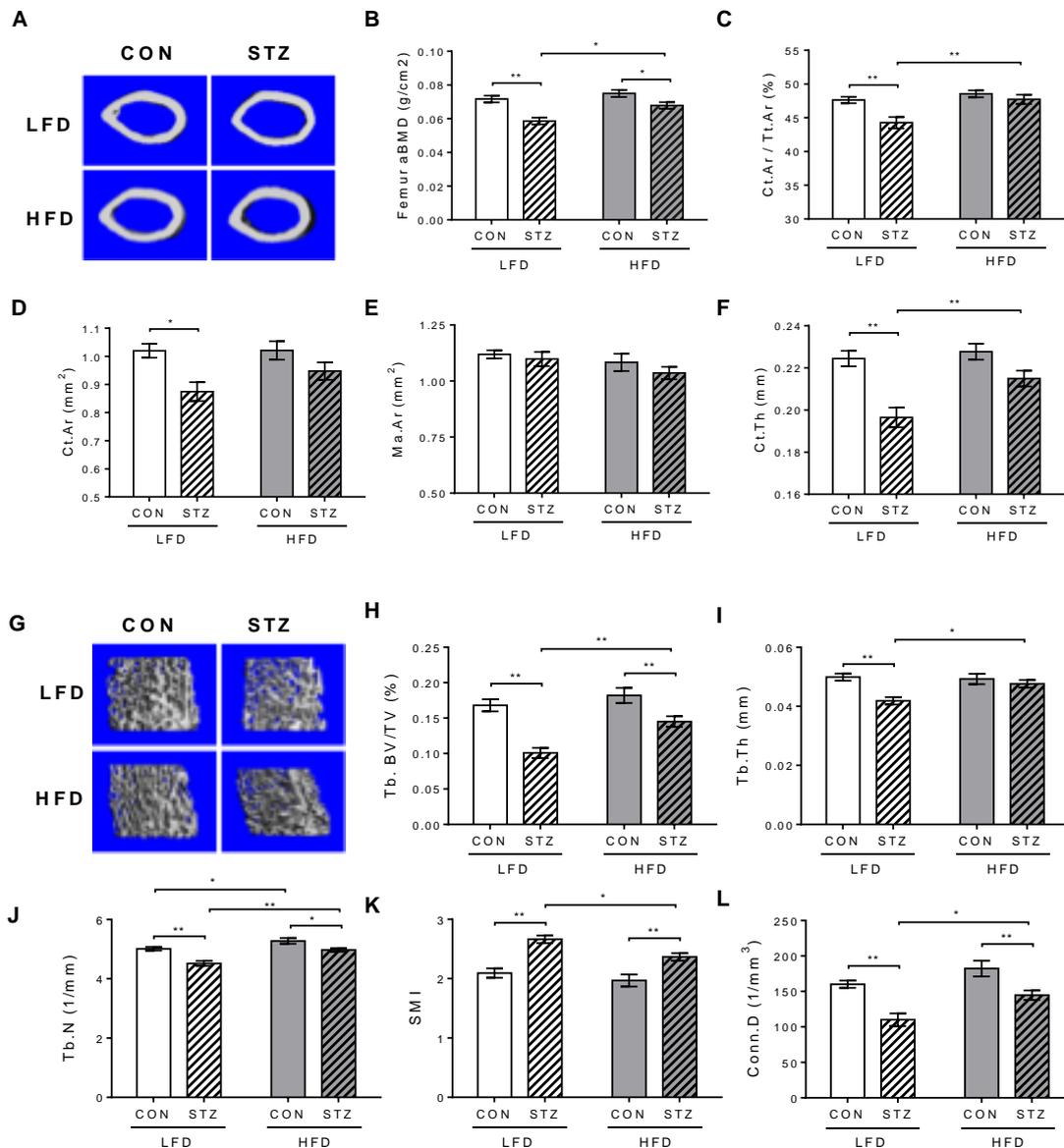


Figure 2. HFD had a protective effect on bone mass of STZ mice. Representative images of midshaft cortical bone of the femur by μ CT analysis (A). Femoral aBMD (g/cm^2) assessed by DXA was preserved in STZ-HFD mice which was higher compared to STZ-LFD group after 6 weeks of dietary intervention (B). MicroCT parameters corroborated DXA results showing that STZ-HFD had not lost as much trabecular and cortical bone as STZ-LFD mice. Quantitative parameters from μ CT of femoral cortical (C, D, E and F) included Ct.Ar/Tt.Ar, Ct.Ar, Ma.Ar and Ct.Th measurements. Representative images of distal trabecular bone of the femur (G) and quantitative parameters of trabecular bone (H, I, J, K and L) by μ CT analysis included BV/TV, Tb.Th, Tb.N, SMI and Conn.D. p-value: * <0.05 ; ** <0.0001 . n = 9 to 14.

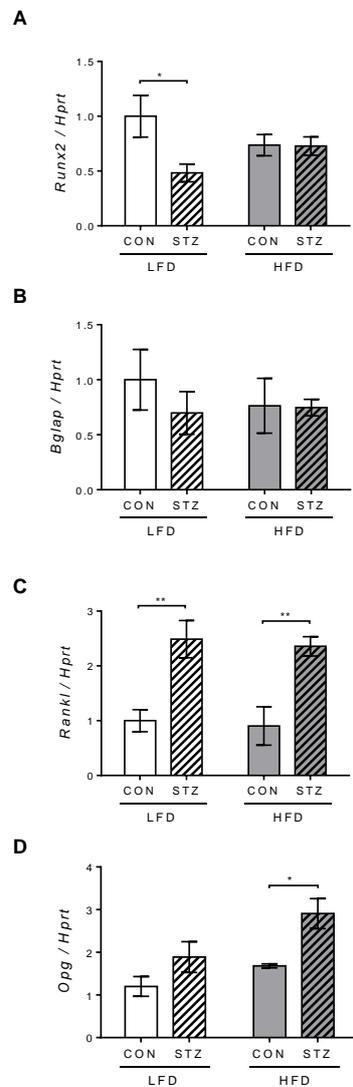
Figure 3

Figure 3. Runx2, Bglap, Rankl and Opg mRNA expression was similar in both STZ groups. Gene analysis was performed in crushed whole femur of 16 weeks-old male mice without marrow content. Runx2 (A), Bglap (B), Rankl (C) and Opg (D) mRNA expression were normalized to the housekeeping gene Hprt. p-value: * <0.05 ; ** <0.0001 . n = 5 to 11.

Figure 4

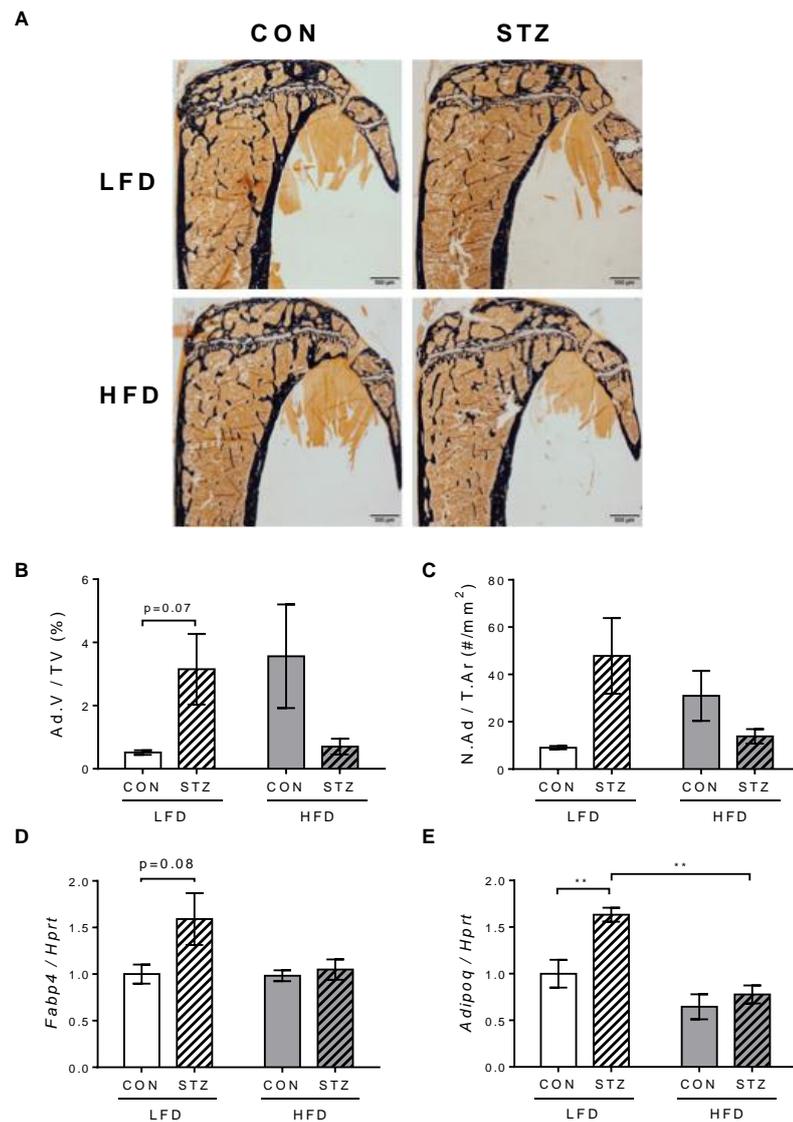


Figure 4. HFD feeding had no significant effect on marrow adipocytes. Representative images from histomorphometric analysis in the proximal tibia, where black stain is mineral (Von Kossa) and adipocytes ghosts are white (A). Adipocytic volume (Ad.V/TV) (B) and quantitative (N.Ad/T.Ar) measurements from the proximal tibia. Gene expression was performed in the frozen marrow tissue content flushed out from the femur at the sacrifice. Fabp4 (D) and Adipoq (E) mRNA expression were normalized to the housekeeping gene Hprt. p-value: * <0.05 ; ** <0.0001 . n = 6.

Figure 5

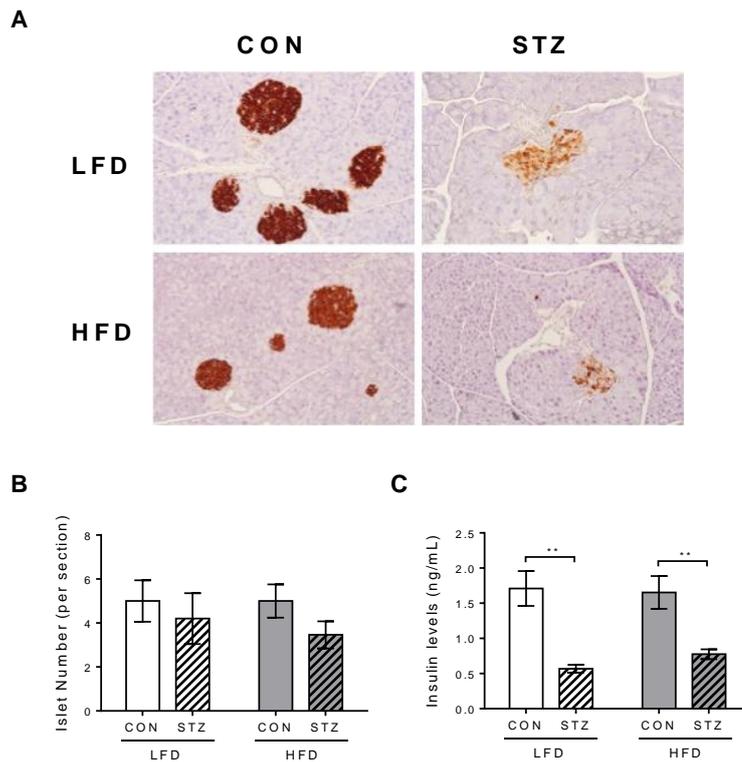


Figure 5. HFD did not affect insulin levels in diabetic mice. Detection of insulin production in the pancreatic tissue by immunohistochemistry (IHC) staining (brown signal) (A). Number of Langerhans islets per section of H&E stained pancreatic tissue (B), $n = 5$ to 13 . Serum insulin levels measured with an ELISA (C). p -value: $* < 0.05$; $** < 0.0001$. $n = 7$ to 10 .

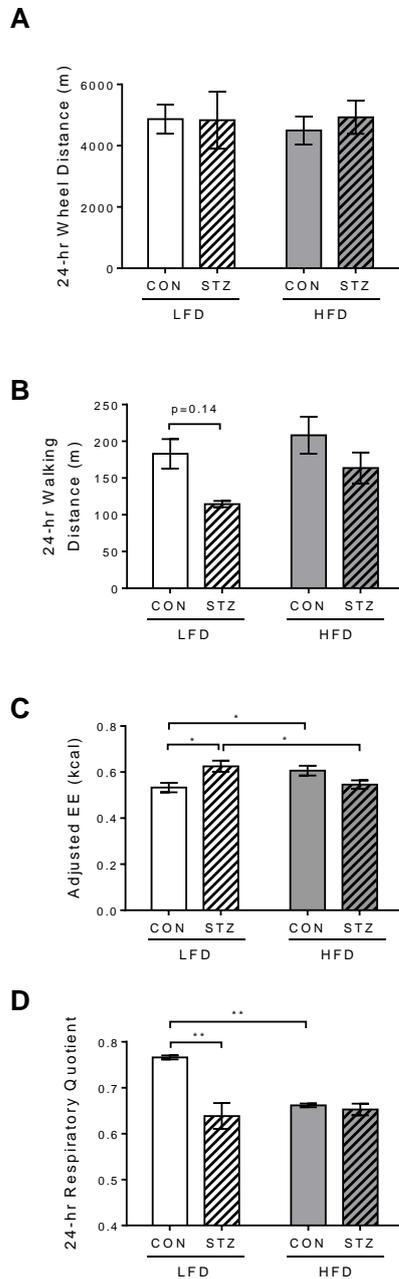
Figure 6

Figure 6. EE was increased in STZ-LFD mice and RQ value was similar between CON-HFD and both STZ groups indicating fat oxidation. Mice were placed individually into metabolic cages for 5 days, one week before the endpoint. Behavioral measurements included activities as 24-hour wheel distance (A) and walking distance in the cage (B). Metabolic measurements included evaluation of energy expenditure (EE) (C) and 24-hour respiratory quotient (RQ) (D). EE values were adjusted by lean mass. p-value: * <0.05 ; ** <0.0001 . n = 6 to 8.

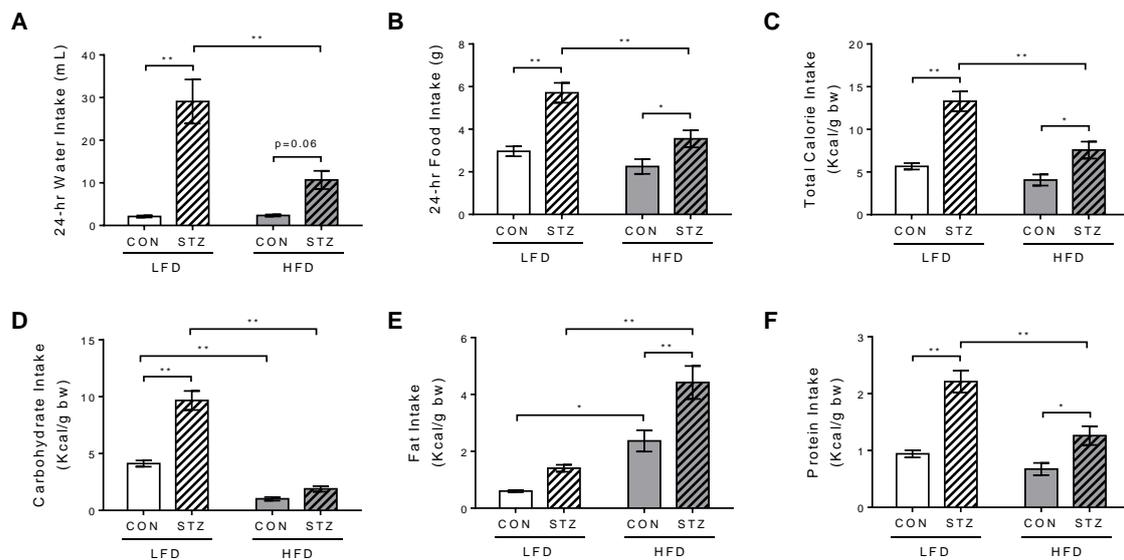
Figure 7

Figure 7. Diabetes symptoms such as polydipsia and polyphagia were attenuated in STZ-HFD group. Mice were placed individually into metabolic cages one week before the endpoint. 24-hour water (A) and food (B) intake was monitored during for 5 days. Total calorie intake (Kcal/g of body weight) (C), carbohydrate (D), fat (E) and protein (F) intake (Kcal/g of body weight) were calculated based on food intake records. p-value: * <0.05 ; ** <0.0001 . n = 6 to 8.

TABLES

Table 1. Static and dynamic histomorphometry parameters of the proximal tibia from CON and STZ mice fed with LFD or HFD.

	<i>Low Fat Diet</i>		<i>High Fat Diet</i>	
	<i>CON (n=5)</i>	<i>STZ (n=5)</i>	<i>CON (n=5)</i>	<i>STZ (n=5)</i>
OS/BS (%)	9.2 ± 3.1	8.3 ± 4.9	6.1 ± 2.7	6.9 ± 4.0
O.Th (µm)	3.49 ± 0.68	3.45 ± 0.35	3.16 ± 0.63	3.44 ± 0.48
Ob.S/BS (%)	13.1 ± 3.3	9.9 ± 4.4	9.3 ± 5.5	9.7 ± 6.3
N.Ob/B.Pm (/mm)	9.8 ± 2.5	7.6 ± 3.1	6.8 ± 3.8	7.2 ± 4.1
N.Ob/T.Ar (/mm ²)	57.1 ± 9.1	38.1 ± 10.0	43.6 ± 22.4	44.3 ± 35.1
MAR (µm/day)	0.91 ± 0.19	0.88 ± 0.12	0.91 ± 0.13	0.88 ± 0.16
MS/BS (%)	37.5 ± 9.3	18.7 ± 3.8*	32.1 ± 3.9	25.4 ± 5.3
BFR/BV (%/year)	1.95 ± 0.53	1.20 ± 0.35	1.58 ± 0.37	1.33 ± 0.30
BFR/BS (µm ³ /µm ² /day)	0.35 ± 0.12	0.17 ± 0.04*	0.29 ± 0.05	0.22 ± 0.05
ES/BS (%)	2.87 ± 0.60	5.12 ± 1.37*	3.61 ± 0.87	4.19 ± 1.65
Oc.S/BS (%)	12.3 ± 2.1	20.6 ± 5.1	13.0 ± 2.5	17.7 ± 6.1
N.Oc/B.Pm (/mm)	4.65 ± 0.75	7.61 ± 1.81	6.09 ± 2.67	7.05 ± 2.41
N.Oc/T.Ar (/mm ²)	27.9 ± 4.3	37.3 ± 7.0	36.6 ± 11.7	40.2 ± 13.8

*p<0.05 compared to CON-LFD.

Table 2. Body Composition, Marrow Adipocyte Content and Bone Mass Correlation Matrix from CON and STZ fed with HFD.

	Body Weight (g)	Femoral aBMD (g/cm ²)	Femoral BMC (g)	Lean Mass (g)	Fat Mass (g)	Number of Adipocyte (N.Ad)	Adipocyte Volume (Ad.V)
<i>CON-HFD group</i>							
Body Weight (g)	1						
Femoral aBMD (g/cm ²)	-0.10	1					
Femoral BMC (g)	-0.26	0.86	1				
Lean Mass (g)	0.11	0.80*	0.76*	1			
Fat Mass (g)	0.93	-0.39	-0.56	-0.25	1		
Number of adipocyte (N.Ad)	-0.37	0.68	0.69	0.86	-0.49	1	
Adipocyte Volume (Ad.V)	-0.57	0.78	0.85	0.87	-0.67	0.97	1
<i>STZ-HFD group</i>							
Body Weight (g)	1						
Femoral aBMD (g/cm ²)	0.90*	1					
Femoral BMC (g)	0.81	0.84	1				
Lean Mass (g)	0.97	0.89*	0.75*	1			
Fat Mass (g)	0.43	0.27	0.60*	0.28	1		
Number of adipocyte (N.Ad)	0.07	-0.02	-0.08	-0.02	0.62	1	
Adipocyte Volume (Ad.V)	-0.10	-0.43	-0.38	-0.19	0.83	0.83	1

*p-value < 0.05.

Supplemental Table 1. Low Fat Diet and High Fat Diet Nutritional Composition.

Nutrient	<i>Low Fat Diet^a</i>		<i>High Fat Diet^b</i>	
	g	% of Kcal	g	% of Kcal
Protein	16.8	16.4	23	16.4
Carbohydrate	74.3	73.1	35.5	25.5
Fat	4.8	10.5	35.8	58
	g	Kcal	g	Kcal
Casein, 80 Mesh	228	912	228	912
DL-Methionine	2	0	2	0
Maltodextrin	170	680	170	680
Corn Starch	660	2640	0	0
Sucrose	175	700	175	700
Soybean Oil	25	225	25	225
Coconut Oil, hydrogenated	40	360	333.5	3001.5

^a customized D15022202 diet; ^b D12331 diet (Research Diets Inc.)

ANEXOS

Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA
AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAR EM PROJETO DE PESQUISA

TÍTULO DO ESTUDO: Diabetes Mellitus e Osteoporose: Avaliação da Influência da Composição Corporal e do Perfil Metabólico sobre a Densidade Mineral Óssea, Ocorrência de Fratura Subclínica e Conteúdo de Gordura em Corpo Vertebral no Diabetes Mellitus Tipo 1 e 2.

DATA DO CONSENTIMENTO

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Francisco José Albuquerque de Paula

NOME DO VOLUNTÁRIO:

O (a) senhor(a) está sendo convidado para ser voluntário em um estudo de pesquisa clínica. Os estudos de pesquisa clínica incluem apenas pessoas que aceitam participar voluntariamente. A decisão de participação na pesquisa deverá ser feita após o (a) senhor(a) ter pleno conhecimento sobre os riscos e benefícios envolvidos e então tomar uma decisão que lhe seja adequada. Este processo é conhecido como consentimento informado. Por favor, reflita para tomar uma decisão.

O (a) senhor(a) está sendo convidado para participar deste estudo porque o (a) senhor(a) preenche os critérios de inclusão da pesquisa.

POR QUE ESTE ESTUDO SERÁ REALIZADO?

Esta pesquisa está sendo feita para avaliar a Osteoporose que pode ser causa do Diabetes. O objetivo é avaliar quais ossos são principalmente afetados e quais são as alterações que levam a esta doença óssea.

QUANTOS INDIVÍDUOS FARÃO PARTE DESTE ESTUDO CLÍNICO?

Serão formados 02 grupos de 40 indivíduos cada, sendo 01 formado por pessoas normais sem Diabetes mellitus (grupo controle) e outro por pacientes com Diabetes mellitus. Os indivíduos do grupo controle serão selecionados entre pessoas que compõem as comunidades do HCFMRP-USP e da FMRP-USP (alunos, funcionários, médicos, professores). Os pacientes com Diabetes mellitus serão selecionados no ambulatório de Diabetes do CSE da Rua Cuiabá da HCFMRP-USP.

O QUE ESTÁ ENVOLVIDO NESTE ESTUDO?

Se o (a) senhor(a) participar deste estudo clínico, será colhido uma pequena quantidade de sangue (8 colheres de chá ou 5-40ml) de sangue da veia de seu braço. Isto envolve uma picada com agulha na veia do seu braço e coleta de seu sangue em tubos. Esta coleta pode ser realizada quando lhe for conveniente. Também serão feitos exames de radiografia de coluna vertebral para avaliação de fratura sem sintoma desta região, exame de densitometria óssea e de ressonância magnética de corpos vertebrais. Estes exames não causam dor, porém algumas pessoas sentem desconforto em exame de ressonância magnética devido ao ambiente fechado. A quantidade de raio-x emitida nos exames de densitometria óssea e coluna vertebral é pequena pois os aparelhos colimados, isto é são aparelhos feitos para reduzir a exposição a radiação.

O (a) senhor(a) responderá um questionário sobre a sua condição de saúde.

QUANTO TEMPO VOCÊ ESTARÁ PARTICIPANDO DESTE ESTUDO DE PESQUISA?

Os exames não serão repetidos. Você será avaliado apenas uma vez por cada exame.

QUAIS OS RISCOS DESTE ESTUDO DE PESQUISA?

Os riscos neste estudo de pesquisa são relacionados a coleta de sangue da sua veia e exames de imagem. A picada da agulha pode causar uma dor passageira e o(a) senhor(a) pode poder ter uma mancha e dor no local por alguns dias. Como referido acima os outros exames não causam dor. Algumas pessoas não suportam ficar em ambiente fechado e por isso não consegue realizar exame de ressonância magnética. Os exames de radiografia envolvem radiação, mas os aparelhos utilizados são preparados para reduzirem a exposição a radiação.

EXISTEM BENEFÍCIOS EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO CLÍNICO?

Não existem benefícios diretos para o(a) senhor(a) em participar deste estudo de pesquisa. Porém, sua participação poderá ajudar outros indivíduos no futuro com os resultados e conhecimentos obtidos a partir deste estudo.

QUAIS AS OUTRAS OPÇÕES QUE EXISTEM?

Ao invés de participar deste estudo de pesquisa, o (a) senhor (a) poderá decidir em não participar. Você não tem obrigação em participar e se o (a) senhor (a) decidir por não participar, não terá nenhum efeito sobre qualquer aspecto em atendimento no HC-FMRP.

SOBRE A CONFIDENCIALIDADE?

Esforços serão feitos para manter suas informações pessoais confidenciais. Os resultados dos testes realizados em seu sangue e /ou urina serão mantidos completamente anônimo e confidencial. Os resultados serão mantidos em segurança em computadores protegidos por senha. Todas as informações serão codificadas e nenhum identificador pessoal será armazenado.

QUAIS SÃO OS CUSTOS?

Não existe nenhum custo para o(a) senhor(a) se o(a) senhor(a) participar deste estudo.

O QUE ACONTECERÁ SE EU SOFRER DANOS POR PARTICIPAR NESTE ESTUDO?

Em caso de dano ou doença resultante deste estudo clínico, tratamento de emergência médica está disponível. O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto não compensará o (a) senhor (a) ou sua companhia de seguro no evento de qualquer dano.

QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS COMO UM PARTICIPANTE?

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

PERMISSÃO PARA O USO DOS RESULTADOS DA PESQUISA

POR QUE EU ESTOU SENDO QUESTIONADO PARA LIBERAÇÃO DESTA INFORMAÇÃO?

Como parte deste estudo, o (a) senhor (a) esta sendo solicitada a permiti ao Dr. Francisco José Albuquerque de Paula a coletar informação sobre a sua saúde. Esta informação será coletada, listada em um banco de dados com informação de saúde de todos os participantes deste estudo, e analisada para identificar correlações de seus achados com informações de pessoas saudáveis.

O QUE ESTA SENDO SOLICITADO PARA LIBERAÇÃO?

Para este estudo, as seguintes informações serão coletadas:

Sua idade e sexo

Seu peso, altura, índice de massa corpórea.

Sua história clínica relacionada a doenças metabólicas e ósseas

Antecedentes pessoais e familiares de doenças osteometabólicas

Todas as medicações que você usa rotineiramente

Frequência e tipo de exercício físico.

QUEM VERÁ ESTAS INFORMAÇÕES?

Os investigadores envolvidos no estudo terão acesso as suas informações. O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto ou Agencias regulatórias de pesquisa poderão ver partes de seus dados médicos relatados neste estudo e, portanto, verão seu nome ou outras informações de identificação pessoal sobre o(a) senhor (a). as informações coletas são propriedades do Investigador. No caso de qualquer publicação referente a este estudo, sua identificação não será revelada.

AS INFORMAÇÕES COLETADAS COMO PARTE DESTE ESTUDO SERÃO DESTRUIDAS QUANDO NÃO FOREM MAIS NECESSÁRIAS?

É difícil para o Investigador saber quanto tempo suas informações serão mantidas, mas comumente elas serão mantidas em banco de dados do Investigador por um período de tempo indefinido. Nós não sabemos quando suas informações não serão mais utilizadas, e não existe uma expiração das informações após elas serem descartadas.

EU POSSO INTERROMPER MINHAS INFORMAÇÕES APÓS ELAS COMEÇAREM A SER UTILIZADAS?

Se o(a) senhor (a) deixar o estudo, e não desejar ter mais nenhuma informação pessoal coletada, sobre o(a) senhor (a) deverá notificar por escrito ao Dr. Francisco José Albuquerque de Paula . O (a) senhor (a) poderá também entrar em contato com o Dr. Francisco José Albuquerque de Paula por telefone (16) 36021000 e sua solicitação de interromper a coleta de informações será honrada, mas o(a) senhor (a) deverá também notificar ao Dr. Francisco José Albuquerque de Paula por escrito. Para notificar ao Dr. Francisco José Albuquerque de Paula por escrito, envie sua solicitação para : Dr. Francisco José Albuquerque de Paula, Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, Ribeirão Preto SP. Qualquer informação já coletada continuará a ser vista e usada como descrito previamente.

Declaro ter lido ou terem lido para mim as informações acima antes de assinar o termo de consentimento livre esclarecido. Eu concordo em participar deste estudo clínico. Ainda, eu autorizo que as informações colhidas sejam utilizadas para finalidade da pesquisa proposta. Foi-me oferecida ampla oportunidade de informação e questionamento bem como recebi todos os esclarecimentos de dúvidas e pontos questionados.

Eu recebi uma cópia deste termo após tê-lo assinado.

Ribeirão Preto, ___/___/____.

_____ RG: _____

Nome legível do participante e/ou responsável legal.

Assinatura ou impressão dactiloscopia do participante e/ou responsável legal.

Testemunhas:

Nome legível da testemunha

_____ RG: _____

Assinatura da testemunha

Pesquisador Responsável:

Dr. Francisco José Albuquerque de Paula RG: 545481

Departamento de Clínica Médica, FMRP-USP.

Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, 14049-900, SP, Brasil

Fone: 16 36022934

Anexo 2. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP.



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 28 de março de 2012

Ofício nº 1149/2012
CEP/MGV

Prezados Senhores,

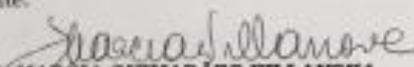
O trabalho intitulado **"DIABETES MELLITUS E OSTEOPOROSE: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO CORPORAL E DO PERFIL METABÓLICO SOBRE A DENSIDADE MINERAL ÓSSEA, OCORRÊNCIA DE FRATURA SUBCLÍNICA E CONTEÚDO DE GORDURA EM CORPO VERTEBRAL NO DIABETES MELLITO TIPO 1 E 2"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 342ª Reunião Ordinária realizada em 26/03/2012, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 211/2012.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - aposto sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - aposto sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente,



DR. MARCIA GUILMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
PROF.DR. FRANCISCO JOSÉ ALBUQUERQUE DE PAULA(Orientador)
IANA MIZUMUKAI DE ARAÚJO/NILTON AUGUSTO DA SILVA(Alunos)
Depto. de Clínica Médica

Campus Universitário - Monte Alegre
14045-900 - Ribeirão Preto - SP

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP
FVA-00027733-189-00002196 e Registro SISEMP/CONEP nº 4
(16) 3662-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 21 de março de 2013

Ofício nº 915/2013
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 211/2012

Prezados Pesquisadores,

O Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 362ª Reunião Ordinária realizada em 18/03/2013, tomou ciência da saída do pesquisador Nilton A. Silva e entrada da pesquisadora Adriana Lejis Carvalho na pesquisa intitulada **"DIABETES MELLITUS E OSTEOPOROSE: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO CORPORAL E DO PERFIL METABÓLICO SOBRE A DENSIDADE MINERAL ÓSSEA, OCORRÊNCIA DE FRATURA SUBCLÍNICA E CONTEÚDO DE GORDURA EM CORPO VERTEBRAL NO DIABETES MELLITUS 1 E 2º**, conforme parecer anexo. O CEP também tomou ciência do relatório parcial da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

PROF. DR. FRANCISCO JOSÉ ALBUQUERQUE DE PAULA
Alunos: **IANA MIZUMUKAI DE ARAÚJO/ NILTON AUGUSTO DA SILVA**
Depto. de Clínica Médica

Campus Universitário - Monte Alegre
14045-900 Ribeirão Preto - SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
PWA-0000733, IRB-0000190 e Registro SISNEP/COFEP nº 4
(16) 3603-2228
cep@fmrp.usp.br

www.hcrp.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

I - Identificação

Processo nº: 211/2012

CÓPIA

Título do Projeto: "Diabetes Mellitus e osteoporose: avaliação da influência da composição corporal e do perfil metabólico sobre a densidade mineral óssea, ocorrência de fratura subclínica e conteúdo de gordura em corpo vertebral no Diabetes Mellitus 1 e 2"

CAAE: 0393.0.004.000-12

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Francisco José Albuquerque de Paula, Iana M. Araújo e Nilton A. Silva

Instituição: Departamento de Clínica Médica

I - Apreciação geral

O projeto de pesquisa em tela deu entrada no CEP em 06/01/2012, com o objetivo geral de verificar a qualidade e quantidade de massa óssea de pacientes com DM2 e comparar com indivíduos saudáveis pareados, a fim de verificar se há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Após análise, foi aprovado na 342ª Reunião ordinária realizada em 26/03/2012.

Em carta datada de 27 de fevereiro de 2013, o pesquisador principal encaminhou para apreciação do CEP a solicitação de substituição de pesquisadores. De acordo com o documento, haverá a substituição do aluno Nilton A. Silva pela aluna Adriana Leles Carvalho. O pesquisador principal encaminhou também para ciência deste CEP o relatório parcial da pesquisa supracitada.

II - Parecer

O CEP "tomou ciência" da saída do pesquisador Nilton A. Silva e entrada da pesquisadora Adriana Leles Carvalho na pesquisa. O CEP também "tomou ciência" do relatório parcial da pesquisa supracitada.