

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES  
PLASMÁTICAS DE STWEAK NO DIABETES  
MELLITUS E FRATURAS ÓSSEAS EM  
MULHERES NA PÓS MENOPAUSA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Juliana Wispel**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

# **AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE STWEAK NO DIABETES MELLITUS E FRATURAS ÓSSEAS EM MULHERES NA PÓS MENOPAUSA**

**Juliana Wispel**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PG), Área de Concentração em Promoção e Tecnologia em Saúde, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde

**Orientador: Prof. Dr. Fábio Vasconcellos Comim**

**Co-orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Melissa Orlandin Premaor**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Wispel, Juliana  
AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE STWEAK NO  
DIABETES MELLITUS E FRATURAS ÓSSEAS EM MULHERES NA PÓS  
MENOPAUSA / Juliana Wispel.-2015.  
55 p.; 30cm

Orientador: Fábio Vasconcellos Comim  
Coorientadora: Melissa Orlandin Premaor  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde, RS, 2015

1. TNF-like weak inducer of apoptosis 2. Osteoporose  
3. Diabetes Mellitus 4. Menopausa 5. Fraturas Ósseas I.  
Vasconcellos Comim, Fábio II. Orlandin Premaor, Melissa  
III. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Mestrado Profissional em Ciências da Saúde**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE STWEAK  
NO DIABETES MELLITUS E FRATURAS ÓSSEAS EM MULHERES NA  
PÓS MENOPAUSA**

elaborada por  
**Juliana Wispel**

como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Fábio Vasconcellos Comim, Dr.**  
(Orientador)

**Maristela de Oliveira Beck, Dr<sup>a</sup>.** (UFSM)

**Rodrigo de Almeida Vaucher, Dr.** (UNIFRA)

Santa Maria, 08 de Maio de 2015.

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, que tudo fez e fará por nós, a começar pelo dom da vida. Sei que, se cheguei até aqui foi por tuas mãos que me sustentaram. Obrigada Senhor por cada vitória dessa caminhada e por hoje proporcionar a realização desse grande objetivo.*

*Aos meus pais, Manfred Amatheus Wispel e Marioni Scheffel Wispel, e meu irmão, Wagner Wispel, pela educação, incentivo, carinho, amor, apoio e suporte durante todo o curso e toda minha vida.*

*Ao meu namorado, Fabiano Bisognin Franco, por ter sido meu companheiro e incentivador em todos os momentos.*

*A todos os meus professores pelo conhecimento transmitido, em especial àqueles que serão meus exemplos de compromisso, dedicação, seriedade, interesse e qualidade de ensino para toda vida.*

*Aos professores Fábio Vasconcellos Comim e Melissa Orlandin Premaor pelos ensinamentos, paciência, apoio e disponibilidade sempre que necessário.*

*Aos acadêmicos participantes do Grupo de Pesquisas em Doenças Osteometabólicas que sempre estiveram presentes e dispostos a ajudar nas diversas fases da pesquisa.*

*Às senhoras voluntárias do projeto, agradeço pela paciência e disponibilidade. Obrigada pela confiança e cooperação, que foram fundamentais para a concretização dessa pesquisa. Também às paróquias das Igrejas de Santa Maria que colaboraram na fase das coletas de dados.*

*“Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira.”*

— RUI BARBOSA

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Mestrado Profissional em Ciências da Saúde  
Universidade Federal de Santa Maria

### **AValiação DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE STWEAK NO DIABETES MELLITUS E FRATURAS ÓSSEAS EM MULHERES NA PÓS MENOPAUSA**

AUTORA: JULIANA WISPEL

ORIENTADOR: FÁBIO VASCONCELLOS COMIM

CO-ORIENTADORA: MELISSA ORLANDIN PREMAOR

Local da Defesa e Data: Santa Maria, 08 de Maio de 2015.

A osteoporose é um transtorno osteometabólico caracterizado pela diminuição da densidade mineral óssea (DMO) e deterioração de sua microarquitetura com o consequente aumento da fragilidade do osso e suscetibilidade à fraturas. A fisiopatologia dessa doença tem a inflamação crônica como importante mecanismo no aumento da reabsorção e redução da formação óssea. Entre os marcadores inflamatórios associados à osteoporose destacam-se aqueles do grupo dos fatores de necrose tumoral, em particular, o fator de necrose tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ). Evidências recentes da literatura observaram que um outro membro da mesma família, o TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK), em sua forma solúvel (sTWEAK), foi relacionado com a presença de outros distúrbios endócrino metabólicos, tais como *diabetes mellitus* (DM) e síndrome metabólica. Com base nisso, testamos a hipótese de associação entre sTWEAK e fraturas ósseas maiores, e também DM, em mulheres na pós menopausa.

Este é um estudo transversal que partiu de uma coorte de 1057 pacientes na pós menopausa que consultam nas Unidades Básicas de Saúde da cidade de Santa Maria-RS. Foram recrutadas 52 pacientes com histórico de fraturas ósseas maiores e, para o grupo controle, escolhidas aleatoriamente 110 pacientes sem história de fraturas ósseas. Todos os indivíduos do estudo responderam a um questionário padronizado sobre a sua história clínica além de serem submetidos a avaliação antropométrica e exames bioquímicos (glicose de jejum, colesterol total, triglicérides, HDL, LDL, creatinina, albumina, cálcio e fósforo). Os níveis plasmáticos de sTWEAK foram avaliados pelo método de ELISA. As variáveis com distribuição assimétrica foram submetidas à transformação para o seu logaritmo natural e então comparadas. Para a análise estatística entre dois grupos foi feita a utilização dos testes T de Student ou Mann-Whitney. Para mais de dois grupos foram empregados ANOVA ou os testes de Chi Quadrado ou Fisher.

Foi observada redução significativa ( $p=0.002$ ) dos valores do sTWEAK (transformado para  $\log N$ ) nos indivíduos com DM em comparação com os sem DM. Não houveram diferenças quando analisado somente o histórico de fraturas. Estratificando a população em subgrupos de acordo com o critério de existência de fratura reportada ou de diagnóstico de DM, permaneceu somente a diferença entre os grupos com DM sem fratura e sem DM sem fratura ( $p<0.01$ ).

Os achados indicam que na população de mulheres na pós menopausa com e sem história de fraturas ósseas maiores, os níveis plasmáticos de sTWEAK não tem associação com a fragilidade óssea. Entretanto, níveis baixos deste biomarcador estão associados com o diagnóstico de DM, como reportado na literatura.

**Palavras-chave:** TNF-like weak inducer of apoptosis. Fraturas Ósseas. Diabetes Mellitus. Osteoporose. Menopausa.

## ABSTRACT

Master's Dissertation  
Professional Master in Health Science  
Federal University of Santa Maria

### PLASMA sTWEAK CONCENTRATIONS IN DIABETES MELLITUS AND BONE FRACTURES IN POSTMENOPAUSAL WOMEN

AUTHOR: JULIANA WISEL

ADVISOR: FÁBIO VASCONCELLOS COMIM

COADVISOR: MELISSA ORLANDIN PREMAOR

Defense Place and Date: Santa Maria, May 08<sup>th</sup>, 2015.

Osteoporosis is defined as an osteometabolic disease characterized by the reduction of bone mineral density (BMD) and micro-architectural deterioration, leading to enhanced bone fragility and increased susceptibility to fractures. Chronic inflammation affecting bone resorption and/or bone formation is an important mechanism in the histopathology of osteoporosis. In this regard, several inflammatory markers are associated in special, tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ). Recent evidence from the literature pointed out that other members of the TNF superfamily, the tumor necrosis factor TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK), in its soluble bioactive form (sTWEAK), has been related with diverse endocrine metabolic disarrangements such as diabetes mellitus or metabolic syndrome. Thus, we hypothesized a possible association between sTWEAK plasma levels and bone fractures and diabetes mellitus in post menopausal women.

This was a cross sectional study nested in a cohort of 1057 post menopausal women outpatients attending the UBS, *Unidades Básicas de Saúde*, of Santa Maria. We used data from 52 individuals recruited who reported major bone fractures. For the control group, we aleatory recruited 110 individuals without the history of major bone fractures. All subjects in this study proceeded to a standard questionnaire about clinical data and were submitted to anthropometry evaluation. Blood samples were obtained for the biochemical profile consisting in fast glucose, total cholesterol, TG, HDL, LDL, creatinine, albumin, calcium and phosphorus in serum. sTWEAK concentration was established by ELISA. Assimetric variables were logN transformed. Student T test or Mann-Whitney test were used to comparison of data between two groups. For statistical analysis that form more than two groups were employed ANOVA or Chi quadrate and Fisher's test.

An statistical significant reduction ( $p=0.002$ ) of sTWEAK (log transformed) was observed in diabetes mellitus (DM) subjects in comparison to non-diabetics. There was no differences in the plasma levels of sTWEAK when the history of major bone fractures was analysed. Even when stratified for DM and fractures, Ln sTWEAK remained consistently reduced in the group of individuals with DM without fractures against non-diabetics no-fractures women ( $p < 0.01$ ).

Findings from this study indicated that plasma levels of sTWEAK was not related with bone fragility in post menopausal women population. Nevertheless, low plasma levels of this biomarker were associated with diabetes mellitus, as previously described in the literature.

**Keywords:** TNF-like weak inducer of apoptosis, Bone Fractures, Diabetes Mellitus, Osteoporosis, Menopause.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 – Ação dos marcadores inflamatórios, hormônios e ligantes na reabsorção óssea	22
Figura 6.1 – Valores de sTWEAK em relação à presença e ausência de Diabetes Mellitus (A) e relato de fraturas maiores (B). Valores expressos em média e erro padrão. ....	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 6.1 – Características da população de acordo com a presença ou ausência de DM .	38
Tabela 6.2 – Características de acordo com a presença ou não de DM e fraturas . . . . .	40

## **LISTA DE ANEXOS**

<b>ANEXO A – Questionário para coleta de dados.....</b>	<b>52</b>
---	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES	<i>Anti inflamatórios não esteroidais</i>
AVC	<i>Acidente Vascular Cerebral</i>
CD163	<i>Receptor CD163 do TWEAK</i>
CCS	<i>Centro de Ciências da Saúde</i>
CE	<i>Ceará</i>
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DMO	<i>Densidade Mineral Óssea</i>
DPOC	<i>Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica</i>
DXA	<i>Densitometria Óssea</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Fn14	<i>Receptor 14 do sTWEAK</i>
HUSM	<i>Hospital Universitário de Santa Maria</i>
IL	<i>Interleucina</i>
IMC	<i>Índice de Massa Corporal</i>
M-CSF	<i>Fator estimulador de colônias de macrófagos</i>
MMP-3	<i>Metaloproteinase</i>
MO	<i>Medula Óssea</i>
OMS	<i>Organização Mundial da Saúde</i>
OPG	<i>Osteoprotegerina</i>
PCR	<i>Proteína C Reativa</i>
RANK	<i>Receptor Ativador do Fator Nuclear B</i>
RANKL	<i>Ligante funcional do RANK</i>
RS	<i>Rio Grande do Sul</i>
s-CTX	<i>Serum carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen</i>
s-PINP	<i>Procollagen type I N propeptide</i>
sTWEAK	<i>Forma solúvel do TNF-like weak inducer of apoptosis</i>
TNF $\alpha$	<i>Fator de Necrose Tumoral Alfa</i>
TRANCE	<i>TNF relacionado à ativação induzida por citocinas</i>
TWEAK	<i>TNF-like weak inducer of apoptosis</i>
UBS	<i>Unidades Básicas de Saúde</i>
UFSM	<i>Universidade Federal de Santa Maria</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 HIPÓTESE OPERACIONAL</b> .....	15
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	16
<b>4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
<b>4.1 Diagnóstico de osteoporose</b> .....	18
<b>4.2 Fatores de risco para osteoporose e fraturas ósseas</b> .....	19
<b>4.3 Fisiopatologia da inflamação óssea</b> .....	21
<b>4.4 Marcadores inflamatórios</b> .....	23
<b>4.5 TWEAK e sTWEAK</b> .....	25
<b>4.6 Possível papel do TWEAK e do sTWEAK no desenvolvimento da osteoporose e risco para fraturas ósseas</b> .....	28
<b>4.7 A relação entre DM e fraturas ósseas</b> .....	30
<b>5 METODOLOGIA</b> .....	32
<b>5.1 Delineamento do estudo</b> .....	32
<b>5.2 Sujeitos de pesquisa</b> .....	32
<b>5.3 Critérios de inclusão</b> .....	32
<b>5.4 Critérios de exclusão</b> .....	32
<b>5.5 Considerações éticas</b> .....	32
<b>5.6 Coleta de dados</b> .....	33
5.6.1 Fator em estudo .....	33
5.6.2 Desfecho .....	33
5.6.3 Variáveis coletadas .....	33
5.6.4 Co-variáveis .....	33
5.6.5 Questionários .....	34
5.6.6 Procedimentos .....	34
5.6.6.1 Identificação das participantes e recrutamento .....	34
5.6.6.2 Procedimentos para aferição das variáveis e co-variáveis clínicas .....	34
5.6.6.3 Procedimentos para aferição das variáveis bioquímicas .....	35
<b>5.7 Cálculo da Amostra</b> .....	36
<b>5.8 Análise estatística</b> .....	37
<b>6 RESULTADOS</b> .....	38
<b>6.1 Resultados sTWEAK e DM</b> .....	38
<b>6.2 Resultados sTWEAK e história de fraturas maiores e estratificação adicional pelo diagnóstico de DM</b> .....	39
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	41
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	45
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	46
<b>ANEXOS</b> .....	51

## 1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é um transtorno osteometabólico caracterizado pela diminuição da densidade mineral óssea (DMO) e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo com o consequente aumento da fragilidade do osso e suscetibilidade à fraturas (NETO *et al.*, 2002; VASIKARAN *et al.*, 2011; KANIS, 1994). De acordo com Brown *et al.* (2009), a osteoporose é a causa mais comum de fraturas por fragilidade. O risco durante a vida de apresentar fratura por osteoporose, nos EUA, é estimado em 39,7% para mulheres e 13,2% para homens, sendo também associado com consideráveis índices de morbidade e mortalidade em adultos idosos (SPONHOLTZ *et al.*, 2013).

Essa doença é de importância crescente, tendo-se em vista o aumento da expectativa de vida populacional, que no Brasil é de aproximadamente 72 anos para as mulheres (COSTA-PAIVA *et al.*, 2003). Somente em 1990, o número de fraturas por osteoporose estimadas na Europa foi de 2,7 milhões, com um custo estimado em 2004 de €36 bilhões, sendo que €24,3 bilhões foram gastos unicamente com fraturas de quadril. Nos EUA, o custo anual com fraturas incidentes devidas à osteoporose ou perda de massa óssea foi de aproximadamente \$16,9 bilhões em 2006 esperando-se que o mesmo atinja cerca de \$25,3 bilhões no ano de 2025 (VASIKARAN *et al.*, 2011).

A redução da massa óssea ocorre em razão de um desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea. No esqueleto adulto jovem a reabsorção e a formação óssea são balanceadas, favorecendo o acúmulo mineral até os 35 anos de idade. Na menopausa, há tanto aceleração do remodelamento ósseo, quanto um aumento da reabsorção em relação à formação óssea (BROWN *et al.*, 2009).

O impacto individual desse problema se deve ao risco aumentado de complicações que vêm associadas após a ocorrência de fraturas, como hospitalização, institucionalização, fraturas e morte. Esses fatores podem ser cumulativos agravando ainda mais o problema já estabelecido (PINHEIRO; EIS, 2010). Dados mostram que cerca de 15% a 30% dos pacientes com fratura de quadril morrem durante o primeiro ano após o evento, principalmente devido a complicações como infecção, trombose venosa e úlceras de pressão, ou a outras condições associadas como doenças cardiovasculares. Além disso, esses pacientes têm grande risco de se tornarem dependentes ou institucionalizados após a fratura. Na América Latina, incluindo São Paulo, os custos diretos por pessoa devido à fratura de quadril são estimados em torno de 4,5 a 6 mil dólares

(PINHEIRO; EIS, 2010).

Apesar da prevenção de osteoporose e de fraturas ósseas ser de baixo custo e fácil execução e implementação (PINHEIRO *et al.*, 2010), além da disponibilidade de tratamentos para prevenção e manejo da osteoporose, com redução efetiva de fraturas vertebrais (50% a 65%), e não vertebrais (25% a 40%), a maioria da população brasileira ainda não tem acesso ao diagnóstico precoce e às terapias apropriadas para a doença. Com base nisso, pesquisas científicas sobre a fisiopatologia, métodos diagnósticos e tratamentos para osteoporose são necessárias. Essas pesquisas têm um importante papel para o conhecimento científico, clínico e minimização das complicações associadas a essa doença.

Estudos com animais *in vitro* suportam a hipótese de que citocinas pró inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) influenciam, juntamente com o fator idade e fator estrogênio, na diminuição da DMO. Eles promovem proliferação e a maior atividade e sobrevivência de osteoclastos, enquanto estimulam a apoptose de osteoblastos (SPONHOLTZ *et al.*, 2013). Entre essas citocinas pró-inflamatórias, poderia também estar envolvida na patogênese da osteoporose a citocina “TNF-like weak inducer of apoptosis” (TWEAK).

O sTWEAK, forma solúvel do TWEAK, é uma citocina inflamatória pertencente à superfamília do fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). Ele modula múltiplas respostas biológicas associadas a danos e reparação tecidual, como proliferação, diferenciação, inflamação, apoptose e angiogênese. Age principalmente associado ao fator indutor de crescimento de fibroblasto, o receptor 14 (Fn14) (JASIEWICZ *et al.*, 2014). Essa citocina foi descoberta recentemente, sendo descrita pela primeira vez em 1997, por Chicheportiche *et al* (CHICHEPORTICHE *et al.*, 1997).

O TWEAK pode ser expresso em uma variedade de órgãos, tecidos e tipos celulares, com altos níveis no coração, cérebro, pâncreas, tecido músculo esquelético e adiposo. Nos últimos anos, alguns estudos investigaram a associação entre o sTWEAK e doenças ou transtornos metabólicos. Nesses transtornos, recentemente, o TWEAK destacou-se como importante regulador do equilíbrio inflamatório e antiinflamatório que ocorre na resistência insulínica. Associado ao DM do tipo 2, o sTWEAK em níveis mais baixos tem sido descrito como fator de risco (VENDRELL; CHACÓN, 2013). Díaz-López *et al* (2013) confirmaram esses achados em uma população de alto risco cardiovascular composta por homens e mulheres entre 55 e 80 anos, desenvolvendo um estudo comparando os níveis dessa citocina em 153 pacientes com DM e 306 sem esse diagnóstico. O mesmo autor (DÍAZ-LÓPEZ *et al.*, 2014), em um estudo

mais recente, de delineamento transversal, avaliando 432 indivíduos não diabéticos (homens e mulheres entre 55 e 80 anos) buscou a associação entre os níveis de sTWEAK e o diagnóstico de síndrome metabólica, e também encontrou níveis reduzidos dessa citocina nessa patologia.

Desta forma, o sTWEAK tem se apresentado na literatura como um marcador inflamatório que também pode possuir um papel na síndrome metabólica e no DM, e pode estar relacionado ao desenvolvimento de osteoporose e fraturas ósseas.

A partir disso, constata-se a importância de pesquisar sobre esse tema, visto que ainda não foi descrito na literatura se as concentrações plasmáticas do sTWEAK, geralmente alteradas no *diabetes mellitus* e síndrome metabólica e vinculados a um estado de inflamação crônica, podem estar ou não associados a fraturas por fragilidade indicativas de osteoporose. No que concerne ao conhecimento científico, esta pesquisa será a primeira a buscar a relação entre fraturas ósseas maiores e níveis plasmáticos de sTWEAK, e a primeira no Brasil a avaliar a relação entre sTWEAK e DM. Além disso, contribuirá com informações sobre a relevância dos níveis plasmáticos deste marcador inflamatório nas patologias em estudo, como o seu valor na fisiopatologia, no diagnóstico, prognóstico e tratamento delas.



## **2 HIPÓTESE OPERACIONAL**

As concentrações plasmáticas de sTWEAK, marcador inflamatório associado ao DM, podem encontrar-se alteradas em mulheres com história de fraturas ósseas por fragilidade.

### 3 OBJETIVOS

- Objetivo Geral:

O objetivo principal do presente estudo é avaliar a associação entre as concentrações plasmáticas de sTWEAK e o relato de fraturas ósseas maiores e de DM em mulheres na pós menopausa que consultam nas unidades básicas de saúde da cidade de Santa Maria-RS.

- Objetivos Específicos:

- Avaliar os níveis plasmáticos de sTWEAK utilizando o método de ELISA;
- Avaliar parâmetros bioquímicos da população em estudo.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A incidência de fraturas osteoporóticas varia entre as diferentes regiões do globo. Por exemplo, dados prévios sobre a fratura de fêmur nos anos 90 indicavam que a mesma ocorria na taxa de 90 para cada 1000 pessoas na América Latina, ao passo que na Europa os mesmos eram de 407 para cada 1000, dados ainda inferiores ao observados na Ásia, que eram de 582 para cada 1000 indivíduos (SAMBROOK P; COOPER C, 2006). Na realidade, pouco se sabe sobre a epidemiologia da osteoporose e das fraturas por fragilidade óssea na população brasileira, existindo poucos dados consistentes sobre a prevalência e a relevância dos fatores de risco (PINHEIRO; EIS, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2010, 2009). Nos trabalhos realizados, foi observado que as fraturas por osteoporose, especialmente as fraturas de quadril, apresentaram alta prevalência (cerca de 17%), estando associado à piora da qualidade de vida e aumento da mortalidade (PINHEIRO *et al.*, 2010). Entretanto, quando verificadas as taxas anuais de incidência de fraturas de quadril ajustadas para a idade em grandes cidades como Porto Alegre-RS e Fortaleza-CE, estas foram aproximadamente 10 vezes menores do que as reportadas em populações caucasianas do hemisfério norte, o que pode ter sido ocasionado pelo sub-registro das fraturas (PINHEIRO; EIS, 2010).

O estudo BRAZOS (PINHEIRO *et al.*, 2010) foi o primeiro estudo epidemiológico brasileiro, de base populacional, idealizado para identificar os principais fatores clínicos de risco associados a fraturas por baixo impacto em uma amostragem representativa da população brasileira adulta. Os autores avaliaram um total de 2420 indivíduos provenientes das 5 regiões do país, com mais de 40 anos de idade, buscando a prevalência de fatores de risco para fraturas. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas da prevalência de fraturas entre as 5 regiões do país, de acordo com sexo e classe social. Esse mesmo estudo estimou que 15,1% das mulheres apresentam antecedentes de fraturas por osteoporose. Curiosamente, a proporção de quedas entre mulheres e homens variou conforme a região. A prevalência entre as mulheres no sul foi de 14,9%, enquanto no centro-oeste a prevalência foi de 35,7% (PINHEIRO *et al.*, 2010).

#### 4.1 Diagnóstico de osteoporose

Apesar da importância da massa óssea na avaliação, a osteoporose é definida como uma doença caracterizada por resistência óssea comprometida e risco aumentado de fraturas (COSTA-PAIVA *et al.*, 2003).

O diagnóstico clínico da osteoporose pode ser realizado na presença de fratura óssea por fragilidade, particularmente fraturas vertebrais, de quadril, punho, úmero, costelas e pelve, sem medida da DMO. As fraturas por fragilidade são aquelas que ocorrem após quedas da própria altura ou altura menor, sem trauma maior, como um acidente de automóvel. Certos locais do esqueleto ósseo incluindo coluna cervical, mãos, pés e tornozelos não estão associados com fraturas por fragilidade. Fraturas por estresse também não são consideradas fraturas por fragilidade, já que são devidas ao esforço repetitivo (DREZNER; ROSEN, 2014).

Na falta de fratura por fragilidade, o acesso à DMO por densitometria óssea (DXA) é o teste padrão ouro para o diagnóstico de osteoporose (DREZNER; ROSEN, 2014). Apesar da redução da massa óssea estar relacionada ao aumento do risco de fraturas, o aumento da DMO em resposta ao tratamento não demonstra correlação direta com a redução das fraturas (PEREIRA; DOMICIANO; SIMÕES, 2011).

Os resultados da DXA devem ser interpretados pela comparação da DMO da paciente em questão com a média da população adulta jovem normal, para o mesmo sexo e raça correspondente ao número de desvios padrões acima ou abaixo da média da DMO para adultos jovens normais (PEREIRA; DOMICIANO; SIMÕES, 2011). Para a classificação da DMO são utilizados os critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde em valores de T-score (adulto jovem) de acordo com as seguintes categorias: normal: valor de DMO dentro de 1 DP da média do adulto jovem de referência; osteopenia: valor de DMO entre -1 e -2,5 DP da média do adulto jovem de referência, e osteoporose: valor de DMO abaixo de -2,5 DP da média do adulto jovem de referência (COSTA-PAIVA *et al.*, 2003). Dessa maneira, a osteoporose é definida, pela DXA, como um T-score menor ou igual a -2,5 DP (desvios padrão) na coluna lombar, colo de fêmur ou fêmur total (KANIS, 1994).

Recomenda-se a DXA como referência na avaliação para o diagnóstico da osteoporose, mas devemos considerar a ultrassonografia ou tomografia óssea periférica, ambas avaliações quantitativas, marcadores bioquímicos e o algoritmo da OMS para avaliar o risco futuro de fraturas (FRAX), como ferramentas auxiliares no diagnóstico (PEREIRA; DOMICIANO; SI-

MÕES, 2011).

#### 4.2 Fatores de risco para osteoporose e fraturas ósseas

A osteoporose é reconhecida como uma doença multifatorial, sendo 70% desses fatores não modificáveis, isto é, definidos pela carga genética, e 30% potencialmente modificáveis e, assim, envolvidos com os aspectos ambientais (PINHEIRO *et al.*, 2009). Diferenças genéticas, raciais e antropométricas, bem como da composição corporal, densidade óssea, dieta, atividade física e outros hábitos de vida contribuem para explicar as divergências na incidência e na prevalência de baixa densidade óssea e fraturas nas diversas regiões do mundo (SIQUEIRA; FACCHINI; HALLAL, 2005). Dados sobre fatores de risco clínicos para osteoporose encontrados nos estudos brasileiros foram similares aos observados no cenário internacional. Baixos níveis de atividade física, idade, tabagismo e fatores dietéticos têm sido associados com aumento do risco de osteoporose e fraturas no nosso país (PINHEIRO; EIS, 2010).

Fatores de risco associados a fraturas, que contribuem independentemente da DMO, incluem: idade avançada, sexo feminino e fratura prévia por fragilidade (PINHEIRO; EIS, 2010). Estudos como o de Cauley *et al.* (2007) mostraram significância estatística quanto à maior frequência de fatores de risco, como raça branca e sexo feminino, entre as pessoas que sofreram fraturas por osteoporose. Com relação ao fator de risco idade, a mulher tem uma perda aproximada de 35% de seu osso cortical durante a vida. A principal causa dessa perda óssea associada à idade é provavelmente devida a um decréscimo de formação óssea em nível celular, resultado da ação diminuída dos osteoblastos (COSTA-PAIVA *et al.*, 2003). Corroboram esses achados, dados que afirmam que partir dos 50 anos, 30% das mulheres e 13% dos homens poderão sofrer algum tipo de fratura (NETO; *et al.*, 2002).

Os estudos envolvendo a população brasileira e que avaliaram fatores de risco associados a fraturas destacaram como os principais: idade avançada, história de fratura prévia, história familiar de fraturas ósseas, menopausa precoce, baixos níveis de atividade física, baixa qualidade de vida, diabetes mellitus, baixa ingestão de fosfato, baixa densidade mineral óssea, uso de benzodiazepínicos e quedas. Além disso, entre os principais fatores de risco associado a quedas no Brasil estão: demência, *delirium*, uso atual de bloqueadores de canais de cálcio, benzodiazepínicos, idade avançada e consumo de álcool (PINHEIRO; EIS, 2010). Nas mulheres brasileiras, de acordo com Pinheiro *et al.* (2010), os fatores de risco mais importantes para fraturas de baixo impacto foram a idade avançada, menopausa precoce, sedentarismo, pior qualidade de

vida, maior consumo de fósforo, diabetes mellitus, quedas, uso crônico de benzodiazepínicos e história familiar de fratura de fêmur após os 50 anos em parentes de primeiro grau.

A contribuição independente de diferentes fatores de risco pode ser estratificada, permitindo o cálculo do risco absoluto para fraturas com a ferramenta FRAX, que surgiu de um estudo colaborativo no Reino Unido. Desde a validação do FRAX, as decisões terapêuticas no manejo da osteoporose têm sido crescentemente baseadas na probabilidade do paciente em apresentar fratura por fragilidade óssea (VASIKARAN *et al.*, 2011).

O estudo GLOW (2012), que acompanhou uma coorte de mulheres no período da pós menopausa, avaliou a associação entre comorbidades e risco de fraturas ósseas e concluiu que todas as comorbidades recordadas pelos pacientes, estiveram significativamente associadas com fraturas, exceto as altas taxas de colesterol, a hipertensão, doença celíaca e neoplasias. A associação mais forte foi com a doença de Parkinson. Essa forte associação provavelmente seja devida ao maior risco de quedas nessa população, assim como também às drogas dopaminérgicas utilizadas e à baixa ingestão de cálcio e exposição solar, resultando em níveis mais baixos de vitamina D.

Outro fator de risco de importância da população de mulheres na pós menopausa é a deficiência de estrogênio. Ela, associada com a menopausa, resulta no aumento do remodelamento ósseo e em um desbalanço entre a formação e a reabsorção óssea. Esse resultado se mantém por várias décadas antes da menopausa e é associado com a acelerada perda óssea (VASIKARAN *et al.*, 2011).

Um dos principais fatores de risco para fraturas ósseas associada à osteoporose é a queda. A fratura de quadril na osteoporose pode ocorrer em 90% em virtude de quedas e o restante em virtude de movimentos de torção do fêmur com queda conseqüente. Se conseguirmos evitar a queda, evitaremos 90% das fraturas de quadril (NETO; *et al.*, 2002).

As fraturas ósseas podem ser também preditas por altos níveis de marcadores de *turnover* ósseo, independentemente da DMO em mulheres na pós menopausa. Esses marcadores têm sido propostos na prática clínica por anos, mas ainda são necessárias evidências que sustentem o uso deles. Eles fornecem informações da farmacodinâmica na resposta ao tratamento da osteoporose e, dessa forma, são usados para acompanhamento do tratamento. Exemplos desses marcadores são: s-P1NP (*procollagen type 1 N propeptide*), um marcador de formação óssea, e o s-CTX (*serum carboxy-terminal cross-linking telopeptide of type 1 collagen*), um marcador de reabsorção óssea. Outros exemplos são a osteocalcina e a fosfatase alcalina. Os marcadores

de *turnover* ósseo não fazem parte do escore FRAX® devido à escassez de estudos prospectivos envolvendo-os (VASIKARAN *et al.*, 2011).

Finalmente, doenças inflamatórias também representam fatores de risco para osteoporose, como a doença celíaca e doença pulmonar obstrutiva crônica. Entretanto, outros fatores de risco para osteoporose também estão presentes nesses pacientes com doenças inflamatórias, que devem ser observados e corrigidos. São eles: diminuição da atividade física, perda muscular ou dor articular, imobilização, pobre estado nutricional secundário à má absorção ou ao aumento do gasto energético basal, além da diminuição da ingestão de cálcio e do uso de medicações, como glicocorticóides, que também representam um importante fator de risco para diminuição da DMO (LACATIVA; FARIAS, 2010). São outros exemplos de doenças associadas com osteoporose: AVC, asma, esclerose múltipla, doença cardiovascular e diabetes mellitus (DENNISON *et al.*, 2012). Estudos em animais e *in vitro* suportam a hipótese de que citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-6 (IL6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) influenciam na DMO, além da idade e da deficiência de estrogênios, que é um importante determinante de inflamação entre as mulheres. A diminuição de estrogênios em mulheres na pós-menopausa também tem sido relacionado com o aumento de marcadores inflamatórios (SPONHOLTZ *et al.*, 2013).

### 4.3 Fisiopatologia da inflamação óssea

Todas as doenças envolvendo perda óssea têm uma base em comum: os osteoclastos são células exclusivamente responsáveis pela reabsorção óssea e a osteoporose ocorre quando a atividade dos osteoclastos supera a atividade dos osteoblastos (LACATIVA; FARIAS, 2010).

Os osteoblastos sinalizam a diferenciação e a maturação de precursores de osteoclastos, e determinam o recrutamento de osteoclastos maduros, levando à reabsorção. Além disso, após um período de vida de cerca de 2 a 3 semanas, ocorre apoptose dos osteoclastos e os osteoblastos são movidos para o local de reabsorção, sintetizando uma nova matriz (BROWN *et al.*, 2009).

A Inflamação tem um papel importante na modulação da reabsorção óssea, o que ocorre basicamente por meio de dois mecanismos:

- *Receptor ativador do fator nuclear B (RANK)*, também conhecido como TRANCE (TNF-relacionado à ativação induzida por citocinas), e seu ligante funcional (RANKL).
- *Fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF)*, que regula a osteoclastogênese.

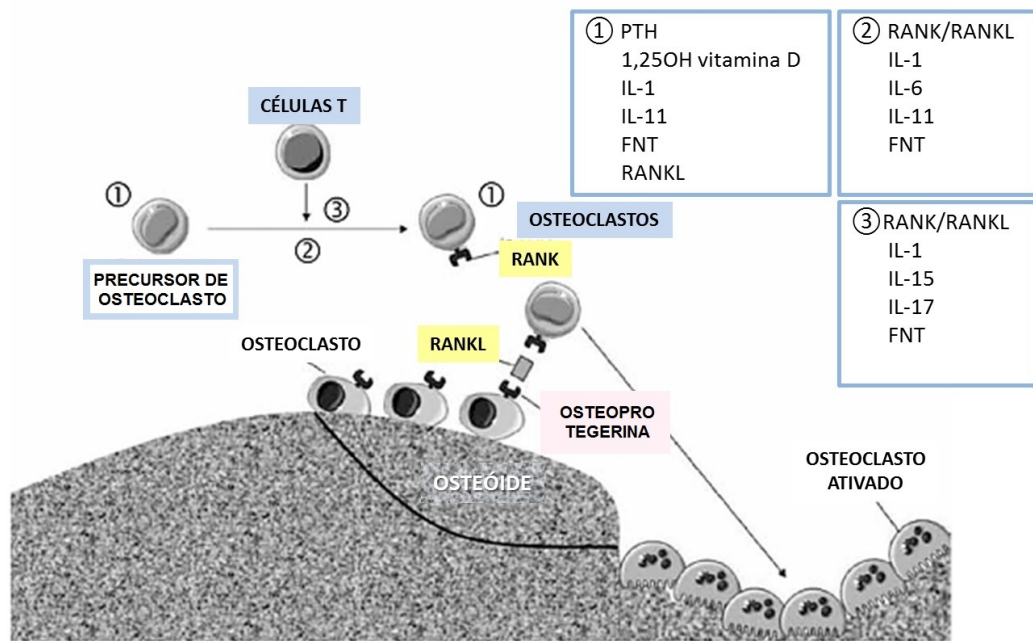


Figura 4.1 – Ação dos marcadores inflamatórios, hormônios e ligantes na reabsorção óssea  
Adaptado de LACATIVA; FARIAS, 2010.

O RANKL é um receptor do fator de necrose tumoral (TNF), que reconhece o RANK na superfície do osteoclasto por uma interação direta célula-célula. O RANKL é uma proteína chave na osteoclastogênese que, por meio da ligação RANK-RANKL estimula vários fatores de transcrição e mitose (LACATIVA; FARIAS, 2010).

O fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) é produzido por células do estroma da MO, sendo essencial para a proliferação e sobrevivência dos macrófagos. Liga-se ao seu receptor c-Fms em células precursoras de osteoclastos, promovendo sua diferenciação, via ação do RANKL. Estudos têm mostrado que as populações puras de osteoclastos in vitro são conseguidas por cultivo de macrófagos da MO apenas na presença do RANKL e do M-CSF (LACATIVA; FARIAS, 2010).

Na cadeia inflamatória que age na patogênese da osteoporose, além do RANK/RANKL e M-CSF, também tem-se a ação de citocinas pró-inflamatórias, que são fatores produzidos por leucócitos ativados e induzem a formação e ativação de osteoclastos. Algumas das principais citocinas relacionadas à reabsorção óssea pelos osteoclastos são: TNF alfa, IL-1, IL-11, IL-15, IL-17. Também há a ação do fator de necrose tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), que é expresso por linfócitos T. Ele promove a perda óssea em condições tais como osteólise associada à inflamação, perda óssea alveolar na inflamação periodontal e na osteoporose pós menopausa. É provavel-



mente a citocina chave na perda óssea periarticular em algumas doenças inflamatórias, como a artrite reumatoide. A ação do  $TNF\alpha$  sobre os osteoclastos ocorre quando células da medula são expostas a ele. Estas células produzem RANKL (que tem ação sinérgica ao  $TNF\alpha$ ), M-CSF e IL1, promovendo a formação de osteoclastos e sua ativação. Além disso, o  $TNF\alpha$  prolonga a vida útil do osteoclasto com uma ação anti apoptose (LACATIVA; FARIAS, 2010). Novas pesquisas também têm mostrado que o  $TNF\alpha$  desempenha uma ação direta sobre os osteoclastos, independentemente da ação sinérgica do RANKL (CAULEY et al., 2007).

Outra citocina pró-inflamatória envolvida é a interleucina 1 cuja principal fonte são os macrófagos. Sua produção é estimulada pelo  $TNF\alpha$  que, por sua vez, tem seu efeito osteoclastogênico mediado pela própria IL1. Esta última também estimula a ação dos osteoclastos aumentando a produção de M-CSF e inibindo a apoptose dessas células (LACATIVA; FARIAS, 2010). A interleucina 6 também é uma citocina multifuncional que parece exercer um grande número de efeitos no osso (CAULEY et al., 2007).

#### **4.4 Marcadores inflamatórios**

Há um aumento do entendimento e do reconhecimento do papel do sistema imune no desenvolvimento da osteoporose. Múltiplas citocinas (pró-inflamatórias e anti-inflamatórias) interagem com hormônios para regular a diferenciação e a atividade de osteoclastos e osteoblastos (BARBOUR *et al.*, 2012; CAULEY *et al.*, 2007). Entretanto, estudos relacionando DMO e citocinas pró-inflamatórias têm mostrado resultados conflitantes (SPONHOLTZ *et al.*, 2013).

Vários marcadores inflamatórios, quando em níveis elevados, têm sido associados a diversos tipos de doenças, inclusive doenças com acometimento ósseo, como artrite reumatóide. Interleucina-6 (IL-6), interleucina 1 (IL1) e fator de necrose tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ) são citocinas que exercem um grande papel no remodelamento ósseo. Muitos estudos têm mostrado o envolvimento de marcadores inflamatórios na patogênese da osteoporose. Eles atuam na superfície de células mesenquimais e nos precursores de osteoclastos aumentando a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos (BARBOUR *et al.*, 2012). As concentrações séricas de interleucina 6 sR se mostram significativamente mais altas em mulheres com osteoporose, havendo uma relação inversa entre interleucina 6 e DMO na coluna lombar, como podemos constatar no estudo de Cauley *et al* (2007).

A PCR é um marcador inflamatório que tem sido estudado com mais detalhe, princi-

palmente com relação às doenças cardiovasculares. Está envolvido tanto na imunidade inata quanto na remoção de células necróticas e apoptóticas. Seus níveis elevados têm sido observados em pacientes hospitalizados com fraturas, refletindo o evento agudo traumático. Esse marcador tem sido inversamente relacionado com a DMO em mulheres na pré ou na pós menopausa (CAULEY *et al.*, 2007).

Marcadores de remodelamento ósseo também estão emergindo como ferramentas promissoras no manejo da osteoporose na pós menopausa, já que eles fornecem uma informação dinâmica sobre o esqueleto que é independente de, ou complementar às medidas da DMO. No passado, esses marcadores eram reservados para uso em pesquisas. Entretanto, como clinicamente eles têm sido relacionados com risco de fraturas, seu uso vêm aumentando na prática clínica. Entre esses marcadores, alguns envolvidos na formação óssea são: P1NP e fosfatase alcalina osso específica. Alguns exemplos de marcadores envolvidos na reabsorção óssea são: N-telopeptide e C-telopeptide (BROWN *et al.*, 2009).

Ainda não é bem clara a associação entre marcadores pró-inflamatórios e fraturas de quadril (BARBOUR *et al.*, 2012). O estudo de Barbour *et al.* (2012) avaliou 400 casos de fraturas de quadril e comparou com 400 controles, pareados para idade, raça e data da coleta de sangue, e mostrou que níveis elevados de marcadores inflamatórios para os receptores solúveis de 3 citocinas pró-inflamatórias (IL-6; TNF SR1; TNF SR2), dosados por meio da utilização de kits ELISA, foram associados com o aumento do risco de fraturas de quadril em mulheres idosas.

O estudo transversal de Sponholtz *et al* (2013) avaliou, por meio do método de ELISA, os níveis séricos de IL-6, TNF $\alpha$  e PCR em uma população de 1293 homens, 231 mulheres na pré menopausa, 498 mulheres na pós menopausa em uso de terapia de reposição hormonal e 893 mulheres na pós menopausa sem uso de hormonioterapia. Esse estudo encontrou uma associação inversa entre IL-6 e DMO no trocanter, assim como PCR e DMO na cabeça do fêmur e trocanter em mulheres na pré-menopausa. Já em mulheres na pós menopausa, em uso de terapia hormonal, a PCR esteve associada positivamente com a DMO na cabeça do fêmur, e não houve associação entre esses marcadores e DMO no grupo de mulheres na pós menopausa sem uso de terapia hormonal. Por fim, esse estudo sugere que concentrações séricas de marcadores inflamatórios podem não estar associadas à baixa DMO (SPONHOLTZ *et al.*, 2013).

Por outro lado, o estudo de Cauley *et al* (2007) avaliou uma população de 2985 mulhe-

res e homens entre 70 e 79 anos e foram dosados os marcadores inflamatórios IL-6, TNF, PCR, e seus receptores solúveis (IL-2 sR, IL-6 sR, TNF sR e TNF sR2). As dosagens das citocinas e seus receptores solúveis também foram realizadas utilizando-se o método de ELISA. Além disso, também foi avaliada a DMO do quadril total. Após acompanhamento por  $5.8 \pm 1.6$  anos, fraturas incidentes foram confirmadas em 268 pessoas, e o risco de fraturas foi comparado entre os sujeitos que tiveram os mais altos níveis de marcadores inflamatórios (4º quartil) e entre os que apresentaram níveis mais baixos (quartis 1, 2 e 3). Como resultado, constataram que os níveis séricos de marcadores inflamatórios eram maiores nas pessoas que apresentaram fraturas incidentes, concluindo que a elevação desses marcadores são fatores associados a fraturas osteoporóticas. Nesse estudo, os participantes que tiveram níveis de, no mínimo, 3 marcadores inflamatórios no quartil superior e os que apresentaram níveis mais altos de  $TNF\alpha$ , tiveram risco aumentado de fraturas em 33%. É importante destacar que essas associações foram independentes de baixos níveis de atividade física, condições clínicas associadas que possam aumentar o risco individual de fraturas, e uso de medicações, como antiinflamatórios não esteroidais (AINES) e estatinas, que podem diminuir os níveis de marcadores inflamatórios. Estes achados reforçam a hipótese do importante papel da inflamação nas fraturas osteoporóticas.

Ainda não é possível afirmar se a resposta inflamatória é fator de risco para fraturas ou um indicador de um processo subclínico que predispõe a fraturas (CAULEY *et al.*, 2007).

#### 4.5 TWEAK e sTWEAK

O TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) é uma molécula membro da superfamília de citocinas do TNF, produzida por macrófagos (DHARMAPATNI *et al.*, 2011; DÍAZ-LÓPEZ *et al.*, 2013), descrita pela primeira vez em 1997, por Chicheportiche *et al.* (CHICHEPORTICHE *et al.*, 1997). Assim como os outros membros da superfamília TNF, o TWEAK apresenta-se em múltiplas formas: mTWEAK, que é ligado à membrana, e sTWEAK, que é uma variante solúvel. Essas duas formas são biologicamente ativas (ATES *et al.*, 2014). O TWEAK é sintetizado como uma glicoproteína transmembrana tipo II e, após, atinge a circulação sanguínea na sua forma bioativa solúvel (sTWEAK) (DÍAZ-LÓPEZ *et al.*, 2013).

Recentemente, o TWEAK tem aparecido como um novo fator de importância no processo inflamatório crônico, assim como o seu receptor, também membro da família do TNF, o fator indutor de crescimento de fibroblastos 14 (Fn14) (DÍAZ-LÓPEZ *et al.*, 2013). Quando o TWEAK é ligado ao seu receptor, ocorre a ativação da via do fator nuclear kB (NF-kB) dando

início uma variedade de atividades biológicas, incluindo a estimulação de células de crescimento, angiogênese, migração celular e diferenciação, indução de citocinas pró inflamatórias, resposta imune, estimulação da apoptose e regulação do tecido de regeneração e reparação (2,4,3,6). O TWEAK é capaz de aumentar a expressão de várias moléculas envolvidas na resposta inflamatória, tais como secreção de interleucina-8 e interleucina-6 (HOSOKAWA *et al.*, 2006).

Outro receptor do TWEAK também foi recentemente identificado: o receptor CD163 (DÍAZ-LÓPEZ *et al.*, 2013). Esse é um receptor *scavenger* exclusivamente expresso por monócitos e macrófagos. É considerado um marcador da população de macrófagos e de atividade antiinflamatória. A expressão do CD163 é aumentada durante a fase de resolução da resposta aguda inflamatória e também em doenças inflamatórias crônicas, possivelmente refletindo um mecanismo de regulação, adaptação e homeostasia. Este receptor tem aparecido como um receptor específico do sTWEAK em monócitos e macrófagos, ao contrário do receptor Fn14, que raramente é expresso na superfície de macrófagos. A interação do sTWEAK com o CD163 pode ser o mecanismo que regula as reações antiinflamatórias (JASIEWICZ *et al.*, 2014).

O TWEAK mRNA é expresso em uma grande variedade de tecidos e células, entre eles o coração, o cérebro, o sistema músculo-esquelético, o pâncreas, o cólon, os pulmões, os ovários, a próstata, os rins, os testículos e o fígado. Sua expressão também foi observada em várias linhagens celulares tumorais humanas. Ademais, o TWEAK exerce um papel importante na formação angiogênica de novos vasos durante o crescimento tumoral primário e em metástases (BROWN *et al.*, 2009; SPONHOLTZ *et al.*, 2013). Os efeitos pró-inflamatórios do TWEAK são vistos também em vários tipos celulares incluindo células mesangiais glomerulares, células endoteliais da veia umbilical, fibroblastos da gengiva humana e pele, sinoviócitos e condrócitos (DHARMAPATNI *et al.*, 2011).

Altos níveis de TWEAK, TNF $\alpha$  e interleucina-6 têm sido observados em pacientes com artrite reumatóide quando comparados com controles saudáveis. O TWEAK tem demonstrado promover a destruição óssea e cartilaginosa na artrite reumatóide. Essa ação ocorre por meio da inibição da condrogênese, osteogênese e pela indução da produção de metaloproteinase (MMP)-3. Além disso, recentemente foi demonstrado uma relação significativa entre níveis séricos de TWEAK e marcadores de erosão óssea em pacientes com doença óssea associada ao mieloma múltiplo. O TWEAK, sozinho ou associado ao TNF $\alpha$ , induz a expressão por meio de osteócitos e osteoblastos *in vitro* e no osso *in vivo*, de esclerostina, um inibidor da formação óssea,

sugerindo uma forma como o TWEAK pode inibir a formação óssea durante o remodelamento ósseo na inflamação (DHARMAPATNI *et al.*, 2011).

Níveis séricos altos de TWEAK têm demonstrado uma correlação com uma boa resposta ao uso de etanercept (Enbrel) em pacientes com artrite reumatóide, assim como uma correlação com a atividade da doença. Também, altos níveis de TWEAK têm sido encontrados no líquido sinovial em pacientes com artrite reumatóide, quando comparado com o líquido sinovial em pacientes com artrite psoriática (DHARMAPATNI *et al.*, 2011).

Vários autores buscam a associação entre os níveis séricos de sTWEAK e outras patologias. Estudos recentes têm demonstrado um importante papel do sTWEAK na patogênese da aterosclerose, assim como fator prognóstico dessa citocina na insuficiência cardíaca e infarto agudo do miocárdio. A via TWEAK/Fn14 exerce um importante papel na regulação cardíaca, particularmente de ventrículo direito, hipertrofia e fibrose (NOVOYATLEVA *et al.*, 2013). Além disso, Karadurmus *et al.* (2012), avaliando pacientes com hipertensão primária não tratada, observou que eles apresentavam níveis mais baixos circulantes de sTWEAK, comparados com o grupo controle, destacando, assim, o possível papel do sTWEAK na disfunção endotelial e envolvimento na fisiopatologia da aterosclerose.

Estudos transversais têm mostrado que as concentrações séricas de sTWEAK são diminuídas em pacientes com diabetes melito tipo 1 e diabetes melito tipo 2 (DÍAZ-LÓPEZ *et al.*, 2013). O estudo de caso-controle de Diaz-López *et al.* (2013), que avaliou, por meio do teste ELISA, as concentrações séricas de sTWEAK em uma população com alto risco cardiovascular de 153 pacientes que desenvolveram DM2 em 5 anos e 306 pacientes sem DM2, demonstrou que menores níveis séricos de sTWEAK estão independentemente associados com o desenvolvimento dessa doença. Entretanto, o autor ressalta que mais estudos se fazem necessários para elucidar os mecanismos que possam explicar esses achados (DÍAZ-LÓPEZ *et al.*, 2013). Este mesmo autor, no ano de 2014, avaliou uma população de 452 idosos com alto risco cardiovascular, e concluiu que baixos níveis de sTWEAK estiveram associados com o diagnóstico de síndrome metabólica (DÍAZ-LÓPEZ *et al.*, 2014).

Da mesma forma, comparando 60 pacientes com doença renal em estágio final e 60 pacientes sem perda da função renal, sendo que 30 do grupo controle e 32 do grupo de casos apresentavam diagnóstico de DM2, Kralish *et al.* (2008) concluiu que o sTWEAK esteve inversamente relacionado com DM2 em ambos os grupos. Além disso, os menores níveis estiveram presentes nos pacientes que apresentavam concomitantemente as duas patologias (DM2

e insuficiência renal).

Jasiewicz *et al.* (2014) avaliou a concentração sérica de sTWEAK e de seu receptor *scavenger* sCD163 utilizando o método ELISA, e também a relação sTWEAK/sCD163 em pacientes com hipertensão arterial pulmonar. Seus resultados mostraram achados consistentes com estudos prévios: diminuição da concentração dessa citocina e da relação sTWEAK/sCD163 em pacientes com hipertensão arterial pulmonar.

Doenças auto imunes também tem sido relacionadas aos níveis de sTWEAK, como podemos observar no estudo transversal de Kowal-Bielecka *et al* (2013), que incluiu 89 pacientes com esclerodermia sem uso de drogas imunossupressoras ou corticoesteróides nos últimos 6 meses e que tinham no mínimo 48 anos. Avaliou as concentrações séricas de sTWEAK e sCD163, concluindo que a relação sCD163/TWEAK pode desempenhar um papel importante na patogênese da esclerodermia, mostrando níveis mais altos nestes pacientes, enquanto altos níveis de CD163 poderiam proteger contra o desenvolvimento de úlceras digitais.

Também Wang *et al.* (2012), avaliou o sTWEAK em 62 pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico, e mostrou níveis aumentados dessa citocina nos pacientes, em relação ao grupo controle. Os níveis de sTWEAK também foram ainda maiores nos pacientes com vasculite e várias manifestações clínicas do lúpus, indicando que o TWEAK pode desempenhar um papel complexo também nessa doença.

#### **4.6 Possível papel do TWEAK e do sTWEAK no desenvolvimento da osteoporose e risco para fraturas ósseas**

Não há estudos na literatura que buscaram a relação entre osteoporose e níveis séricos de sTWEAK ou a expressão de seus receptores Fn14 ou CD163. Entretanto, existem estudos que avaliaram as concentrações séricas do sTWEAK e outras doenças que cursam com acometimento ósseo.

Polek *et al.* (2003) relatou que o TWEAK exerce ação sobre a diferenciação de monócitos e macrófagos em osteoclastos, aumentando a ação dessas células. Já Ando *et al.* (2006) analisou a influência do TWEAK e seu receptor Fn14 na função dos osteoblastos e concluiu que a interação TWEAK/Fn14 leva à uma maior expressão do RANKL. Ambos os autores acreditam que o TWEAK provavelmente tem importante papel na fisiopatologia óssea.

O estudo de Dharmapatni *et al.* (2011), analisou, pelo método de ELISA, o líquido sinovial de 17 pacientes com artrite reumatóide ativa e 16 pacientes com osteoartrose, com uma

idade média de 66,4 anos no grupo com osteoartrose e 63,19 anos no grupo com artrite reumatóide. Houve expressão significativamente mais alta de níveis de TWEAK no líquido sinovial dos paciente com artrite reumatóide ativa, artrite reumatóide inativa e osteoartrose, quando comparado com os controles normais. Da mesma forma, foi encontrado níveis significativamente mais altos de TWEAK no líquido sinovial em pacientes com artrite reumatóide ativa em comparação com os pacientes com artrite reumatóide inativa.

Esse mesmo estudo mostrou uma alta expressão do receptor Fn14 na sinóvia de pacientes com artrite reumatóide, quando comparado com os outros grupos. Houve uma diferença estatisticamente significativa entre a expressão do Fn14 em tecidos normais quando comparados com grupos doentes, mas não entre os grupos de artrite reumatóide ativa e inativa (DHARMAPATNI *et al.*, 2011).

Tendo em vista que o TWEAK e seu receptor Fn14 sinalizam vias de vários mecanismos inibitórios que induzem osteólise, incluindo indução de citocinas pró-inflamatórias, estimulação de angiogênese e aceleração da erosão de cartilagens e ossos, Liu Yu-Ping *et al.* (2010) acreditam que a administração intrarticular de anticorpos e proteínas contra TWEAK/Fn14 poderia ser um tratamento promissor, seguro, simples e de baixo custo para a osteólise inflamatória periprotética.

Já o estudo de Wako *et al.* (2007) buscou a relação entre o TWEAK e a histologia de discos intervertebrais, sendo o primeiro estudo a confirmar a expressão do TWEAK e seu receptor Fn14 em tecidos de discos intervertebrais normais. Concluiu que o TWEAK pode ser um novo mediador de degradação de proteoglicanos na degeneração do disco intervertebral.

O mesmo estudo de Dharmapatni *et al.* (2011) descreve que a habilidade do TWEAK em induzir a expressão do RANK na superfície celular por osteoblastos e a possível indução da ativação de linfócitos B nas células plasmáticas sugerem que o TWEAK pode ser proosteoclastogênico e contribuir para a perda óssea associado com doença inflamatória crônica, neste caso, a artrite reumatóide.

Além disso, Vincent *et al.* (2009) sugere que o TWEAK é um fator potencialmente anti-anabólico para o osso. Na cadeia inflamatória, o TWEAK ou TWEAK/TNF deve agir como inibidor da atividade osteogênica dos osteoblastos, por meio da regulação do RUNX2, osterix e expressão da esclerostina. Isso traz novas informações sobre o mecanismo fisiopatológico de remodelamento ósseo e da perda óssea e sobre a pobre reparação óssea que é observada em um número importante de patologias que envolvem perda óssea, incluindo a osteoporose e a artrite

reumatóide.

Os achados bibliográficos são consistentes com as crescentes evidências de que o TWEAK é um mediador da destruição articular na artrite reumatóide tanto em humanos quanto em ratos, e que ele desempenha um papel fundamental na modulação da atividade da doença óssea e articular (DHARMAPATNI *et al.*, 2011).

#### 4.7 A relação entre DM e fraturas ósseas

Como exposto previamente, as fraturas ósseas de baixo impacto estão entre as maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo. Da mesma forma, o DM é uma doença que também exerce grande impacto mundial. Vários estudos têm investigado a relação do DM com fraturas ósseas e com osteoporose e têm mostrado resultados conflitantes.

Uma metanálise, de Janghorbani *et al.* (2007), avaliou 16 estudos que relacionavam DM tipo 1 e 2 e fraturas ósseas. Os resultados mostraram que DM está significativamente associado com o aumento do risco de fraturas de quadril, sendo essa associação maior nos casos com DM do tipo 1, não havendo diferença para o sexo. Nessa metanálise o DM do tipo 2 esteve fracamente associado com fraturas em outros sítios, não mostrando resultados estatisticamente significativos.

Liefde *et al.* (2004), compararam homens e mulheres com e sem diagnóstico de DM. Eles avaliaram a DMO, por meio de DXA, e risco de fraturas nesses indivíduos, e encontraram um risco aumentado de fraturas naqueles com DM, apesar de uma maior DMO nesses mesmos sujeitos, concluindo que há associação do DM com risco de fraturas independente do aumento da DMO. Estes achados foram concordantes com os do estudo SOF (Schwartz *et al.*, 2001), que concluiu que DM é fator de risco para fraturas de quadril, úmero proximal e de pés entre mulheres idosas.

O estudo transversal de Gerdhem *et al.* (2005), que avaliou 1132 mulheres com idade igual ou superior a 75 anos, encontrou DMO 11% maior na cabeça do fêmur e 8% maior na coluna lombar nos indivíduos com DM quando comparadas aos indivíduos sem esse diagnóstico. Apesar desse estudo não ter poder para avaliar o desfecho fraturas, pois apenas 74 mulheres apresentavam diagnóstico de DM, os pesquisadores encontraram um *turnover* ósseo diminuído nessas participantes.

Outros estudos também encontraram uma diminuição do marcador de reabsorção óssea s-CTX em sujeitos com DM2 (ACHEMLAL, 2005; MAGGIO, 2010; REYES-GARCIA, 2013).



Ademais, alterações de osteocalcina, um peptídeo que possui ações tanto na formação óssea quanto na secreção de insulina também foram descritas em sujeitos com DM (ACHEMLAL, 2005; MAGGIO, 2010; SHU, 2012; YAMAMOTO, 2012).

Interessantemente, Dobnig *et al.*(2006) descreveram uma correlação negativa entre o s-CTX e osteocalcina e a hemoglobina A1c em indivíduos com diabetes, sugerindo que outros fatores , tais como o mau controle do DM, possam estar implicados no mecanismo das fraturas nesses pacientes.

Além da hiperglicemia, alterações no metabolismo da vitamina D e hormônio da paratireoide também podem contribuir para o risco aumentado de fraturas em indivíduos com DM (PREMAOR; COMPSTON, 2013). Em indivíduos com DM tipo 2 a presença de obesidade é associada à inflamação sistêmica e a um aumento na produção de citocinas, entre elas o TNF e a IL-6 (PREMAOR; COMPSTON, 2013). Não se sabe se o sTWEAK alterado nos pacientes com diabetes teria alguma associação com as fraturas nesses indivíduos.

## **5 METODOLOGIA**

### **5.1 Delineamento do estudo**

Estudo transversal

### **5.2 Sujeitos de pesquisa**

Mulheres com 55 anos ou mais.

### **5.3 Critérios de inclusão**

Mulheres com idade maior ou igual a 55 anos que tenham consultado nas UBS de seu bairro em Santa Maria, pelo menos uma vez nos últimos 24 meses e que estejam no período pós menopausa.

### **5.4 Critérios de exclusão**

- Pacientes que ainda menstruam;
- Pacientes com déficit cognitivo que as impeçam de responder o questionário;
- Pacientes institucionalizadas;
- Pacientes cujas fraturas relatadas tenham sido por mecanismo de alto impacto ou antes dos 45 anos de idade.

### **5.5 Considerações éticas**

Para a realização deste estudo foram seguidos os princípios éticos da Resolução 466, versão 2012, que regulamenta a pesquisa com seres humanos no Brasil.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) e demais instâncias da instituição (CAAE 11166012.6.0000.5346).

As participantes do projeto foram devidamente esclarecidas sobre os propósitos da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assim como foram devidamente informadas sobre os riscos e benefícios da pesquisa.

Aquelas que tiveram diagnóstico de DM durante o estudo, foram encaminhadas para seu

médico assistente para confirmação diagnóstica.

## **5.6 Coleta de dados**

### 5.6.1 Fator em estudo

Níveis plasmáticos de sTWEAK

### 5.6.2 Desfecho

- Fraturas maiores auto reportadas. São elas: fratura de quadril ou fêmur, costelas, antebraço, úmero, tornozelo, ou fratura vertebral com repercussões clínicas.

- Diagnóstico de diabetes mellitus.

### 5.6.3 Variáveis coletadas

- Questionário em anexo (ANEXO A);

- Análise bioquímica: dosagem sérica de glicose de jejum, colesterol total, triglicerídeos, HDL, LDL, creatinina, albumina, cálcio total, fósforo, sTWEAK;

- Peso;

- Estatura;

- História familiar de fraturas ósseas;

- Tabagismo;

- Abuso de álcool;

### 5.6.4 Co-variáveis

- Comorbidades (descritas no questionário no ANEXO A): Asma, Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC), Osteoartrite, Artrite reumatóide, história de AVC, Doença de Crohn, Doença Celíaca, Doença de Parkinson, Esclerose Múltipla, Câncer, Hipotireoidismo, Dislipidemia;

- IMC;

### 5.6.5 Questionários

O questionário aplicado nestas mulheres foi o do estudo GLOW (2014), no qual os diagnósticos prévios de DM e fraturas foram auto-reportados pelas próprias entrevistadas. Esse instrumento pode ser facilmente aplicado em pessoas com baixo nível de instrução, e foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFSM (CAAE 11166012.6.0000.5346). As informações auto-reportadas têm sido demonstradas, na literatura, como informações confiáveis (CHEN *et al.*, 2004; HONKANEN *et al.*, 1999).

### 5.6.6 Procedimentos

#### 5.6.6.1 Identificação das participantes e recrutamento

Este estudo é aninhado a um estudo de coorte prévio, que está, atualmente, em andamento.

Foram identificadas as participantes do estudo de Copês *et al.*(2014), que são mulheres que consultam nas UBS dos bairros da cidade de Santa Maria-RS e foram reconhecidas por meio de listas da prefeitura. Assim, também foram identificadas as UBS de todos os bairros da cidade de Santa Maria-RS e, então, sorteados os bairros a serem incluídos no estudo.

Essa seleção, que ocorreu no ano de 2013, recrutou um total de 1057 mulheres. A partir dessas voluntárias, todas as mulheres com histórico de fraturas ósseas maiores (aquelas localizadas em quadril ou fêmur, costelas, antebraço, úmero, tornozelo, ou vértebras com repercussões clínicas), com e sem diagnóstico de DM, foram convidadas, por telefone, para coletar, em locais previamente combinados ou no domicílio, 20 ml de sangue para as posteriores dosagens sanguíneas necessárias.

Foram recrutadas, por telefone, aleatoriamente, 52 pacientes para o grupo de fraturas ósseas maiores, com e sem diagnóstico prévio de DM. Além disso, também foram recrutadas, por telefone e aleatoriamente, 57 pacientes com DM e sem fraturas ósseas maiores e 53 pacientes sem DM e sem fraturas.

#### 5.6.6.2 Procedimentos para aferição das variáveis e co-variáveis clínicas

Para avaliar/aferir as medidas antropométricas, foram utilizadas as medidas de peso e altura. O peso foi verificado com balança antropométrica digital com capacidade de 0 a 150 kg e

precisão de 100g. Todas as escalas utilizadas no estudo foram validadas pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2013). A aferição ocorreu com o peso do corpo igualmente distribuído em ambos os pés e os calcanhares unidos. Além disso, também o participante apresentava-se descalço e usando roupas leves (HEYWARD; STOLARCZYK, 2000).

A altura foi estimada com a fita métrica inextensível com medida máxima de 150 cm e exatidão de 0,1 cm e fixada em uma parede sem rodapés e ao piso não acarpetado. De acordo com Heyward e Stolarczyk (2000), o indivíduo deve posicionar-se descalço em uma superfície plana que está em ângulo reto com a fita métrica. O peso igualmente distribuído em ambos os pés, e os braços soltos dos lados do corpo com as mãos voltadas para as coxas. Os calcanhares devem estar próximos, os pés formando um ângulo de aproximadamente 60° e, a cabeça ereta com os olhos fixos à frente.

A partir do peso e da altura, foi obtido o Índice de Massa Corporal (IMC), calculado pela equação: peso (kg) dividido pela altura (m) ao quadrado ( $P/A^2$ ) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

#### 5.6.6.3 Procedimentos para aferição das variáveis bioquímicas

Foram obtidas amostras de sangue, colhidas (jejum mínimo de 8 horas) através da técnica padrão de punção venosa recomendada pelas Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (2010). Para as coletas de sangue foram utilizados tubos à vácuo com ou sem anticoagulante para a obtenção de plasma ou soro. Esses foram obtidos com a centrifugação das amostras à 2500 rpm por 15 minutos, após 1 a 2 horas das coletas. O plasma fluoretado foi empregado para a mensuração dos níveis de glicose, enquanto que o soro foi utilizado para a avaliação dos níveis de colesterol total, HDL colesterol, LDL colesterol, triglicérides, creatinina, albumina, cálcio, fósforo, fosfatase alcalina e 25(OH)D. Os níveis destes biomarcadores, com exceção da 25(OH)D foram determinados no analisador Cobas MIRA® (Roche Diagnostics, Basel, Suíça) através de métodos espectrofotométricos previamente padronizados. Essas dosagens ocorreram no LabClin, localizado no CCS na UFSM.

- Determinação da concentração plasmática do sTWEAK pelo método ELISA

A determinação da concentração plasmática do sTWEAK (código SK00577-06, Aviscera Inc, EUA) pelo método ELISA foi realizada no Laboratório de Virologia da UFSM, se-

gundo as instruções do fabricante. Para a leitura das abcissas dos testes foi utilizado o equipamento Multiskan FC Absorbance Plate Reader (THERMO-LABSYSTEMS, EUA). A sensibilidade do kit é de 10 pg/ml, a variação intra-ensaio 6-8% e a inter-ensaio 10-12%.

- Determinação do diagnóstico de *Diabetes Mellitus*

Com base nas Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2014), atualmente são três os critérios aceitos para o diagnóstico de DM com utilização da glicemia:

- Sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal acrescidos de glicemia casual  $\geq 200$  mg/dl. Compreende-se por glicemia casual aquela realizada a qualquer hora do dia, independentemente do horário das refeições.

- Glicemia de jejum  $\geq 126$  mg/dl (7 mmol/l). Em caso de pequenas elevações da glicemia, o diagnóstico deve ser confirmado pela repetição do teste em outro dia.

- Glicemia de 2 horas pós-sobrecarga de 75 g de glicose  $\geq 200$  mg/dl.

Além da glicemia de jejum, as recomendações atuais para o uso da hemoglobina glicada como critério diagnóstico para DM são as seguintes:

- HbA1c  $\geq 6,5\%$  a ser confirmada em outra coleta. Dispensável em caso de sintomas ou glicemia  $\geq 200$  mg/dl.

Com base nas recomendações presentes nas Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2014) e com base nas limitações do estudo, optou-se como critérios definidores para DM nas participantes deste estudo:

1. DM auto reportado e/ou
2. alterações laboratoriais, sendo elas:
  - glicemia de casual  $\geq 200$ mg/dl e/ou
  - glicemia de jejum  $\geq 126$ mg/dl e HbA1c  $\geq 6,5\%$ .

## 5.7 Cálculo da Amostra

O n do estudo foi calculado para uma variável contínua, com controles independentes dos sujeitos. Fazendo-se a média da diferença entre os níveis de sTWEAK entre casos e controles de 2 estudos prévios, o de Diaz-López *et al* (2013) e de Dharmapatni *et al* (2011), esperou-se uma diferença de 100pg/ml entre os grupos, com desvio padrão de 180 pg/ml, com poder estatístico de 80%, totalizando um n de 52 pessoas para cada grupo. Para o cálculo da amostra foi utilizado o software *Power and Sample*.

## **5.8 Análise estatística**

As variáveis com distribuição assimétrica foram submetidas à transformação para o seu logaritmo natural e então comparadas. Para a análise estatística entre dois grupos foi feita a utilização dos testes T de Student ou então Mann-Whitney. Para mais de dois grupos foram empregados a análise de variância simples (Oneway ANOVA) ou então o teste de Chi Quadrado. O nível de significância foi de 5%. Utilizou-se o pacote estatístico SPSS/PC para Windows.

## 6 RESULTADOS

Ao todo foram avaliadas 162 pacientes, subdivididas de acordo com a presença ou não de DM ou o relato prévio de fraturas maiores por fragilidade.

### 6.1 Resultados sTWEAK e DM

Nesta subanálise, foram incluídos 69 indivíduos com DM contra 93 sem este diagnóstico. A idade média (média + DP) do grupo sem DM, estabelecido pela história e/ou exames laboratoriais, foi de 68,7 + 7,3 anos, similar ao grupo com DM que correspondeu a 67,4 + 7,1 anos. Como esperado, houve um maior valor para glicemia de jejum e IMC entre as mulheres com DM (Tabela 6.1). Neste grupo o IMC foi 32,8 + 6,5 kg/m<sup>2</sup> em comparação com os controles onde o IMC foi de 28,5 + 5,2 kg/m<sup>2</sup>, com P <0,001. Todas as demais variáveis bioquímicas, incluindo perfil lipídico, cálcio, fósforo, albumina e creatinina, assim como a história familiar de fraturas e uso de álcool ou tabagismo, não mostraram diferença estatisticamente significativa (Tabela 6.1).

Tabela 6.1 – Características da população de acordo com a presença ou ausência de DM

Características	Com DM n=69	Sem DM n=93	p
Idade (anos)	67,4 (7,1)	68,7 (7,3)	0,231
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	32,8 (6,5)	28,5 (5,2)	<0,0001
História familiar de fraturas	10/69	12/93	0,481
Tabagismo	7/69	10/93	1,0
Abuso de álcool	Zero	Zero	NA
Comorbidades	63/66	56/88	<0,0001
<b>Bioquímica</b>			
Glicemia de jejum (mg/dl)	136,9 (34,2)	97,8 (13,1)	<0,0001
Colesterol total (mg/dl)	218 (55)	217 (50)	0,970
Triglicérides (mg/dl)	161 (76)	163 (80)	0,860
HDL (mg/dl)	57 (18)	54 (16)	0,210
LDL (calculado eq. Friedrich)	127 (46)	128 (47)	0,824
Creatinina (mg/dl)	0,7 (0,2)	0,7 (0,2)	0,760
Albumina (mg/dl)	4,6 (0,7)	4,4 (0,9)	0,118
Cálcio (mg/dl)	8,4 (1,4)	7,9 (1,2)	0,019
Fósforo (mg/dl)	3,5 (0,8)	3,4 (1,0)	0,270

Os níveis de sTWEAK, transformados para o seu logaritmo natural, por apresentarem distribuição assimétrica, foram significativamente reduzidos nas pacientes com DM (p=0,02) (Figura 6.1).



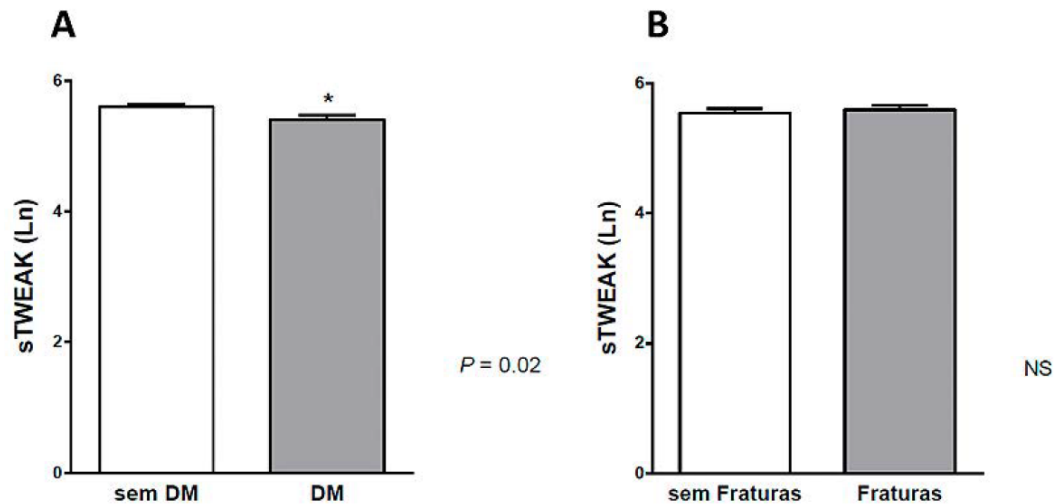


Figura 6.1 – Valores de sTWEAK em relação à presença e ausência de Diabetes Mellitus (A) e relato de fraturas maiores (B). Valores expressos em média e erro padrão.

## 6.2 Resultados sTWEAK e história de fraturas maiores e estratificação adicional pelo diagnóstico de DM

De uma maneira geral, indivíduos com história de fraturas maiores (n=52) apresentaram maior idade que aqueles sem história de fraturas (n=110), sendo, respectivamente (média + DP), 71,9 + 7,2 anos versus 66,4 + 6,5 anos,  $p < 0,0001$ . Tanto albumina quanto cálcio sérico total foram menores no grupo com fraturas. A albumina foi (média + DP) 4,1 + 0,8 (mg/dl) e o cálcio total 7,6 + 1 (mg/dl) no grupo com fraturas contra 4,6 + 0,7 (mg/dl) para albumina e 8,3 + 0,2 (mg/dl) para o cálcio nas mulheres sem fraturas ( $p < 0,0001$ ). Os valores de glicemia de jejum foram menores no grupo de fraturas (média + DP) 108 + 23,5 (mg/dl) em comparação com 117 + 33,8 (mg/dl),  $p < 0,03$ . Os demais parâmetros (IMC, história familiar de fraturas, tabagismo, abuso de álcool, e medições séricas de creatinina, fósforo e colesterol total, HDL, LDL e triglicéridios) foram semelhantes entre os dois grupos.

Estratificando os indivíduos com e sem fratura e com e sem DM obteve-se os resultados expostos na Tabela 6.2. Nesta, permaneceu a influência da idade avançada na ocorrência de fraturas (grupo sem DM e com fraturas e grupo com DM e com fraturas tiveram as mais elevadas idades) ( $p < 0,0001$ ). Em relação ao IMC, verificou-se a maior elevação nos indivíduos com DM e sem fraturas em relação aos demais grupos ( $p < 0,0001$ ). Comparando os indivíduos com DM com fraturas, os valores de cálcio foram significativamente menores em relação aqueles com DM e sem fraturas, respectivamente (média + DP) 7,3 + 0,9 (mg/dl) versus 8,5 + 1,4 (mg/dl)  $p < 0,0001$ .

A análise do Ln sTWEAK mostrou uma diferença somente entre as mulheres com diabetes e sem fraturas em comparação com aquelas sem diabetes e sem fraturas (Tabela 6.2). Desta forma, confirmou-se o achado anterior destacado na Figura 6.1.

Tabela 6.2 – Características de acordo com a presença ou não de DM e fraturas

Características	Com DM e sem fraturas n=57	Com DM e com fraturas n=11	Sem DM e sem fraturas n=53	Sem DM e com fraturas n=41	<i>p</i>
Idade (anos)	66,4 (6,7)	73,0 (8,3)*	66,5 (6,3)	71,4 (7,0)#	<0,0001
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	33,3 (6,4)	31,0 (6,2)*	27,8 (4,6)	29,0 (5,8)	<0,0001
História familiar de fraturas	9/57	1/11	3/53	9/41	0,439
Tabagismo	5/57	1/11	7/53	4/41	0,951
Abuso de álcool	Zero	Zero	Zero	Zero	NA
Comorbidades§	53/55	9/10	29/51	28/38	<0,0001
Bioquímica					
Glicemia de jejum (mg/dl)	136,4 (35,2) $\gamma$	135,0 (33,0)	96,4 (14,0)	101,7 (14,8)	<0,0001
Colesterol Total (mg/dl)	215 (52)	232 (69)	217 (52)	217 (49)	0,805
Triglicerídeos (mg/dl)	164 (80)	157 (45)	157 (88)	167 (61)	0,130
HDL (mg/dl)	57 (18)	57 (17)	54 (12)	55 (15)	0,517
LDL (calculado eq. Friedrich)	124 (42)	144 (63)	131 (47)	124 (47)	0,574
Creatinina (mg/dl) $\delta$	0,8 (0,2)	0,6 (0,1)	0,7 (0,2)	0,8 (0,2)	0,042
Albumina (mg/dl)	4,6 (0,7)	4,6 (0,8)	4,6 (0,7)	3,9 (0,8)#	<0,0001
Cálcio (mg/dl)	8,5 (1,4)	7,3 (0,9)*	8,0 (1,3)	7,7 (1,1)#	0,002
Fósforo (mg/dl)	3,6 (0,8)	3,3 (0,9)	3,3 (0,7)	3,4 (1,2)	0,554
sTWEAK	262,6 (160,0)	359,2 (297,5)	325,0 (120)	290,4 (134)	0,105
LNstWEAK	5,4 (0,6) $\phi$	5,7 (0,5)	5,7 (0,4)	5,6 (0,4)	0,010

Teste ANOVA:

\*Com DM e Com Fraturas *versus* Com DM Sem Fraturas;

# Sem DM e Com Fraturas *versus* Sem DM Sem Fraturas;

$\gamma$  Com DM e Sem Fraturas *versus* Sem DM Com Fraturas;

$\phi$  Com DM e Sem Fraturas *versus* Sem DM Sem Fraturas;

§ Teste Qui-quadrado;

$\delta$  Teste de Bonferroni não foi capaz de indicar que grupos diferiram na análise complementar.

## 7 DISCUSSÃO

A osteoporose e o diabetes mellitus são causas reconhecidas de morbimortalidade e altos custos financeiros para a sociedade. Embora constituam duas patologias distintas, ambas se assemelham pela existência de um aumento do estado inflamatório, caracterizado pela alteração de marcadores tais como a IL-6 e o TNF $\alpha$ .

Até o presente momento, inexistiam estudos que avaliassem a relação entre TWEAK e/ou sTWEAK, ou ainda a expressão de seus receptores Fn14 e CD163, e osteoporose. Este estudo buscou, de forma inédita, a associação dessa patologia com os níveis plasmáticos de sTWEAK, sugerindo que este marcador poderia estar elevado em mulheres com história de fraturas ósseas maiores prévias. Concluiu que não há conexão entre essa citocina e a presença ou não de fraturas ósseas maiores auto-reportadas. O possível papel do sTWEAK (não observado) ocorreria por via da ativação de proteínas relacionadas à transcrição (NF-kB) que são alvo do sTWEAK e que poderiam atuar junto ao RANKL aumentando a atividade dos osteoclastos e levando à fragilidade óssea. Além disso, o sTWEAK também teria a capacidade de aumentar a expressão de várias moléculas envolvidas na resposta inflamatória, tal como atuando na secreção de IL-8 e IL-6 (HOSOKAWA *et al.*, 2006). Seria extremamente interessante avaliar concomitantemente os níveis de IL-6 e TNF para poder demonstrar as diferenças entre estes marcadores inflamatórios e o sTWEAK.

É possível comparar esta pesquisa a outras pesquisas que também buscaram avaliar o papel de citocinas pró inflamatórias em fraturas ósseas e na osteoporose. Dentre essas citocinas, novamente, a IL-6 e TNF $\alpha$  são as que exercem maior papel no remodelamento ósseo, atuando na superfície de células mesenquimais e nos precursores de osteoclastos, assim aumentando a reabsorção óssea mediada por essas células. Essas citocinas se unem às células estromais e aumentam a ativação do RANKL, M-CSF e diminuem a produção da osteoprotegerina resultando num aumento da ativação dos osteoclastos (BARBOUR *et al.*, 2012).

Cauley *et al.* (2007) observou que a elevação dos marcadores inflamatórios (IL-6, TNF, PCR) é fator associado a fraturas osteoporóticas, após ter avaliado uma população de 2985 homens e mulheres entre 70 e 79 anos, sendo 1537 mulheres. Esse mesmo autor ressaltou, que ainda não era possível afirmar se a resposta inflamatória era fator de risco para fraturas ou um indicador de um processo subclínico que predisponha às fraturas. Por outro lado, Sponholtz *et al.* (2013), ao analisar uma população de 1292 homens, 231 mulheres na pré menopausa e 1391

mulheres na pós menopausa, sendo 893 delas sem o uso de terapia de reposição hormonal, observou que marcadores inflamatórios não estiveram associados com diminuição da DMO nesse último grupo, e nos homens. Assim, sugeriu que concentrações séricas de marcadores inflamatórios podem não estar associadas à baixa DMO em mulheres na pós menopausa. Isso vem ao encontro dos resultados que mostraram que o sTWEAK não tem relação com osteoporose, a partir da avaliação do histórico de fraturas ósseas maiores.

Dois autores, Barbour e Cauley (2013), em uma revisão bibliográfica, concluíram que há evidências de que a inflamação está relacionada com o risco aumentado de fraturas, sendo essa associação mais forte quando vários marcadores atuam conjuntamente, sugerindo que este seja um importante fator de risco biológico para fraturas em mulheres idosas. Além disso, ressalta que mais pesquisas nessa área são necessárias tanto avaliando homens quanto mulheres idosas.

Observa-se que esta pesquisa se diferencia dos estudos prévios analisados por Barbour e Cauley (2013), já que não foram observadas alterações nos níveis do sTWEAK nas fraturas ósseas. A partir disso, questiona-se o real mecanismo de atuação do sTWEAK sobre o metabolismo ósseo no caso de outras doenças que cursam com acometimento do osso, como na artrite reumatóide. Conclui-se que estudos esclarecendo esses possíveis mecanismos de ação do sTWEAK ainda são necessários.

Por fim, ao ser levantada a hipótese do sTWEAK ter relação com as fraturas por fragilidade, aceitou-se a hipótese nula, ao concluir que não existem diferenças nas concentrações plasmáticas de sTWEAK entre mulheres na pós-menopausa com e sem história de fraturas.

Dados recentes de literatura têm apontado um possível papel do sTWEAK em outros distúrbios endócrinos tais como DM e síndrome metabólica (DÍAZ-LÓPEZ *et al.*, 2014; VENDRELL; CHACÓN, 2013). Outros estudos têm mostrado a ação de citocinas pró-inflamatórias no desenvolvimento do DM, como a IL6 e TNF $\alpha$ . Essas citocinas, provavelmente, apresentam-se aumentadas no DM pelo fato de a maioria da população com essa doença apresentar maior IMC. Elas são produzidas pelos adipócitos e, conseqüentemente, têm maior produção quanto maior a quantidade de tecido adiposo (DAY; BAILEY, 2011). Esta pesquisa se diferencia desses, ao apresentar o marcador inflamatório sTWEAK como possível fator de risco para DM quando em níveis plasmáticos menores.

Por outro lado, os resultados expostos nesta pesquisa são consistentes com achados recentes na literatura e confirmam que os níveis de sTWEAK estão inversamente associados ao DM, independentemente de outras patologias, sendo um potencial biomarcador de importância

na patogênese do DM e para determinar o risco para esta doença (DÍAZ-LOPES *et al.*, 2013; KRALISCH *et al.*, 2008; LLAURADÓ *et al.*, 2012). Não está estabelecido qual o mecanismo que atua nessa associação, sendo necessários mais estudos que busquem essa resposta. Além disso, levando em consideração que a obesidade é um dos principais mecanismos que atua no aumento dos níveis de marcadores inflamatórios no DM, sugere-se que o sTWEAK não é aumentado pelo aumento do IMC.

Da mesma forma, o sTWEAK tem sido descrito como importante citocina envolvida no mecanismo da síndrome metabólica, também quando em níveis mais baixos (DÍAZ-LOPEZ *et al.*, 2014), dado este que poderá ser confirmado por análise em um estudo posterior com esta mesma amostra de mulheres.

Em uma metanálise de De Laet *et al.* (2005), que teve o propósito de quantificar o efeito do IMC como fator de risco para fraturas ósseas, analisando dados de uma população de cerca de 60000 pessoas, entre homens e mulheres, de 12 estudos de coorte, concluiu que o baixo IMC é fator de risco para fraturas, independentemente da idade e sexo, mas dependente da DMO. Contrariando esses achados, a presente pesquisa não mostrou diferenças entre o IMC nos grupos com fraturas e sem fraturas. O estudo de Copês *et al.* (2014) que trabalhou com a população de 1057 pacientes da qual partiu a amostra deste trabalho, avaliou o IMC de 987 delas e mostrou que a prevalência de fraturas entre mulheres obesas e não obesas na pós menopausa foi similar, suportando a hipótese de que obesidade não é fator de risco para fraturas ósseas. Além disso, os presentes resultados mostraram que os níveis de albumina e de cálcio foram significativamente diminuídos nas mulheres com fraturas, o que confirma o importante papel da hipocalcemia e da desnutrição energético-protéica como fatores de risco para esses eventos.

O DM não foi avaliado como fator de risco para fraturas ósseas. A literatura tem apresentado o DM como fator de risco independente da DMO, podendo isso ser justificado pelas comorbidades associadas ao DM que aumentam o risco de fraturas (DE LIEFDE *et al.*, 2005; IVERS *et al.*, 2001; JANGHORBANI *et al.*, 2007), ou a outros fatores como hiperglicemia e alterações no metabolismo da vitamina D, além da ação da citocinas como IL6 e TNF (PRE-MAOR; COMPSTON, 2013). Ainda outros estudos se fazem necessários para melhor esclarecer essa associação.

Este estudo apresenta algumas limitações que necessitam ser apontadas. Os estudos transversais impossibilitam estabelecer relações causais por não provarem a existência de uma sequência temporal entre exposição ao fator e o subsequente desenvolvimento da doença. O

fato de no delineamento transversal só se poder medir a prevalência, e não a incidência, torna limitada a informação produzida por este tipo de estudo no que diz respeito à história natural das doenças e ao seu prognóstico. Caso os resultados dessa pesquisa se mostrassem alterados, ao relacionar fraturas ósseas maiores com os níveis plasmáticos de sTWEAK, questionar-se-ia se os níveis seriam causa ou consequência das fraturas, e se o tempo decorrido da fratura exerceria alguma influência sobre eles. Essas observações são importantes para que, futuramente, estudos prospectivos sejam desenvolvidos para avaliar esse mesmo fator de risco (sTWEAK) e os desfechos (fraturas ósseas maiores ou DM).

A população estudada foi retirada de uma amostra de 1057 mulheres, sendo representativa de pacientes atendidas nas UBS do município de Santa Maria. Foi uma amostra desenhada para avaliação de fraturas e foi publicada recentemente por Copês *et al.* (2014). É composta unicamente por pessoas idosas e do sexo feminino, muitas com comorbidades associadas, o que limita esse estudo ao ser extrapolado para populações mais jovens, do sexo masculino ou de pessoas saudáveis.

Por fim, para a definição do diagnóstico de fraturas ósseas maiores auto reportadas, foi empregado uma ferramenta validada, o questionário do estudo GLOW (2009). Esse tipo de avaliação (auto reportada) tem algumas limitações, podendo constituir um viés de informação, tendo em vista que os pacientes podem subestimar ou superestimar a verdadeira ocorrência de fraturas. Por outro lado, informações auto reportadas sobre fraturas maiores são mostradas na literatura como informações acuradas e com boa correlação com achados radiológicos, como no caso das fraturas de punho. No estudo de Honkanen *et al.* (1999), a sensibilidade para definição de fraturas auto-reportadas foi de 78% , para todos os tipo de fraturas, e de 95% para fraturas de punho, enquanto as especificidades foram de 96% e 99%, respectivamente. O estudo de Chen *et al.* (2004), avaliou dados obtidos de uma população na pós menopausa e confirmou que a validade de informações auto reportadas sobre fraturas de quadril, punho e antebraço foi alta, apoiando, assim, o uso dessas informações em estudos epidemiológicos envolvendo mulheres na pós menopausa.

## 8 CONCLUSÃO

Apesar de não ter sido demonstrada relação entre os níveis plasmáticos de sTWEAK e a história de fraturas ósseas, o presente trabalho confirmou os resultados de outros estudos transversais e de casos-controles que também haviam observado diminuição dos níveis de sTWEAK em pacientes com DM. Em nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo a explorar o papel dos níveis de sTWEAK (marcador crônico de inflamação que atua pela via NF- $\kappa$ B) e o diagnóstico presumptivo de osteoporose. Outras pesquisas se fazem necessárias para confirmar esses achados, inclusive por diferentes métodos diagnósticos (ex. densitometria óssea), ou em outras populações, visando elucidar os possíveis mecanismos inflamatórios que atuam no DM e na osteoporose.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHEMLAL L., et al. Bone metabolism in male patients with type 2 diabetes. *Clinical Rheumatology*, v. 24, n. 5, p. 493–6, 2005.

ANDO, T. et al. TWEAK/Fn14 interaction regulates RANTES production, BMP-2-induced differentiation, and RANKL expression in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Arthritis research and therapy*, v. 8, n. 5, p. R146, 2006.

ATES, I. et al. The relationship between asymptomatic organ damage, and serum soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) and Interleukin-17A (IL-17A) levels in non-diabetic hypertensive patients. *BMC nephrology*, v. 15, n. 1, p. 159, 2014.

BARBOUR, K. E. et al. Inflammatory markers and the risk of hip fracture: The women's health initiative. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 27, n. 5, p. 1167–1176, Maio 2012.

BARBOUR, K. E.; CAULEY, J. A. Measuring inflammatory marker levels to determine risk of bone loss and fractures in older women. *Medical Laboratory Observer*, v. 45, n. 4, p. 8, abril 2013.

BROWN, J. P. et al. Bone turnover markers in the management of postmenopausal osteoporosis. *Clinical Biochemistry*, v. 42, n. 10-11, p. 929–942, jul. 2009.

CAULEY, J. A. et al. Inflammatory Markers and Incident Fracture Risk in Older Men and Women: The Health Aging and Body Composition Study. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 22, n. 7, p. 1088–1095, 9 abr. 2007.

CHEN, Z. et al. Validity of self-report for fractures among a multiethnic cohort of postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative observational study and clinical trials. *Menopause*, v. 11, n.3, p. 264-274, 2004.

CHICHEPORTICHE, Y. et al. TWEAK, a New Secreted Ligand in the Tumor Necrosis Factor Family That Weakly Induces Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 51, p. 32401–32410, 19 dez. 1997.

COPÊS, R. M. et al. Obesity and Fractures in Postmenopausal Women: A Primary-care Cross-Sectional Study at Santa Maria, Brazil. *Journal of Clinical Densitometry*, dez. 2014.

COSTA-PAIVA, L. et al. Prevalência de osteoporose em mulheres na pós-menopausa e associação com fatores clínicos e reprodutivos. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 25, n. 7, p. 507–12, 2003.

DAY, C.; BAILEY, C. J. Obesity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *The British Journal of Diabetes & Vascular Disease*, v. 11, n. 2, p. 55–61, 1 mar. 2011.



DE LAET, C. et al. Body mass index as a predictor of fracture risk: A meta-analysis. *Osteoporosis International*, v. 16, n. 11, p. 1330–1338, nov. 2005.

DE LIEFDE, I. I. et al. Bone mineral density and fracture risk in type-2 diabetes mellitus: the Rotterdam Study. *Osteoporosis International*, v. 16, n. 12, p. 1713–1720, dez. 2005.

DENNISON, E. M. et al. Effect of co-morbidities on fracture risk: Findings from the Global Longitudinal Study of Osteoporosis in Women (GLOW). *Bone*, v. 50, n. 6, p. 1288–1293, jun. 2012.

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2013-2014/Sociedade Brasileira de Diabetes ; [organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio]. – São Paulo: AC Farmacêutica, 2014.

DHARMAPATNI, A. A. et al. TWEAK and Fn14 expression in the pathogenesis of joint inflammation and bone erosion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, v. 13, n. 2, p. R51, 2011.

DÍAZ-LÓPEZ, A. et al. Serum sTWEAK Concentrations and Risk of Developing Type 2 Diabetes in a High Cardiovascular Risk Population: A Nested Case-Control Study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 98, n. 8, p. 3482-3490, ago. 2013.

DÍAZ-LÓPEZ, A. et al. Reduced circulating sTWEAK levels are associated with metabolic syndrome in elderly individuals at high cardiovascular risk. *Cardiovascular Diabetology*, v. 13, n. 1, p. 51, 2014.

DOBNIG H., et al. Type 2 diabetes mellitus in nursing home patients: effects on bone turnover, bone mass, and fracture risk. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 91, n. 9, p. 3355–63, 2006.

DREZNER, M. K.; ROSEN, H. N. Clinical manifestations, diagnosis, and evaluation of osteoporosis in postmenopausal women. *Pesquisa Médica*. Disponível em: < [http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-diagnosis-and-evaluation-of-osteoporosis-in-postmenopausal-women?source=see\\_link#H6](http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestations-diagnosis-and-evaluation-of-osteoporosis-in-postmenopausal-women?source=see_link#H6)>. Acesso em: 1 maio, 2014.

GERDHEM, P. et al. Increased bone density and decreased bone turnover, but no evident alteration of fracture susceptibility in elderly women with diabetes mellitus. *Osteoporosis International*, v. 16, n. 12, p. 1506–1512, dez. 2005.

Global Longitudinal Study of Osteoporosis in Women (GLOW). Available at: <http://www.outcomes-umassmed.org/GLOW/>. Acesso em: 8 agosto, 2014.

HEYWARD, V. H.; STOLARCZYK, L. M. Método Antropométrico. *Avaliação da composição corporal aplicada*. 1.ed. São Paulo: Manole, 2000. Cap.5. p.73-98.

HOOVEN FH, ADACHI JD, ADAMI S, et al. The Global Longitudinal Study of Osteoporosis in Women (GLOW): rationale and study design. *Osteoporosis International*, v. 20, n. 7, p. 1107-1116, 2009.

HONKANEN, K. et al. Validity of self-reports of fractures in perimenopausal women. *American Journal of Epidemiology*, v. 150, n. 5, p.511-516, 1999.

HOSOKAWA, Y. et al. Proinflammatory effects of tumour necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) on human gingival fibroblasts. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 146, n. 3, p. 540-549, dez. 2006.

IVERS, R. Q. et al. Diabetes and Risk of Fracture The Blue Mountains Eye Study. *Diabetes Care*, v. 24, n. 7, p. 1198–1203, 2001.

INMETRO. 2013. Available at: <http://www.inmetro.gov.br>. Acessado em 8 de Janeiro, 2014.

JANGHORBANI, M. et al. Systematic Review of Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus and Risk of Fracture. *American Journal of Epidemiology*, v. 166, n. 5, p. 495–505, 21 jun. 2007.

JASIEWICZ, M. et al. Serum levels of CD163 and TWEAK in patients with pulmonary arterial hypertension. *Cytokine*, v. 66, n. 1, p. 40–45, mar. 2014.

KANIS, J. A. Assessment of Fracture Risk And its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis: Synopsis of a WHO Report. v. 4, p. 368–381, 1994.

KARADURMUS, N. et al. Lower plasma soluble TWEAK concentration in patients with newly diagnosed hypertension. *Clinical and Investigative Medicine*, v. 35, n. 1, p. E20-E26, fev. 2012.

KRALISCH, S. et al. Serum levels of the atherosclerosis biomarker sTWEAK are decreased in type 2 diabetes and end-stage renal disease. *Atherosclerosis*, v. 199, n. 2, p. 440–444, ago. 2008.

KOWAL-BIELECKA, O. et al. High serum sCD163/sTWEAK ratio is associated with lower risk of digital ulcers but more severe skin disease in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*, v. 15, n. 3, p. R69, 2013.

LACATIVA, P. G. S.; FARIAS, M. L. F. DE. Osteoporosis and inflammation. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 54, n. 2, p. 123-132, 2010.

LIPSCHITZ, D. A. Screening for nutritional of status in the elderly. *Prim Care*, v. 21, n. 2, p. 55-67, mar. 1994.

LIU, Y.-P. et al. Is there another possible approach to inhibit wear particles-induced inflammatory osteolysis? *Medical Hypotheses*, v. 76, n. 2, p. 280–282, fev. 2011.

LLAURADÓ, G. et al. Serum Levels of TWEAK and Scavenger Receptor CD163 in Type 1 Diabetes Mellitus: Relationship with Cardiovascular Risk Factors. A Case-Control Study. *PLoS ONE*, v. 7, n. 8, p. e43919, 24 ago. 2012.

MAGGIO A.B., et al. Decreased bone turnover in children and adolescents with well controlled type 1 diabetes. *Journal of Pediatrics Endocrinology and Metabolism*, v. 23, n. 7, p. 697–707, 2010.

NETO, A. M. P.; ET AL. Consenso brasileiro de osteoporose. *Rev Bras Reumatol*, v. 42, n. 6, p. 343, 2002.

NOVOYATLEVA, T. et al. Deletion of Fn14 receptor protects from right heart fibrosis and dysfunction. *Basic Research in Cardiology*, v. 108, n. 2, mar. 2013.

PEREIRA, R. M. R.; DOMICIANO, D. S.; SIMÕES, R. Osteoporose: Diagnóstico. Projeto Diretrizes. 2011.

PINHEIRO, M. DE M. et al. FRAX: building an idea to Brazil. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 53, n. 6, p. 783–790, 2009.

PINHEIRO, M. DE M.; EIS, S. R. Epidemiology of osteoporotic fractures in Brazil: what we have and what we need. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 54, n. 2, p. 164–170, 2010.

PINHEIRO, M. M. et al. O impacto da osteoporose no Brasil: dados regionais das fraturas em homens e mulheres adultos-The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 50, n. 2, p. 113–27, 2010.

POLEK, T. C. et al. TWEAK Mediates Signal Transduction and Differentiation of RAW264.7 Cells in the Absence of Fn14/TweakR: EVIDENCE FOR A SECOND TWEAK RECEPTOR. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 34, p. 32317–32323, 22 ago. 2003.

PREMAOR, M.O.; COMPSTON J.C. Obesity, Diabetes, and Fractures. In: Markus R Osteoporosis. 4<sup>a</sup> ed. Oxford: Elsevier, 2013.

Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso. 2010. Disponível em: <http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/320090814145042.pdf>. Acessado em 30 de Janeiro, 2014.

REYES-GARCIA R., et al. Serum levels of bone resorption markers are decreased in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetology*, v. 50, n. 1, p. 47–52, 2013.

SAMBROOK P.; COOPER C. Osteoporosis. *Lancet*. v. 367; p. 2010-18, 2006.

SCHWARTZ, A. V. et al. Older women with diabetes have an increased risk of fracture: a prospective study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 86, n. 1, p. 32–38, 2001.

SHU A., et al. Bone structure and turnover in type 2 diabetes mellitus. *Osteoporosis International*, v. 23, n. 2, p. 635–41, 2012.

SIQUEIRA, F. V.; FACCHINI, L. A.; HALLAL, P. C. The burden of fractures in Brazil: a population-based study. *Bone*, v. 37, n. 2, p. 261-266, 2005.

SPONHOLTZ, T. R. et al. Association between inflammatory biomarkers and bone mineral density in a community-based cohort of men and women: The Framingham Osteoporosis Study: Inflammatory Biomarkers and Bone Mineral Density. *Arthritis Care & Research*, p. 1-30, dez. 2013.

VASIKARAN, S. et al. Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporosis International*, v. 22, n. 2, p. 391-420, fev. 2011.

VENDRELL, J.; CHACÓN, M. R. TWEAK: A New Player in Obesity and Diabetes. *Frontiers in Immunology*, v. 4, 2013.

VINCENT, C. et al. Pro-Inflammatory Cytokines TNF-Related Weak Inducer of Apoptosis (TWEAK) and TNF $\alpha$  Induce the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)-Dependent Expression of Sclerostin in Human Osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 24, n. 8, p. 1434-1449, ago. 2009.

YAMAMOTO M., et al. Decreased PTH levels accompanied by low bone formation are associated with vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 97, n. 4, p. 1277-84, 2012.

WAKO, M. et al. Novel function of TWEAK in inducing intervertebral disc degeneration. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 25, n. 11, p. 1438-1446, nov. 2007.

WANG, C. et al. Expression of human tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical Rheumatology*, v. 31, n. 2, p. 335-339, fev. 2012.

WHO. Part 3: Training and Practical Guides. Section 3: Guide to Physical Measurements (Step 2). WHO. December 2008. Disponível em: [http://www.who.int/chp/steps/Part3\\_Section3.pdf](http://www.who.int/chp/steps/Part3_Section3.pdf). Acesso em: 26 de maio de 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: Preventing and managing the global epidemic – Report of a WHO consultation on obesity. Geneva, 1998.

# **ANEXOS**

---

## ANEXO A – Questionário para coleta de dados

IDENTIFICAÇÃO

NÚMERO DO CARTÃO DO SUS

NOME: \_\_\_\_\_

TELEFONE: \_\_\_\_\_

ENDEREÇO: \_\_\_\_\_

Medida da cintura abdominal (em centímetros):

Pressão arterial:

Peso:  Estatura:

## INSTRUÇÕES

A sua participação nesse estudo é voluntária. Se você encontrar uma questão que não quiser responder, por favor, pule para a próxima.

Responda as questões pintando o círculo do lado esquerdo das respostas.

Por favor, pinte totalmente o círculo. Correto  Incorreto

7) Depois de você completar 45 anos, você quebrou algum dos ossos abaixo?

Clavícula	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não
Ombro ou antebraço	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não
Punho ou pulso	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não
Coluna ou vértebras	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não
Costelas	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não
Quadril ou fêmur	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não
Pelve ou bacia	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não
Tornozelo	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não
Coxa	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não
Perna	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não

11) Para cada uma das medicações abaixo, por favor, marque se você está tomando agora, ou se já tomou no passado, ou se nunca tomou.

Nome do remédio	está tomando agora	já tomou no passado	nunca tomou
Actonel (risedronato)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Aredia (pamidronato)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Boniva (ibadronato)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Didronel (etidronato)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Evista (raloxifeno)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Forteo (teriparatida)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Fosamax (alendronato)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Livial (tibolona)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Miacalcin Miacalcic (calcitonina)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Protos Protelos Osseor ( ranelato de estrôncio)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Aclasta Zometa (ácido zoledrônico)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Cálcio	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Rocaltrol Calcijex (calcitriol)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Vitamina D	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Meticorten (Cortisona, Prednisona)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Depo Provera	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Estrógenos ou reposição hormonal	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Arimidex (anastrozole)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Aromasin (exemestane)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Femara (letrozole)	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Tamoxifeno	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

13) A sua mãe alguma vez quebrou ou fraturou o quadril ou o fêmur?

- Sim
- Não
- Não sei

14) O seu pai alguma vez quebrou ou fraturou o quadril ou o fêmur?

- Sim
- Não
- Não sei

27) Algum médico ou profissional de saúde alguma vez disse que você tem alguma das doenças abaixo?

Asma	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não
Bronquite crônica ou enfisema	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não
Osteoartrite, artrite, doença degenerativa das articulações ou das juntas	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não
Artrite reumatoide	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não
Derrame ou isquemia cerebral	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não
Doença inflamatória intestinal ou doença de Crohn	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não
Doença celíaca	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não
Mal de Parkinson	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não
Esclerose Múltipla	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não
Câncer	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não
Diabetes em uso de insulina	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não
Diabetes sem uso de insulina	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não
Angina ou infarto do coração	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não
Insuficiência cardíaca ou coração grande	<input type="radio"/>	Sim	<input type="radio"/>	Não

39) Você fuma?

- Sim, eu fumo todos os dias
- Sim, eu fumo alguns dias
- Não, eu não fumo



40) Em média, quantas doses de bebida alcoólica você bebe por semana? (Uma dose é uma latinha ou meia garrafa de cerveja, um copo de vinho, uma batidinha, um martelinho ou equivalente em vodka, scotch, tequila, etc.)

- Nenhum (zero)
- Menos de 7 por semana
- Entre 7 a 13 por semana
- Entre 14 a 20 por semana
- Mais de 21 por semana