

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**LYGIA NESTAL BARROSO**

**DENSIDADE MINERAL ÓSSEA E SUA ASSOCIAÇÃO COM O METABOLISMO  
DA GLICOSE EM ADULTOS JOVENS**

**RIO DE JANEIRO**

**2016**

**LYGIA NESTAL BARROSO**

**DENSIDADE MINERAL ÓSSEA E SUA ASSOCIAÇÃO O COM METABOLISMO  
DA GLICOSE EM ADULTOS JOVENS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, do Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

**Orientadora: Márcia Soares da Mota e Silva Lopes**

**Coorientador: Gilberto Kac**

RIO DE JANEIRO

2016

Barroso, Lygia Nestal

Densidade mineral óssea e sua associação com o metabolismo da glicose em adultos jovens./ Lygia Nestal Barroso– Rio de Janeiro, 2016.  
69f.

Orientadora: Márcia Soares da Mota e Silva Lopes

Coorientador: Gilberto Kac

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós graduação em Nutrição, 2016.

1. Densidade mineral óssea. 2. Metabolismo ósseo. 3. Resistência à insulina. 4. Metabolismo de glicose. 5. Osteocalcina. I. Lopes, Marcia Soares da Mota e Silva, orient. II. Kac, Gilberto, coorient. III. Título.

**DENSIDADE MINERAL ÓSSEA E SUA ASSOCIAÇÃO COM O METABOLISMO  
DA GLICOSE EM ADULTOS JOVENS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, do Instituto de Nutrição Josué de Castro, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Nutrição Humana.

Aprovada em 11/10/2016.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Professora Dr<sup>a</sup>. Márcia Soares da Mota e Silva Lopes  
Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Instituto de Nutrição Josué de Castro  
**Orientadora**

---

Professor Dr. Antônio Augusto Moura da Silva  
Universidade Federal do Maranhão  
Departamento de Saúde Pública  
**Examinador**

---

Professora Dr<sup>a</sup>. Eliane Lopes Rosado  
Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Instituto de Nutrição Josué de Castro  
**Examinadora**

---

Professora Dr<sup>a</sup>. Ana Beatriz Franco Sena  
Universidade Federal Fluminense  
Departamento de Nutrição Social  
**Examinadora**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado forças para persistir em meus objetivos e alcançar meus sonhos.

À minha orientadora Márcia por sua confiança e paciência, pelos ensinamentos desde a graduação e por sempre ter respeitado e apoiado minhas decisões na vida profissional e acadêmica.

Ao meu coorientador Gilberto pela confiança depositada, por todos os ensinamentos e por ter me acolhido desde o início do mestrado na pesquisa. Obrigada por ter me apresentado ao mundo da epidemiologia e bioestatística, os conhecimentos adquiridos sem dúvida somaram muito em minha formação.

Aos meus pais, meus maiores incentivadores, por todo carinho, compreensão e amor de sempre. Especialmente à minha mãe, minha melhor amiga, meu porto seguro, com quem eu sei que posso contar para tudo nesse mundo.

Ao meu amor Gabriel, meu melhor amigo, por todo o apoio e paciência, por sua compreensão sem fim, pelo amor e incentivo. Sua presença na minha vida faz essa caminhada mais tranquila.

À minha prima-irmã Gabriela, minha inspiração na área acadêmica, grande amiga e incentivadora.

À minha grande amiga e companheira de todas as horas de estudo, Teka. Minha menininha, que cumpriu sua missão aqui na Terra e sempre foi só amor e luz. Obrigada por todo seu amor e companheirismo de sempre.

À minha super companheira Dayana, apoio nos momentos de desespero, quem desde o início me auxiliou em todas as etapas e meu anjo da guarda na área de bioestatística. Sem palavras para agradecer toda a ajuda de sempre.

Às minhas amigas Beatriz, Livia, Yasmin, Thais, Tamiris, Thayanne, Carla e Nathalia Albuquerque que iniciaram a jornada no mundo da Nutrição comigo, amigas que pretendo levar pra sempre na minha vida e no meu coração. Especial agradecimento à Bia, minha parceira de sempre, obrigada por todo apoio e por sempre entender minhas preocupações e desespero.

Às minhas amigas Carol e Nathália, parceiras da residência para a vida, meus presentes do HUCFF.

Aos meus amigos queridos Mariana e Lucas pelo apoio e pela torcida de sempre.

Aos professores do Instituto de Nutrição Josué de Castro, por todos os ensinamentos compartilhados, por terem contribuído para minha formação e para que eu queira sempre ser uma profissional melhor.

À professora Eliane Lopes Rosado e ao professor Antônio Augusto Moura da Silva, obrigada por todos os ensinamentos, por serem professores admiráveis e por terem contribuído na qualificação e na defesa para a construção deste trabalho.

À Ana Beatriz Fraco Sena Siqueira, muito obrigada por ter aceitado revisar este trabalho e contribuído com seu conhecimento para o aprimoramento do mesmo.

Rio de Janeiro, 16 de agosto de 2016

Lygia Nestal Barroso

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Características da amostra, idade dos indivíduos, objetivo e tamanho amostral dos estudos revisados.....	26
<b>Quadro 2.</b> Variáveis de exposição, desfecho, testes estatísticos utilizados e principais resultados dos estudos revisados.....	28

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Hipertrofia de adipócitos, infiltração de macrófagos e inflamação do tecido adiposo.....	18
<b>Figura 2.</b> Hipótese da associação entre densidade mineral óssea e os marcadores do metabolismo de glicose estudados.....	31
<b>Figura 3.</b> Evolução da coorte de nascidos vivos em 1978/79 até a quarta fase do estudo.....	34
<b>Figura 4.</b> Fluxograma da população avaliada no presente estudo.....	35
<b>Figura 5.</b> Diagrama causal da associação entre densidade mineral óssea e resistência à insulina.....	38

## FIGURAS DO ARTIGO

<b>Figure 1.</b> <i>Scatter and linear prediction between BMD and Log HOMA1-IR according to WC in 468 young adults, 2002-2004 Ribeirão Preto, Brazil, fourth cohort.....</i>	56
<b>Figura 1.</b> Gráfico de dispersão e predição linear entre DMO e Log HOMA1-IR de acordo com PC em 468 adultos jovens, 2002-2004 Ribeirão Preto, Brasil, quarto <i>follow up</i> .....	56
<b>Figure 2.</b> <i>Scatter and linear prediction between BMD and Log HOMA2-S according to WC in 468 young adults, 2002-2004 Ribeirão Preto, Brazil, fourth cohort.....</i>	57
<b>Figura 2.</b> Gráfico de dispersão e predição linear entre DMO e Log HOMA2-S de acordo com PC em 468 adultos jovens, 2002-2004 Ribeirão Preto, Brasil, quarto <i>follow up</i> .....	57
<b>Figure 3.</b> <i>Scatter and linear prediction between BMD and Log HOMA2-<math>\beta</math> according to WC in 468 young adults, 2002-2004 Ribeirão Preto, Brazil, fourth cohort.....</i>	58
<b>Figura 3.</b> Gráfico de dispersão e predição linear entre DMO e Log HOMA2- $\beta$ de acordo com PC em 468 adultos jovens, 2002-2004 Ribeirão Preto, Brasil, quarto <i>follow up</i> .....	58



## LISTA DE TABELAS

<b>Table 1.</b> <i>Descriptive characteristics of a young adults sample, 2002-2004 Ribeirão Preto cohort, Brazil, fourth follow-up.....</i>	52
<b>Tabela 1.</b> <i>Características descritivas da amostra de adultos jovens, 2002-2004 coorte de Ribeirão Preto, Brasil, quarto follow-up.....</i>	52
<b>Table 2.</b> <i>Distribution of insulin resistance (HOMA1-IR), insulin sensitivity (HOMA2-S) and <math>\beta</math> cell function (HOMA2-<math>\beta</math>) in 468 young adults according to categories of selected variables, 2002-2004 Ribeirão Preto cohort, Brazil, fourth follow-up.....</i>	53
<b>Tabela 2.</b> <i>Distribuição da resistência à insulina (HOMA1-IR), sensibilidade à insulina (HOMA2-S) e função das células <math>\beta</math> (HOMA2-<math>\beta</math>) em 468 adultos jovens, de acordo com as categorias das variáveis selecionadas, 2002-2004 coorte de Ribeirão Preto, Brasil, quarto follow up.....</i>	53
<b>Table 3.</b> <i>Linear regression between bone mineral density (BMD; g/cm<sup>2</sup>) and insulin resistance (HOMA1-IR), insulin sensitivity (HOMA2-S) and <math>\beta</math> cell function (HOMA2-<math>\beta</math>) in 468 young adults, 2002-2004 Ribeirão Preto cohort, Brazil, fourth follow-up.....</i>	55
<b>Tabela 3.</b> <i>Regressão linear entre densidade mineral óssea (BMD; g/cm<sup>2</sup>) e resistência à insulina (HOMA1-IR), sensibilidade à insulina (HOMA2-S) e função das células <math>\beta</math> (HOMA2-<math>\beta</math>) em 468 adultos jovens, de acordo com as categorias das variáveis selecionadas, 2002-2004 coorte de Ribeirão Preto, Brasil, quarto follow up.....</i>	55

**LISTA DE ANEXOS**

<b>ANEXO 1</b> – Análise exploratória dos dados.....	66
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPK** - Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
- ANOVA** - Análise de variância
- BMD** - *Bone mineral density*
- BMI** - *Body mass index*
- CTX** - Telopectídeo C-terminal
- DAG** - Gráfico acíclico direto – *Directed acyclic graphic*
- DEXA** - Absorção de raios-X de dupla energia - *Dual-energy X-ray absorptiometry*
- DM** - *Diabetes mellitus*
- DMO** - Densidade mineral óssea
- FAL** - Fosfatase alcalina específica do osso
- FFQ** – *Food frequency questionnaire*
- GC** - Gordura corporal
- HbA1C** - Hemoglobina glicada
- HCFMRP** – Hospital das clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
- HOMA1-IR** - Modelo de avaliação da homeostase de resistência à insulina - *Homeostatic model assessment of insulin resistance*
- HOMA2-S** - Modelo de avaliação da homeostase da sensibilidade à insulina- *Homeostatic model assessment of insulin sensitivity*
- HOMA2-β** - Modelo de avaliação da homeostase da secreção de insulina - *Homeostatic model assessment of insulin secretion*
- IGI** - Índice insulinogênico
- IL 1** - Interleucina 1
- IL 6** - Interleucina 6
- IMC** - Índice de massa corporal
- IPAQ** - Questionário internacional de atividade física – *International physical activity questionnaire*
- IR** - *Insulin resistance*
- IRS** - Substratos do receptor de insulina
- ISI** - Índice de secreção de insulina;
- MG** - Massa de gordura
- MM** - Massa magra
- NTX** - Telopectídeo N-terminal
- OC** - Osteocalcin - *Osteocalcin*

**OCun** - Osteocalcina não carboxilada

**OPG** - Osteoprotegerina – *Osteoprotegerin*

**PINP** - Propeptídeo amino terminal do procolágeno tipo 1 - *Amino terminal propeptide of procollagen type 1*

**PC** - Perímetro da cintura

**PCR** - Proteína C reativa

**PPAR $\gamma$**  - Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma  $\gamma$

**PTH** - Paratormônio

**QFA** - Questionário de frequência alimentar

**QUICKI** - Índice de verificação quantitativa da sensibilidade à insulina - *Quantitative insulin sensitivity check index*

**RANK** - Receptor ativador do fator nuclear kappa B

**RANKL** - Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B

**RI** - Resistência à insulina

**SM** - Síndrome metabólica

**SUS** - Sistema único de saúde

**TAV** - Tecido adiposo visceral

**TNF $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral  $\alpha$

**WC** - *Waist circumference*

## SUMÁRIO

Apresentação.....	13
Resumo.....	14
Abstract.....	15
<b>1. Introdução.....</b>	<b>16</b>
1.1 Resistência à insulina.....	16
1.2 Densidade mineral óssea e osteocalcina.....	20
1.3 Eixo endócrino osso-pâncreas.....	23
<b>2. Justificativa.....</b>	<b>30</b>
<b>3. Hipótese.....</b>	<b>31</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>32</b>
4.1 Objetivo geral.....	32
4.2 Objetivos específicos.....	32
<b>5. Métodos.....</b>	<b>33</b>
5.1 Desenho.....	33
5.2 Captação dos participantes.....	33
5.3 Variáveis do estudo.....	35
5.4 Análises estatísticas.....	38
5.5 Questões éticas.....	39
<b>6. Resultados.....</b>	<b>40</b>
<b>7. Conclusão.....</b>	<b>59</b>
<b>8. Referências.....</b>	<b>60</b>
Anexo.....	66

## **Apresentação**

Este projeto faz parte de um estudo maior intitulado “Da saúde perinatal à saúde do adulto jovem: estudo da coorte nascida em 1978/79 em hospitais de Ribeirão Preto, SP”, desenvolvido pelo Departamento de Puericultura da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) com o apoio da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Este documento encontra-se estruturado da seguinte forma: apresentação, resumo, abstract, introdução, justificativa, hipótese, objetivos, métodos, resultados, conclusão, referências e anexos. A seção de resultados está apresentada na forma de artigo científico. A análise exploratória dos dados encontra-se em anexo.

O artigo consiste em um estudo epidemiológico, baseado na análise dos dados de 468 adultos jovens, incluídos na quarta fase do estudo prospectivo que acompanhou indivíduos nascidos no município de Ribeirão Preto em 1978/79. Foi avaliada a associação entre a densidade mineral óssea e os marcadores de resistência, sensibilidade e secreção de insulina utilizando a análise de regressão linear múltipla. A osteocalcina foi testada como fator de confusão e o perímetro da cintura como fator modificador na associação entre a densidade mineral óssea e o metabolismo de glicose. As covariáveis foram selecionadas por meio do gráfico acíclico direto (DAG). Esta versão do artigo foi submetida para a revista *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* e encontra-se em fase de revisão. As referências bibliográficas referentes ao artigo estão citadas ao final do mesmo, conforme padrão exigido pela revista e, adicionalmente, foram incluídas na seção de referencial da presente dissertação, no formato ABNT.

## Resumo

BARROSO, Lygia Nestal. Densidade mineral óssea e sua associação com metabolismo de glicose em adultos jovens. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) – Instituto de Nutrição Josué de Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2016.

O osso parece desempenhar um papel importante no metabolismo da glicose, no entanto, os resultados dos estudos neste contexto ainda são controversos. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a associação entre a densidade mineral óssea (DMO) e o metabolismo da glicose (resistência, sensibilidade e secreção de insulina) e investigar se a hiperadiposidade visceral, avaliada pelo perímetro da cintura (PC), é uma variável modificadora de efeito e se a osteocalcina (OC) é um fator de confusão desta associação. A presente pesquisa consiste em uma análise transversal baseada na quarta fase da coorte prospectiva de indivíduos nascidos em Ribeirão Preto em 1978/79. Foram incluídos 468 adultos jovens. A DMO (colo femoral, fêmur proximal, coluna lombar), e as concentrações de OC total, glicose e insulina de jejum foram avaliadas. A resistência à insulina (RI), a sensibilidade e a secreção de insulina foram estimadas, respectivamente, pelos índices HOMA1-IR, HOMA2-S e HOMA2- $\beta$ . Modelos de regressão linear múltiplos foram construídos para estimar a associação entre a DMO e os marcadores do metabolismo da glicose. O PC foi testado como fator modificador de efeito. As covariáveis incluídas para ajuste das análises foram selecionadas com base no gráfico acíclico direto (DAG). Foi observada interação significativa entre DMO e PC na associação com o metabolismo de glicose, no modelo ajustado ( $p < 0,1$ ). Indivíduos com PC aumentado apresentaram associação positiva entre DMO e  $\log$  HOMA1-IR, enquanto naqueles com PC normal a associação foi inversa ( $p = 0,036$ ). A DMO foi negativamente associada com  $\log$  HOMA2-S em indivíduos com PC aumentado e positivamente em pessoas com PC normal ( $p = 0,042$ ). Não foram observadas associações significativas entre a DMO e  $\log$  HOMA2- $\beta$  e entre OC e os marcadores do metabolismo da glicose. Conclui-se que a DMO associou-se com o metabolismo de glicose, independentemente da OC sérica, e que o PC foi um fator modificador desta associação.

Palavras-chave: Densidade mineral óssea, resistência à insulina, metabolismo de glicose, metabolismo ósseo, osteocalcina.

## **Abstract**

BARROSO, Lygia Nestal. Bone mineral density and its association with glucose metabolism in young adults. Thesis (Master's Degree in Human Nutrition) – Josué de Castro Institute of Nutrition, Postgraduate Nutrition Program, Rio de Janeiro Federal University, 2016.

Bone may play an important role in glucose metabolism but results remain controversial. The objective of the study is to evaluate the association between bone mineral density (BMD) and glucose metabolism (insulin resistance, sensitivity and secretion) and investigate if visceral hyperadiposity, evaluated by waist circumference (WC), is an effect modifier and if osteocalcin (OC) is a confounder of this association. This research consists of a cross-sectional analysis based on the fourth phase of a prospective birth cohort. Study included 468 young adults from general community from Ribeirão Preto, Brazil. BMD (femoral neck, proximal femur, lumbar spine), total OC, fasting plasma glucose and insulin concentrations were assessed. IR, insulin sensitivity and secretion were estimated by HOMA1-IR, HOMA2-S and HOMA2- $\beta$  indexes. Multiple linear regression models were constructed to estimate the association between BMD and glucose metabolism. WC was tested as an effect modifier. The covariates used in the adjustment were selected based on a Direct Acyclic Graph (DAG). A significant interaction between BMD and WC on glucose metabolism was observed in the adjusted model ( $p < 0.1$ ). Subjects with increased WC presented a positive association between BMD and log HOMA1-IR while an inverse association was found in those with normal WC ( $p = 0.036$ ). BMD was negatively associated with log HOMA-S in individuals with increased WC and positively in those with normal WC ( $p = 0.042$ ). No significant associations between BMD and log HOMA2- $\beta$  and OC and glucose metabolism markers were observed. In conclusion, BMD was associated with glucose metabolism, independently of OC, and WC modified this association.

**Keywords:** Bone mineral density, insulin resistance, glucose metabolism, bone metabolism, osteocalcin.



## 1. Introdução

A resistência à insulina (RI) está associada ao desenvolvimento do diabetes *mellitus* (DM) tipo 2 e é definida quando concentrações normais do hormônio produzem uma resposta biológica subnormal (SBD, 2015). A etiologia da RI resulta da interação entre fatores genéticos e ambientais, principalmente o excesso de peso (PETERSEN; SHULMAN, 2006; LEE; LEE, 2014).

Nas últimas décadas, alguns estudos identificaram possível papel do osso sobre o metabolismo de glicose em modelos experimentais (LEE *et al.*, 2007; FERRON; LACOMBE, 2014). Em humanos, no entanto, os estudos acerca do eixo endócrino osso pâncreas permanecem controversos (LU C *et al.*, 2012; LUCEY *et al.*, 2013).

Neste contexto, embora a osteocalcina (OC) seja o mais estudado, outros marcadores do metabolismo ósseo e a densidade mineral óssea (DMO) também tem sido avaliados (VELDHUIS-VLUG *et al.*, 2013; LUCEY *et al.*, 2013; PIRILA *et al.*, 2014). Um importante fator que altera o *turnover* do osso e, conseqüentemente, a DMO e, por isso, pode ser uma importante variável modificadora na associação entre o metabolismo ósseo e de glicose é a disfunção metabólica associada a hiperadiposidade visceral (PITTAS *et al.*, 2009; COHEN *et al.*, 2013).

### 1.1 Resistência à insulina

A insulina possui papel essencial na regulação do metabolismo de carboidratos. O aumento das concentrações plasmáticas de glicose estimula a sua secreção pelas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas e, para manter a homeostase, a insulina promove redução da produção hepática (gliconeogênese e glicogenólise) e aumento da captação periférica de glicose. Além disso, por ser um hormônio anabólico, também estimula a lipogênese, reduz a lipólise, aumenta a síntese e reduz a degradação proteica (CAVALHEIRA *et al.*, 2002).

A sinalização intracelular da insulina ocorre por meio da ligação deste hormônio ao seu receptor de membrana, que possui atividade tirosina quinase e se autofosforila, levando a sua ativação. Quando ativado, este receptor catalisa a fosforilação de outras proteínas intracelulares envolvidas na transdução do sinal da insulina (CAVALHEIRA *et al.*, 2002; LUCHS, 2006). Tais proteínas são chamadas de substratos do receptor de insulina (IRS) e a fosforilação de IRS1 resulta na ativação de importantes vias metabólicas, como a via fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase), responsável pela translocação de vesículas

contendo transportadores de glicose para a membrana plasmática, ativação da síntese de glicogênio, supressão da gliconeogênese e crescimento e diferenciação celular. Por outro lado, a fosforilação dos IRS1 em serina bloqueia a sinalização de insulina (CAVALHEIRA *et al.*, 2002; ZEYDA; STULNIG, 2009).

De acordo com a literatura, diversos fatores podem ser associados a RI, dentre os quais se destacam: obesidade, idade, sexo, cor da pele e fatores de estilo de vida (como prática de atividade física, tabagismo e etilismo) (MCKEOWN *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2006; WILLI *et al.*, 2007; KENNEDY *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2015).

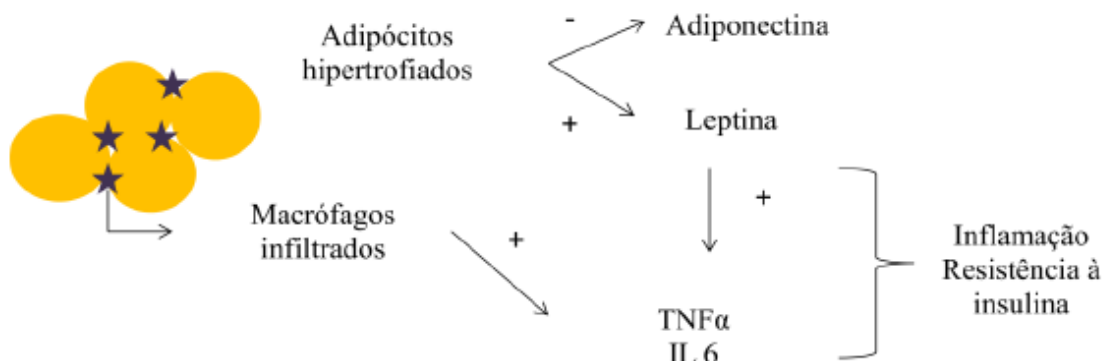
Entre os fatores de estilo de vida, a atividade física melhora a RI por levar ao aumento da captação muscular de glicose por diferentes mecanismos. Um deles envolve uma enzima chave de resposta à contração muscular, proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), que também estimula o transporte de glicose no músculo esquelético, promovendo a translocação de vesículas contendo transportador de glicose Glut-4, de forma independente da ação de insulina (PAULI *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2016).

Em relação ao álcool, KIM *et al.* (2015) identificaram que seu consumo leve a moderado está associado à redução do risco de DM e maior sensibilidade à insulina por meio do aumento da secreção de adiponectina, uma adipocina anti-inflamatória inversamente associada à RI, entretanto, o consumo crônico de etanol foi relacionado à disfunção das células  $\beta$ -pancreáticas. Quanto ao tabagismo, o aumento da inflamação sistêmica e do estresse oxidativo induzidos pela nicotina parecem estar associadas a RI. Além disso, o fumo parece aumentar o perímetro da cintura (PC) (OHKUMA *et al.*, 2015).

Acerca dos fatores não modificáveis, a cor da pele está associada com maior risco de desenvolvimento de DM tipo 2. Estudos demonstram que, em indivíduos negros, há maior predisposição genética e maior prevalência desta doença crônica (BRITO *et al.*, 2001; PICCOLO *et al.*, 2016). Um dos mecanismos que pode estar associado à maior prevalência de DM tipo 2 nesta população é o polimorfismo do gene da adiponectina, ADIPOQ (DAVIS *et al.*, 2015). O sexo é outro fator que se relaciona com a RI e alguns dos motivos elencados que podem justificar este fato são as diferenças na composição corporal e concentração de adiponectina entre homens e mulheres. Enquanto as mulheres apresentam maior adiposidade total, especialmente subcutânea, os homens apresentam maior quantidade de gordura visceral e hepática. Além da diferença quanto à deposição de gordura corporal, a maior concentração de adiponectina em mulheres está associada à menor RI neste grupo (GEER; SHEN, 2009; KAUTZKY-WILLER *et al.*, 2016).

A obesidade, fator etiológico mais importante, está relacionada a resposta inflamatória crônica, caracterizada por desequilíbrio na produção de adipocinas, como leptina e adiponectina, e ativação de vias pró inflamatórias, como proteína C reativa (PCR), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleucina 6 (IL6) e interleucina 1 (IL1) (BASTARD *et al.*, 2006; LEE; LEE, 2014).

Quando há persistente excesso de ingestão calórica e ganho de peso, os adipócitos hipertrofiam para aumentar a capacidade de armazenamento. A hipertrofia de adipócitos está associada à hipóxia, morte celular e atração de macrófagos que irão se infiltrar no tecido adiposo (MORIGNY *et al.*, 2016). Um mecanismo sugerido para esta infiltração de macrófagos é que os mesmos são originados a partir de precursores presentes na medula óssea e a leptina, adipocina produzida pelos adipócitos, é responsável por estimular a diapedese destas células do fluxo sanguíneo para o tecido adiposo (BASTARD *et al.*, 2006; JUNG; CHOI, 2014). A disfunção celular relacionada à hipertrofia dos adipócitos está associada à regulação negativa da expressão de adiponectina e positiva de leptina. Os macrófagos presentes no tecido adiposo irão estimular a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF $\alpha$  e IL6 (**Figura 1**) (BASTARD *et al.*, 2006; JUNG; CHOI, 2014; SEGOVIA *et al.*, 2014).



**Figura 1.** Hipertrofia de adipócitos, infiltração de macrófagos e inflamação do tecido adiposo. Adaptado de BASTARD *et al.*, 2006 e JUNG, CHOI, 2014.

A leptina está associada à regulação da ingestão alimentar, do gasto energético e está associada a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF $\alpha$  (CEDDIA *et al.*, 2002; JUNG; CHOI, 2014). Ao contrário da leptina, a adiponectina tem sido descrita como protetora para a inflamação crônica, pois esta adipocina e o TNF $\alpha$  se inibem mutuamente (EKMEKCI; EKMEKCI, 2006; PRADO *et al.*, 2009; JUNG; CHOI, 2014). Na obesidade, a redução da concentração plasmática de adiponectina e o aumento do TNF $\alpha$  estão associados à RI

(YAMAUCHI *et al.*, 2001; NEELAND *et al.*, 2012). TNF $\alpha$ , IL1 e IL6 alteram a expressão de genes e promovem fosforilação em serina do IRS, afetam o receptor de insulina e também os transportadores de membrana de glicose (ZEYDA; STULNIG, 2009; LEE; LEE, 2014).

É importante compreender que embora haja relação clínica entre a quantidade absoluta de gordura corporal e a RI, esta parece ser menos importante que a distribuição de gordura (PETERSEN; SHULMAN, 2006; JUNG; CHOI, 2014). A gordura corporal total encontra-se dividida em dois grandes depósitos: visceral e subcutâneo. A gordura visceral está associada aos órgãos internos da cavidade abdominal, enquanto a gordura subcutânea forma uma camada sob a pele (WRONSKA; KMIEC, 2012).

O tecido adiposo subcutâneo atua como local de armazenamento de gordura e está relacionado com uma forma de obesidade metabolicamente menos prejudicial. Este tecido é considerado mais lipogênico, pois seus pré adipócitos são mais responsivos ao receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR $\gamma$ ), que estimula a diferenciação de pré adipócitos em adipócitos maduros (WRONSKA; KMIEC, 2012; GAGGINI *et al.*, 2015). PPAR $\gamma$  tem importante papel na lipogênese e sensibilidade à insulina. As glitazonas, agentes farmacológicos utilizados no tratamento de DM tipo 2, são potentes ativadores do PPAR $\gamma$  e, com isso, melhoram a sensibilidade à insulina e estimulam a captação de glicose e ácidos graxos da circulação (HAMMARSTEDT *et al.*, 2005; GAGGINI *et al.*, 2015).

Em contrapartida, o tecido adiposo visceral é considerado mais lipolítico (WRONSKA; KMIEC, 2012; JUNG; CHOI, 2014). A lipólise leva a liberação de maior quantidade de ácidos graxos livres no sangue, resultando em lipotoxicidade, ou seja, danos à função de órgãos não-adiposos, como o pâncreas, contribuindo para redução da função das células  $\beta$ -pancreáticas (KAHN *et al.*, 2006; CSALA, 2016). Além disso, o tecido adiposo visceral está associado à menor expressão de adiponectina e maior de citocinas pró-inflamatórias, o que torna esse tecido mais relacionado à resistência à insulina e às complicações metabólicas da obesidade (NEELAND *et al.*, 2012; WRONSKA; KMIEC, 2012).

Na RI, inicialmente, o pâncreas consegue se adaptar e manter a homeostase aumentando a secreção de insulina. No entanto, quando a capacidade funcional e adaptativa do órgão é excedida, há deterioração da tolerância à glicose e risco de desenvolvimento de DM tipo 2 a longo prazo (KAHN *et al.*, 2006; LEE; LEE, 2014).

## 1.2 Densidade mineral óssea e osteocalcina

A densidade mineral óssea (DMO) resulta de processo dinâmico fisiologicamente controlado de remodelação óssea, que ocorre por toda a vida adulta e é responsável pela renovação do esqueleto e manutenção da sua integridade. A remodelação óssea, ou seja, o mecanismo de reabsorção e formação óssea, decorre da ação de osteoclastos e osteoblastos. Os osteoclastos são células volumosas, multinucleadas e móveis que têm origem comum com a linhagem de células sanguíneas. Os osteoblastos, por sua vez, são provenientes de células osteoprogenitoras e responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea (colágeno tipo I, proteoglicanos, osteocalcina (OC), osteopontina e sialoproteína óssea) e mineralização da mesma (SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016).

No processo de remodelação óssea, ocorre primeiramente o recrutamento das células osteoclásticas (reabsorção óssea), estimulado a partir da interação do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK), com seu ligante (RANKL). O RANKL é sintetizado por células da linhagem osteoblástica, sistema imunológico e algumas células cancerígenas. Este marcador se liga ao receptor de membrana dos osteoclastos RANK e estimula reabsorção óssea por meio da ativação de osteoclastos maduros e osteoclastogênese (AMADEI *et al.*, 2006; SILVA; BRANCO, 2011).

Durante a reabsorção óssea são liberados fatores de crescimento responsáveis pela diferenciação de pré-osteoblastos. Os osteoblastos formados produzem osteoprotegerina (OPG), uma proteína que, por meio de sua afinidade com RANKL, impede a ligação deste ao receptor RANK. Assim, a remodelação óssea é controlada pela expressão de RANKL e OPG, aumentando ou reduzindo a osteoclastogênese respectivamente. Logo, verifica-se que os processos de reabsorção e formação óssea são acoplados, de forma que o primeiro estimula a atividade reparadora do segundo. Entretanto, o ciclo de reabsorção é bem mais rápido que o de formação e, por isso, o balanço final em termos de massa óssea pode ser afetado (AMADEI *et al.*, 2006; SILVA; BRANCO, 2011).

A OC é uma proteína sintetizada por osteoblastos durante a formação óssea que, na forma carboxilada, é responsável pela ligação do mineral cálcio à molécula de hidroapatita do osso. Esta proteína contribui, portanto, para o aumento da DMO (HAUSCHKA *et al.*, 1989; BOOTH *et al.*, 2013).

Diversos fatores podem influenciar o metabolismo ósseo e, conseqüentemente, a DMO como: índice de massa corporal (IMC) e a composição corporal, tabagismo, etilismo, atividade física, ingestão dietética de cálcio, vitamina D, idade, sexo e cor da pele (LOUREIRO *et al.*, 2014; WONGDEE; CHAROENPHANDHU, 2015).

O tabagismo está associado com a redução da DMO e aumento do risco de fratura. Os mecanismos envolvidos incluem alteração da absorção intestinal de cálcio, do metabolismo hormonal calciotrópico (redução do calcitriol), sexual (redução do estradiol) e cortical adrenal (aumento de cortisol). Além disso, o cigarro parece ter efeito sobre o sistema RANK-RANKL-OPG (aumento da relação RANKL/OPG) do osso (YOON *et al.*, 2012). O etilismo crônico também é considerado fator de risco para a baixa DMO e desenvolvimento de osteoporose. Além da metabolização do etanol gerar espécies reativas de oxigênio que podem ter efeito biológico direto, o consumo prolongado leva a inflamação e aumenta a expressão de RANKL, estimulando a osteoclastogênese e reabsorção óssea (CHEN *et al.*, 2009; RONIS *et al.*, 2011).

A atividade física é um fator protetor relevante contra a perda de massa óssea devido às modificações na estrutura do osso causadas por carga mecânica que estimula resposta osteogênica (BIELEMANN *et al.*, 2013). Em relação ao sexo, sabe-se que os esteroides sexuais têm efeito anabólico no osso, provavelmente por meio do aumento de OPG e consequente redução da diferenciação de osteoclastos (AMADEI *et al.*, 2006; FRENKEL *et al.*, 2010). As diferenças na massa óssea entre homens e mulheres resultam de efeitos hormonais sexo-específicos e os homens apresentam maior DMO e menor risco de fraturas que mulheres (ORWOLL *et al.*, 2001; CALLEWAERT *et al.*, 2010; NORDSTRÖM *et al.*, 2011).

A massa óssea pode ainda sofrer influência da etnia. Embora apresentem menores concentrações séricas de vitamina D, indivíduos negros tendem a ter maior DMO e menor risco de fraturas que os brancos. Este achado sugere que é possível que os negros mantenham a homeostase de cálcio adequada mesmo com menor concentração de vitamina D circulante. Além disso, outros fatores genéticos podem estar envolvidos no metabolismo ósseo, justificando as diferenças encontradas (GUTIÉRREZ *et al.*, 2011).

O aumento do peso corporal (massa adiposa e/ou magra) influencia positivamente o esqueleto devido a maior carga mecânica, por isso, tradicionalmente, a obesidade é considerada osteoprotetora (FELSON *et al.*, 1993; ZAIDI *et al.*, 2012). Entretanto, este conceito vem sendo questionado à medida que estudos têm verificado aumento da prevalência de fraturas em indivíduos obesos (NIELSON *et al.*, 2011; ARMSTRONG *et al.*, 2012).

Sabe-se que o tecido adiposo está envolvido no metabolismo e secreção de adipocinas com atividade óssea como leptina, adiponectina e citocinas pró-inflamatórias (REID, 2002). O papel da leptina e da adiponectina sobre a massa óssea ainda não está claro. Uma metanálise publicada em 2011 demonstrou que enquanto a leptina teve efeito protetor sobre a massa

óssea e o risco de fratura, a adiponectina associou-se negativamente com a DMO (BIVER *et al.*, 2011). Entretanto, outros estudos divergem e descrevem que a adiponectina pode aumentar a massa óssea por suprimir a osteoclastogênese e aumentar a osteoblastogênese (OSHIMA *et al.*, 2005; KANAZAWA, 2012). Quanto à leptina, dois estudos de revisão descreveram que esta adipocina pode afetar o metabolismo ósseo tanto por via central quanto por via periférica. De forma central, foi descrito que esta adipocina se liga aos seus receptores hipotalâmicos e induz duas cascatas de sinalização: a primeira leva ao aumento da expressão de RANKL, que estimula a reabsorção óssea, e a segunda, ao aumento da atividade simpática que sinaliza para osteoblastos, por meio de receptores  $\beta_2$  adrenérgicos em sua superfície, e leva a inibição da proliferação osteoblástica e estímulo da reabsorção óssea. Além disso, a leptina parece, por meio da via periférica, agir de forma contrária, ou seja, aumentar a formação e inibir a reabsorção óssea (KARSENTY, 2006; CHEN; YANG, 2015).

A inflamação crônica de baixo grau presente na obesidade, e o consequente aumento de citocinas pró-inflamatórias como proteína C reativa (PCR),  $TNF\alpha$  e IL6, também pode influenciar na massa óssea. Estes marcadores estão associados à gênese de osteoclastos e aumento da reabsorção óssea (por meio do aumento da expressão de RANKL) (AGUIRRE *et al.*, 2014). Neste contexto, BHUPATHIRAJU *et al.* (2011) e ZHANG *et al.* (2015) encontraram associação negativa entre o tecido adiposo visceral e DMO mesmo após ajuste por IMC, idade e sexo. Adicionalmente, COHEN *et al.* (2013) revelaram que indivíduos no tercil mais alto de gordura do tronco apresentaram redução da formação óssea. Corroborando com este dado, foi constatado que indivíduos obesos e com maior massa de gordura apresentam menor concentração do marcador de formação óssea OC (PITTAS *et al.*, 2009; CAGLAR *et al.*, 2014).

Acrescenta-se que, segundo metanálise publicada em 2015, indivíduos obesos têm maior prevalência de deficiência de vitamina D, mesmo após ajuste por outros fatores de confusão (PEREIRA-SANTOS *et al.*, 2015). A deficiência deste nutriente em obesos pode estar associada à ingestão inadequada, reduzida exposição solar e diminuição da biodisponibilidade por sequestro pelo tecido adiposo. A vitamina D é essencial para absorção de cálcio e saúde óssea e a redução da sua concentração tem como consequência o aumento da secreção do paratormônio (PTH) que estimula a reabsorção óssea (ARAÚJO, 2013).

Um estudo experimental publicado em 2015 sugere que, em animais obesos, o aumento da massa óssea e diminuição concomitante na qualidade do osso seja resultado de um processo de duas fases: primeiramente, há aumento da carga mecânica e produção de

hormônios com efeito anabólico, após, ocorre redução da renovação óssea decorrente do desenvolvimento de disfunção metabólica (LECKA-CZERNIK *et al.*, 2015).

Diante do exposto, observa-se que fatores genéticos, ambientais e o estado nutricional podem afetar a massa óssea por alterarem os processos de reabsorção e formação óssea. A obesidade parece estar positivamente associada à massa óssea, porém esta população também apresenta redução da qualidade do osso, verificada pelo aumento da reabsorção e redução da formação óssea (e, conseqüentemente do marcador desta etapa do metabolismo ósseo, a OC).

### 1.3 Eixo endócrino osso-pâncreas

LEE *et al.* (2007) propuseram, em modelo experimental, que o osso poderia ser um órgão endócrino. Neste estudo, foi proposto que a OC estivesse associada com a proliferação das células  $\beta$ -pancreáticas, secreção e sensibilidade à insulina e, ainda, com o gasto energético. Em consonância, a infusão de osteocalcina não carboxilada (OCun) em camundongos selvagens promoveu maior tolerância à glicose e aumento da secreção de insulina (FERRON *et al.*, 2008). Para tentar explicar estes efeitos, PI *et al.* (2011) demonstraram *in vivo* e *in vitro* a existência de um receptor acoplado a proteína G, GPCR6a, nas células  $\beta$ -pancreáticas, no qual a OC poderia se ligar e estimular a proliferação dessas células e a secreção de insulina.

Segundo revisão publicada por FERRON *et al.* (2014), além de aumentar a secreção de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas, foi demonstrado que a OC pode afetar a sensibilidade à insulina possivelmente por meio do aumento da expressão de adiponectina, uma adipocina anti-inflamatória, em tecido adiposo branco e redução da secreção de citocinas pró-inflamatórias sabidamente envolvidas no desenvolvimento da RI.

Embora em animais os estudos pareçam sinalizar para a existência de um eixo endócrino osso pâncreas, os estudos conduzidos em humanos permanecem controversos. POLGREEN *et al.* (2012) trabalharam com indivíduos adultos jovens e não identificaram associação entre OC e o modelo de avaliação da homeostase da RI (índice HOMA1-IR). Corroborando com este resultado, LU *et al.* (2012) e CAGLAR *et al.* (2014) também não encontraram associação entre OC e os seguintes marcadores: HOMA1-IR, modelo de avaliação da homeostase de secreção de insulina (HOMA2- $\beta$ ) e o marcador de sensibilidade à insulina - QUICKI. Além disso, HWANG *et al.* (2012a) reportaram que a OC não se associou ao desenvolvimento de DM tipo 2 durante o acompanhamento de indivíduos por um período médio de 8 anos



Em contrapartida, KANAZAWA *et al.* (2011) e RUI *et al.* (2014) demonstraram que OC associou-se negativamente à glicemia plasmática e hemoglobina glicada (HbA1C). RUI *et al.* (2014) também observaram associação negativa de OC com o HOMA1-IR, HOMA2- $\beta$  e o modelo de avaliação da homeostase da sensibilidade à insulina (HOMA2-S). BAO *et al.* (2013) também identificaram que OC correlacionou-se negativamente com HOMA1-IR e HbA1C.

Quanto à DMO, foi encontrado apenas um estudo que buscou avaliar a associação entre DMO e o metabolismo de glicose. PIRILÄ *et al.* (2014) avaliaram 155 indivíduos adultos jovens e não encontraram associação entre DMO, insulina e glicose plasmáticas na análise não ajustada e após ajuste pelo sexo, massa de gordura e fatores de estilo de vida. Para melhor compreensão da literatura, as informações dos principais estudos que verificaram associação entre o osso e o metabolismo de glicose, avaliando especificamente a OC e a DMO, foram resumidas nos **Quadros 1 e 2**.

A partir da análise metodológica destes artigos (**Quadros 1 e 2**), verifica-se que os testes estatísticos mais utilizados são os de correlação paramétrico (*Pearson*) e não paramétrico (*Spearman*) e a regressão linear múltipla. Alguns estudos também trabalharam com testes de diferença de médias entre os tercis de OC. Na maioria dos casos, os estudos que utilizam testes paramétricos normalizam as variáveis com distribuição assimétrica (como HOMA1-IR e HOMA2- $\beta$ ) por meio da transformação log. Os fatores de confusão mais descritos para ajuste dos testes são o IMC, idade e sexo. As covariáveis etnia e fatores de estilo de vida (atividade física, tabagismo e etilismo) também foram mencionados. Apenas 4 estudos dentre os avaliados não encontraram associação entre OC e/ou DMO, metabolismo de glicose e o desenvolvimento de DM tipo 2 (HWANG *et al.*, 2012a; POLGREEN *et al.*, 2012; CAGLAR *et al.*, 2014; PIRILÄ *et al.*, 2014) e apenas 1 destes trabalhos realizou regressão linear múltipla ajustada por fatores de confusão e normalizou a variável HOMA1-IR por meio de transformação log. Cabe salientar, entretanto, que POLGREEN *et al.* (2012) também incluiu indivíduos adolescentes em suas análises.

Importante salientar que embora OC seja o marcador mais estudado no contexto do eixo endócrino osso-pâncreas, outros marcadores também parecem influenciar na homeostase de glicose, conforme descrito em uma revisão publicada em 2013 (VELDHUIS-VLUG *et al.*, 2013). Foram observados os marcadores de formação óssea: propeptídeo amino terminal do procolágeno tipo 1 (P1NP) e fosfatase alcalina específica do osso (FAL), e de reabsorção óssea: telopeptídeo C-terminal (CTX) e telopeptídeo N-terminal (NTX). Alguns estudos não demonstraram associação entre estes marcadores e RI (KINDBLOM *et al.*, 2009; SHEA *et*

*al.*, 2009; GOWER *et al.*, 2013), enquanto LUCEY *et al.* (2013) verificaram associação positiva entre P1NP e HOMA1-IR.

Quanto à plausibilidade biológica do nosso estudo, cabe esclarecer que embora a associação entre o osso e o metabolismo de glicose esteja sendo estudada há uma década, o tema permanece controverso em humanos. Conforme exposto, em modelos experimentais e alguns estudos revisados em humanos (LEE *et al.*, 2007; FERRON *et al.*, 2008; GRAVENSTEIN *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2014), OC parece estar inversamente associada à RI. Além disso, OC é um marcador de formação óssea e, por isso, está positivamente associada à DMO (HAUSCHKA *et al.*, 1989). Estas características fazem da OC um potencial fator de confusão na associação entre DMO e RI. Sabe-se ainda que o tecido adiposo visceral pode alterar o metabolismo ósseo, afetando inclusive a concentração de OC (PITTAS *et al.*, 2009), e, por isso, pode ser avaliado como fator modificador na associação entre o osso e o metabolismo de glicose.

Enfim, acrescenta-se que os resultados acerca da associação entre o osso e o metabolismo de glicose ainda não estão totalmente claros e, diante disso, justifica-se a realização de estudos que contribuam com evidências que auxiliem no melhor entendimento desta relação.

**Quadro 1.** Características da amostra, idade dos indivíduos, objetivo e tamanho amostral dos estudos revisados.

<b>Autor, ano</b>	<b>Características da amostra (estado nutricional/doenças pré-existent)</b>	<b>Idade dos participantes</b>	<b>Objetivo do estudo</b>	<b>Tamanho da amostra</b>
Polgreen <i>et al.</i> , 2012	Média (DP) IMC: 25,5 (0,5) kg/m <sup>2</sup> -16% com obesidade, 21% sobrepeso e 63% eutróficos Média %GC e PC, respectivamente, de acordo com quartil de OC: Q1: 27,2 e 86,9; Q2: 26,4 e 83,8; Q3: 23,2 e 80,1; Q4: 23,1 e 78,9 De acordo com glicemia de jejum: 1 participante com DM e 7% com pré-DM	Média (DP) 18,6(0,1)	Determinar se baixas concentrações de OC estão associadas com RI e obesidade	137 (67 homens e 70 mulheres)
Bao <i>et al.</i> , 2013	Média (DP) nos grupos sem e com SM, respectivamente IMC: 22,77(2,41) e 26,02(3,40) PC: 83,97(8,62) e 96,78(7,27)	Média (DP) 64,9(10,7)	Avaliar a associação entre OC e SM	181 homens (76 sem SM e 105 com SM)
Jung <i>et al.</i> , 2016	Média (DP) IMC e PC, respectivamente: Homens < 50 anos: 25,6(3,2) e 87,7(9,4) Homens ≥ 50 anos: 25,0(3,2) e 88,2(7,5) Mulheres < 50 anos: 22,2(3,6) e 72,2(9,4) Mulheres ≥ 50 anos: 24,4(3,4) e 82,2(7,7) O estudo incluiu indivíduos com DM, pré-DM e tolerância normal à glicose.	Média (DP) Homens < 50 anos: 38,1(7,9) Homens ≥ 50 anos: 61,6(8,6) Mulheres < 50 anos: 35,4(9,3) Mulheres ≥ 50 anos: 63,3(8,1)	Avaliar a associação entre OC e a homeostase de glicose em homens e mulheres de acordo com a idade e o sexo	719 (131 homens<50 anos; 191≥50 anos; 108 mulheres<50 anos e 279≥50 anos)
Caglar <i>et al.</i> , 2014	Média (DP) IMC: 28,2(4,8) - 31% mulheres eutróficas, 40% com sobrepeso e 29% com obesidade PC: 94,3(15,6) Mulheres na menopausa, sem doenças pré-existent	Média (DP) 54,7(5,3)	Avaliar a associação entre OC e RI	87 mulheres
Hwang, <i>et al.</i> , 2012a	Média (DP) IMC: 23,8(2,3) %GC: 22,4(4,5) No início do acompanhamento, os homens não possuíam DM.	Média (DP) 47,4(5,8)	Investigar associação entre OC e o desenvolvimento de DM tipo 2 ao longo de um período médio de acompanhamento de 8,4 anos	1229 homens
Lucey <i>et al.</i> , 2013	Média (DP) IMC: 30,1(1,5) %GC: 33,3(7,6) MG: 28,9(5,6) MM: 59,4(12,1)	Média (DP) Homens: 32,2(5,3) Mulheres: 31,5(5,4)	Investigar associação entre OC e os parâmetros do metabolismo de glicose	268 (116 homens e 152 mulheres)

	Indivíduos com obesidade, sem DM			
Pirilä <i>et al.</i> , 2014	Média (DP) IMC: 24,8(3,8) PC: 83,8(11,8) %GC: 25,6(7,1) MG: 19,6(7,4) MM: 53,8(11,0) Indivíduos com (14) e sem SM (141)	Média (DP) Homens: 32,4(31,7-33,9) Mulheres: 32,5(31,7-34,0)	Avaliar associação entre fatores de risco cardiovascular, DMO e marcadores do <i>turnover</i> ósseo	155 (74 homens e 81 mulheres)
Chen <i>et al.</i> , 2014	Média (DP) IMC dos indivíduos com DM tipo 2, pré DM tipo 2 e tolerância normal, respectivamente: 26,9(0,75); 27,6(1,01); 26,3(4,84)	Média (DP) Tolerância normal: 48,0(10,0) Tolerância reduzida: 50,0(10,0) DM tipo 2: 48,0(11,0)	Avaliar a relação entre OC e o metabolismo de glicose em indivíduos com diferentes graus de tolerância a glicose	160 (46 com tolerância normal, 52 com redução da tolerância e 62 com DM tipo 2)
Hwang, <i>et al.</i> , 2012b	Média (DP) IMC: 25,5(3,8)	Média (DP) 53,0(12,0)	Verificar se OC está positivamente associada à sensibilidade e secreção de insulina	425 (23 com tolerância normal, 150 pré-diabetes e 252 com DM)
Gravenstein <i>et al.</i> , 2011	Mediana (IQ) IMC: 25,9 (23,6 –29,5) Sem doenças pré existentes relatadas	Média (DP) Homens: 71(60-79) Mulheres: 66(59-76)	Investigar a associação entre OC, resistência e secreção de insulina	580 (300 homens e 280 mulheres)
DP, desvio padrão; IMC, índice de massa corporal; GC, gordura corporal; PC, perímetro da cintura; OC, osteocalcina; Q, quartil; RI, resistência à insulina; SM, síndrome metabólica; DM, diabetes <i>mellitus</i> ; MG, massa de gordura; MM, massa magra; DMO, densidade mineral óssea;				

**Quadro 2.** Variáveis de exposição, desfecho, testes estatísticos utilizados e principais resultados dos estudos revisados.

Referência	Variáveis de exposição	Variáveis de desfecho	Teste estatístico e fatores de ajustes	Resultados
Polgreen <i>et al.</i> , 2012	OC total	Clamp hiperinsulinêmico-euglicêmico, HOMA1-IR (log), IMC e PC	Regressão linear múltipla ajustada pela idade, sexo, etnia e IMC	OC total foi inversamente associada com IMC e PC e diretamente com a sensibilidade à insulina no modelo não ajustado. Na análise ajustada, a associação com a sensibilidade à insulina tornou-se <i>borderline</i> ( $p=0,056$ ). Associação entre OC e log de HOMA1-IR não apresentou significância estatística
Bao <i>et al.</i> , 2013	OC total	IMC, PC, HbA1C, HOMA1-IR e HOMA2- $\beta$	Correlação de Spearman, teste de correlação parcial, ajustado pela idade e IMC e regressão logística múltipla ajustada pela idade, IMC, insulina de jejum, log HOMA1-IR e HbA1c	Indivíduos com SM apresentaram menor concentração de OC. Verificou-se correlação inversa entre OC e IMC, PC, HbA1C e HOMA1-IR e positiva com HOMA2- $\beta$ . Após ajuste, as análises permaneceram significativas. Na regressão, verificou-se que OC é um fator preditor independente da SM
Jung <i>et al.</i> , 2016	OC total	IMC, HOMA1-IR (log), HbA1c, HOMA2- $\beta$ (log) e IGI	Correlação de Pearson e regressão linear múltipla ajustada por fatores que afetam homeostase de glicose e metabolismo ósseo	Correlação inversa entre OC e HbA1c independente da idade. Correlação inversa da OC com IMC apenas em homens < 50 anos. Correlação inversa de OC com HOMA1-IR em mulheres, independente da idade, e homens com < 50 anos e positiva com HOMA2- $\beta$ e IGI em homens, independente da idade, e mulheres com < 50 anos. Na regressão, verificou-se associação inversa entre OC e HbA1c em homens, independente da idade, e mulheres com < 50 anos
Caglar <i>et al.</i> , 2014	OC total	IMC, PC, HOMA1-IR, HOMA2- $\beta$ , QUICKI	Correlação de Spearman	Mulheres com sobrepeso apresentaram menor concentração de OC. As variáveis antropométricas e do metabolismo de glicose não foram correlacionadas com OC.
Hwang, <i>et al.</i> , 2012a	OC total	IMC, %GC, HbA1C, HOMA1-IR (log), HOMA2- $\beta$ (log)	ANOVA one-way e teste de Tukey para comparação de médias entre os tercís de OC e modelo de risco proporcional de Cox (avaliar a incidência de DM tipo 2 entre os tercís de OC), ajustado por outros fatores de risco para DM como: idade, IMC, %GC, glicemia, HbA1C, tabagismo	%GC e HOMA1-IR variaram inversamente de acordo com os tercís de OC. Não foi verificada diferença estatística no desenvolvimento de DM tipo 2 entre os tercís de OC

Lucey <i>et al.</i> , 2013	OC total	IMC, %GC, MG (kg), MM (kg), HOMA1-IR	Análise univariada de covariância para comparar as médias das variáveis, entre os tercís de OC. Regressão linear múltipla para avaliar associação entre OC (categorizada em maior ou menor que a concentração média) e os marcadores do metabolismo, ajustando por co-variáveis pertinentes	Em mulheres verificou-se que a MM variou positivamente de acordo com os tercís de OC total. Pela análise de regressão linear múltipla, verificou-se associação inversa entre OC e HOMA1-IR em mulheres com concentração de OC abaixo da média do grupo
Pirilä <i>et al.</i> , 2014	OC total e DMO (corporal, coluna, colo do fêmur)	Glicemia e insulinemia	Correlação parcial ajustada por sexo, massa de gordura e fatores de estilo de vida (tabagismo, etilismo e atividade física)	OC e DMO não foram associados à glicemia ou insulinemia nos modelos ajustados. Não foram encontradas diferenças para OC e DMO entre indivíduos com e sem SM após ajuste por fatores de confusão.
Chen <i>et al.</i> , 2014	OC total	Glicemia, HOMA1-IR (log) e HOMA2-β (log)	Correlação de Pearson e teste de correlação parcial, ajustado para idade e IMC	Não foi observada diferença estatística da concentração de OC entre os 3 grupos avaliados. OC total foi negativamente correlacionada com HOMA1-IR, mesmo após ajustes
Hwang, <i>et al.</i> , 2012b	OC total	HbA1C, HOMA1-IR (log), HOMA2-β (log) e índices de sensibilidade (Matsuda e Stumvoll), e de secreção de insulina (disposição (log) e insulínogênico (log))	ANOVA one-way e teste de Tukey para comparação de médias entre os tercís de OC, regressão linear múltipla ajustada por idade, sexo, IMC e leptina e regressão logística múltipla	Concentração de OC foi significativamente menor no grupo com DM. HbA1C e HOMA1-IR variaram inversamente de acordo com os tercís de OC e HOMA2-β positivamente. Na análise de regressão linear, OC foi positivamente associada com sensibilidade e secreção de insulina (avaliadas pelos índices Stumvoll e de disposição). OC foi inversamente associada ao desenvolvimento de DM
Gravenstein <i>et al.</i> , 2011	OC total	HOMA2-IR (log) e ISI (log)	Regressão linear múltipla ajustado por idade, sexo e IMC	OC negativamente associadas com HOMA2-IR

OC, osteocalcina; IMC, índice de massa corporal; PC, perímetro da cintura; GC, gordura corporal; MG, massa de gordura; MM, massa magra; RI, resistência à insulina; SM, síndrome metabólica; DM, diabetes *mellitus*; DMO, densidade mineral óssea; IGI, índice insulínogênico; ISI, índice de secreção de insulina; HOMA-IR e HOMA2-IR, modelo de avaliação da homeostase de resistência à insulina; HOMA-β, modelo de avaliação da homeostase de secreção de insulina; QUICKI, índice de verificação quantitativa da sensibilidade à insulina; HbA1C, hemoglobina glicada; ANOVA, análise de variância.

## 2. Justificativa

A RI está associada ao desenvolvimento do DM tipo 2, um importante problema de saúde pública mundial. Segundo dados da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), o número de indivíduos com DM tipo 2 vem aumentando devido ao envelhecimento da população, bem como maior prevalência de obesidade e sedentarismo, fatores etiológicos relacionados à RI (SBD, 2015). Em contrapartida, recentemente tem sido estudado que o marcador do metabolismo ósseo OC parece se associar inversamente à RI, sugerindo a existência de um possível eixo endócrino osso-pâncreas. No entanto, os resultados neste contexto ainda permanecem controversos (GRAVENSTEIN et al., 2011; POLGREEN et al., 2012).

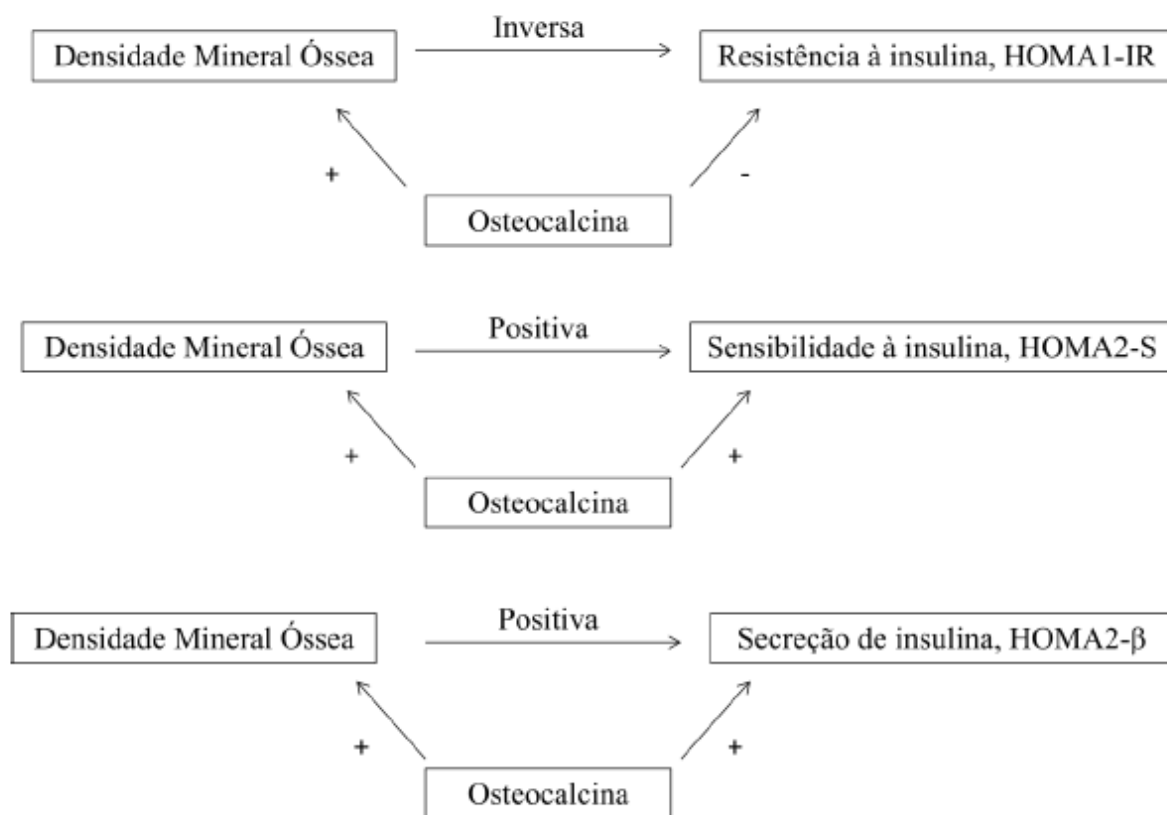
Como potenciais motivos para os resultados ainda controversos encontrados na literatura, levantam-se: 1) diferenças metodológicas encontradas entre os estudos, como: 1a) diferentes testes estatísticos utilizados; 1b) normalização ou não de variáveis com distribuição assimétrica, como os índices HOMA, ao utilizar teste estatístico para variáveis paramétricas; 1c) inclusão ou não de fatores de confusão para ajuste das análises; 1d) inclusão de fatores de ajuste com grande colinearidade em uma mesma análise, como IMC, PC, % gordura corporal); e, 2) possibilidade que covariáveis (como o estado nutricional) não estejam sendo adequadamente exploradas. A maioria dos estudos utiliza os marcadores de obesidade como fatores de ajuste, no entanto, sabendo que o acúmulo de gordura corporal, especialmente visceral, está relacionado a disfunções metabólicas que alteram o metabolismo ósseo e a DMO<sub>a</sub>, acreditamos ser importante a sua avaliação como um importante fator modificador na associação entre o osso e o metabolismo de glicose.

Ademais, quanto à densidade óssea, encontramos apenas um trabalho que tenha explorado a relação da DMO com marcadores do metabolismo de glicose (PIRILÄ et al., 2014). Em nosso estudo, sugerimos que uma vez que a OC pode se associar a resistência, sensibilidade e secreção de insulina e, sabidamente, participa da formação e aumento da massa óssea, este marcador pode ser considerado um potencial fator de confusão na associação entre a DMO e o metabolismo de glicose.

Adiciona-se que frente ao aumento da prevalência de DM na população mundial torna-se importante a realização de trabalhos que investiguem potenciais fatores associados à RI e que possam gerar evidências que auxiliem a esclarecer o eixo endócrino osso pâncreas.

### 3. Hipótese

A hipótese do presente estudo é que a DMO é inversamente associada com a RI e positivamente associada com a sensibilidade e a secreção de insulina e esta associação não é independente da OC (**Figura 3**). Sabendo que a obesidade visceral pode alterar o metabolismo ósseo acreditamos que o perímetro da cintura pode ser um fator modificador na associação entre DMO e os marcadores do metabolismo de glicose por alterar a qualidade e o metabolismo ósseo (redução da formação óssea e aumento da reabsorção óssea).



**Figura 2.** Hipótese da associação entre densidade mineral óssea e os marcadores do metabolismo de glicose estudados.



## 4. Objetivos

### 3.1 Objetivo geral

Avaliar presença de associação entre a densidade mineral óssea e a resistência, sensibilidade e secreção de insulina em indivíduos adultos jovens nascidos em 1978/79 no município de Ribeirão Preto, testando potencial efeito modificador do perímetro da cintura nesta associação.

### 3.2 Objetivos específicos

- (i) Descrever as características gerais da população de adultos jovens estudada;
- (ii) Avaliar a distribuição das variáveis de desfecho de acordo com as categorias das covariáveis analisadas no estudo;
- (iii) Avaliar a distribuição das variáveis de desfecho de acordo com as categorias das variáveis de exposição (DMO coluna lombar, colo do fêmur e fêmur proximal total) incluídas no estudo;
- (iv) Avaliar a inclusão das covariáveis de ajuste nas análises, por meio do gráfico acíclico direcionado;
- (v) Avaliar a associação entre a densidade mineral óssea e os índices HOMA1-IR, HOMA2-S e HOMA2- $\beta$ ;
- (vi) Investigar se o perímetro da cintura (PC) é um fator modificador na associação entre a densidade mineral óssea e os marcadores do metabolismo da glicose estudados;
- (vii) Verificar se a osteocalcina é um fator de confusão na associação entre a densidade mineral óssea e os marcadores do metabolismo de glicose estudados ou se esta associação é independente da ação de osteocalcina.

## 5. Métodos

### 5.1 Desenho

A presente dissertação compreende análise transversal, utilizando dados coletados na quarta fase do estudo prospectivo “Da saúde perinatal à saúde do adulto jovem: estudo da coorte nascida em 1978/79 em hospitais de Ribeirão Preto, SP” que envolveu indivíduos nascidos no município de Ribeirão Preto no período de 1º de junho de 1978 a 31 de maio de 1979.

### 5.2 Captação dos participantes

#### 5.2.1 Evolução da coorte

A evolução da coorte de nascidos vivos em 1978/79 até a quarta fase do estudo (2002/04), momento em que foram coletados os dados utilizados no presente estudo, está apresentada na **Figura 3**.

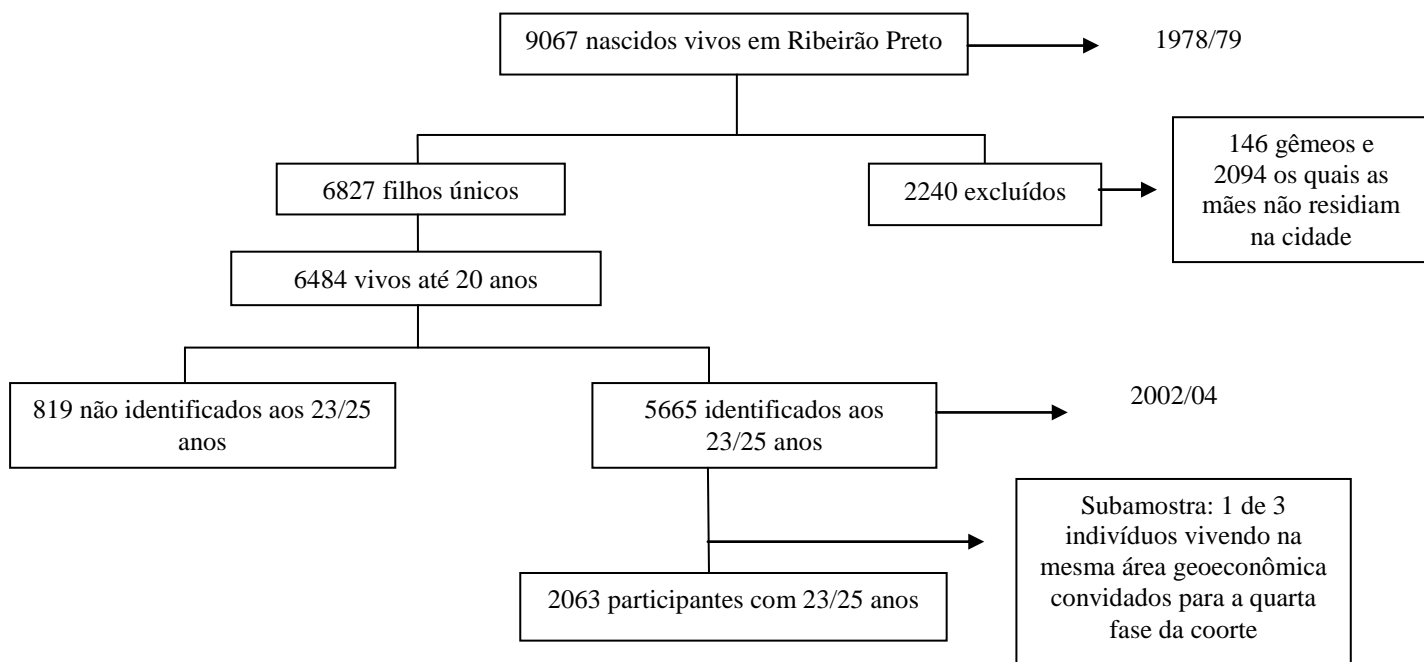
Durante o período de 1º de junho de 1978 a 31 de maio de 1979, 9.067 nascidos vivos em hospitais de Ribeirão Preto (o que representa 98% do total de nascimentos registrados neste período) foram incluídos na amostra original do estudo. Do total, foram excluídos 2.094 recém-nascidos os quais as mães não residiam na cidade e 146 gêmeos, resultando em 6.827 bebês que seguiram no estudo para a coorte de *follow-up*. Destes, 246 morreram durante o primeiro ano de vida e 97 até os 20 anos de vida, resultando em um total de 343 mortes. Entre os anos de 2002 a 2004, quando os indivíduos tinham entre 23 e 24 anos de idade, o quarto *follow-up* foi conduzido. Dos 6.484 vivos aos 20 anos, 5.665 foram identificados ainda vivendo na cidade para esta fase do estudo (BARBIERI *et al.*, 2006).

Para localização destes participantes, as seguintes fontes foram utilizadas: sistema Hygia de agendamento eletrônico para usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), listas de usuários de planos de saúde privados e avaliação dos alunos e dos recrutas militares pertencentes aos acompanhamentos realizados em 1987/89 e 1996/97. Foram realizados contatos telefônicos para aqueles que possuíam telefone fixo ou móvel e enviadas cartas contendo explicações sobre o objetivo do estudo com contato do projeto. Outros meios de comunicação como televisão, rádio e jornais também foram utilizados (BARBIERI *et al.*, 2006).

A cidade de Ribeirão Preto é composta por 4 regiões geoeconômicas. Assim, foi criada uma subamostra na qual um de cada três indivíduos, identificados como participantes da amostra original, que viviam na mesma área geoeconômica, foram convidados a participar desta fase do estudo. Destes, 705 indivíduos não puderam ser incluídos (recusa, prisão, morte após 20 anos ou não comparecimento à entrevista), resultando em um total de 2.063 adultos jovens que participaram do acompanhamento (BARBIERI *et al.*, 2006).

### 5.2.2 Cálculo da amostra

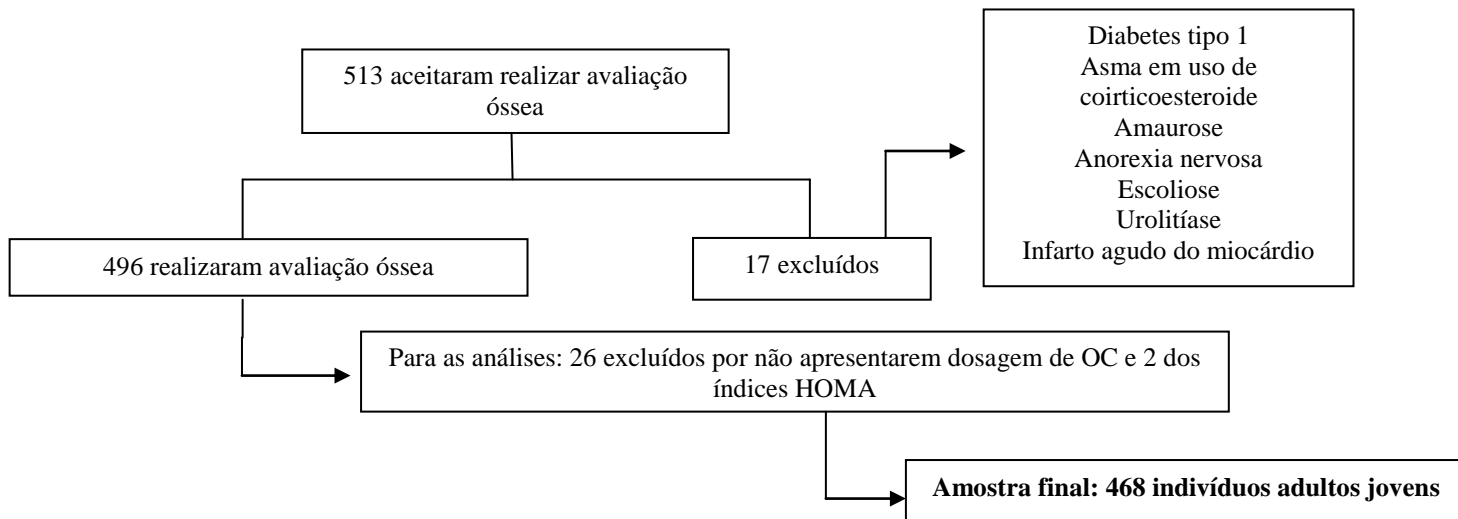
O cálculo do tamanho da amostra foi realizado a partir da fórmula proposta por RONA *et al.* (1993). O estudo maior levou em consideração que com uma amostra de 1.084 pessoas já será possível detectar correlação de 0,085 (correspondendo a um coeficiente de regressão de 0,624) em um nível de significância de 5% e com poder do teste de 80%. Assim, foi proposto que aproximadamente 30% da população elegível aos 20 anos de idade (6.484 indivíduos), o que corresponde a 1.946 indivíduos, seriam convidados a participar do estudo. Ao final da coleta de dados foram captados 2.063 indivíduos (BARBIERI *et al.*, 2006).



**Figura 3.** Evolução da coorte de nascidos vivos em 1978/79 até a quarta fase do estudo.

### 5.2.3 População avaliada no presente estudo

Dos 2063 incluídos na quarta fase da coorte, apenas 513 concordaram em realizar a avaliação óssea. Dezesete indivíduos foram excluídos por apresentarem alguma condição que poderia interferir na avaliação clínica ou nas medidas do metabolismo ósseo (a saber: diabetes *mellitus*, asma em uso de corticoesteróide, amaurose, anorexia nervosa, escoliose, urolitíase e infarto agudo do miocárdio) (SCHLÜSSEL *et al.*, 2010). Destes 496 indivíduos, para a realização das análises, 26 foram excluídos por não terem realizado a dosagem de OC total e 2 dos marcadores do metabolismo de glicose (HOMA1-IR, HOMA2-S e HOMA2- $\beta$ ), totalizando 468 indivíduos adultos jovens que apresentaram avaliação de DMO, OC e dos índices HOMA (**Figura 4**).



**Figura 4.** Fluxograma da população avaliada no presente estudo.

### 5.3 Variáveis do estudo

#### 5.3.1 Variáveis dependentes

##### 5.3.1.1 Modelos de Avaliação da Homeostase (HOMA)

As amostras de sangue dos indivíduos adultos jovens foram coletadas por técnico de enfermagem, após jejum de no mínimo 12 horas, identificadas e centrifugadas para obtenção do plasma, o qual foi armazenado em *freezer* para realização das análises. Todas as análises foram realizadas nos laboratórios do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A glicemia de jejum foi determinada por método enzimático colorimétrico (Chronolab AG, Zug, Suíça) e a insulina de jejum foi medida por radioimunoensaio (DPC, Los Angeles, EUA). Foi calculada a estimativa da RI, utilizando o modelo original de avaliação da homeostase – HOMA1-IR, por meio da fórmula glicemia de jejum (mmol/L) x insulina de jejum ( $\mu$ U/ml)/22,5 (MATTHEWS *et al.*, 1985).

A estimativa da sensibilidade à insulina (HOMA2-S) e da secreção de insulina por meio da função de célula  $\beta$  (HOMA2- $\beta$ ) foi calculada por meio do modelo HOMA2, disponível por meio de calculadora *online* (<https://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/>). Este modelo leva em conta as variações na resistência hepática e periférica, aumento na curva de secreção de insulina para a concentração plasmática de glicose acima de 10 mmol/L (180mg/dL) e a contribuição da pró-insulina circulante (MADEIRA *et al.*, 2013).

### 5.3.2 Variáveis independentes

#### 5.3.2.1 Densidade Mineral Óssea

A DMO ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) foi obtida por meio da densitometria óssea por absorção de raios-X de dupla energia (DEXA), usando o equipamento Hologic QDR-4500 (Waltham, EUA), em três áreas anatômicas de interesse: coluna lombar (região L1-L4), colo do fêmur e fêmur proximal total (SCHLÜSSEL *et al.*, 2010). A análise foi realizada no aparelho do laboratório da Medicina Nuclear do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP).

### 5.3.3 Potenciais fatores de confusão

#### 5.3.3.1 Coleta de covariáveis

Foram aplicados questionários estruturados para coleta das covariáveis: questionário geral estruturado, no qual foram obtidas informações de escolaridade (anos), auto avaliação da cor da pele e tabagismo; questionário para avaliação do nível de atividade física (CRAIG *et al.*, 2003) e questionário de frequência alimentar (QFA), validado para a população brasileira (CARDOSO; STOCCO, 2000), o qual também continha questões sobre consumo de álcool. Adicionalmente, foi realizada avaliação antropométrica.

##### 5.3.3.1.1 Variáveis coletadas pelo questionário geral

A escolaridade foi categorizada em  $\leq 8$  anos, 9-11 anos e  $\geq 12$  anos de estudo. A cor da pele foi avaliada de acordo com os critérios do censo brasileiro (TRAVASSOS; WILLIAMS, 2004), como branco, mulato, negro e amarelo, e categorizada em brancos e não brancos, sendo aqueles que não eram brancos (os mulatos, negros e amarelos) reunidos em uma categoria única. O hábito de fumar foi categorizado entre fumantes e não fumantes.

##### 5.3.3.1.2 Atividade física

A atividade física foi avaliada utilizando a versão reduzida do questionário internacional de atividade física (IPAQ), validado para a população brasileira, e categorizada de acordo com as recomendações do mesmo em baixo, moderado ou alto nível de atividade (CRAIG *et al.*, 2003).

##### 5.3.3.1.3 Ingestão de energia e álcool

A ingestão de energia ( $\text{kcal}/\text{dia}$ ) foi estimada baseando-se na adaptação de um questionário validado para a comunidade Nipo-Brasileira de São Paulo (CARDOSO; STOCCO, 2000), o qual continha uma lista com 75 itens alimentares (RIBEIRO; CARDOSO, 2002), e aplicado em entrevistas por nutricionistas. O cálculo foi realizado por meio do software Dietsys versão 4.0. O consumo de álcool foi estimado com base no QFA e expresso em porcentagem do total de energia da dieta por dia.

#### 5.3.3.1.4 Avaliação antropométrica

As medidas antropométricas (peso, estatura e PC) foram medidas por técnicos de enfermagem treinados de acordo com protocolo padrão (TANNER, 1986). O peso foi medido utilizando balança mecânica (Filizola, São Paulo, Brasil) com precisão de 100 g. A estatura foi avaliada utilizando estadiômetro portátil de madeira (Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil) com precisão de 0,1 cm e o IMC foi calculado por meio da divisão do peso em quilogramas pela estatura em metros quadrados ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) e classificado de acordo com pontos de corte da Organização Mundial da Saúde (1995) em  $\leq 24,9$  (eutrofia e magreza), 25 - 29,9 (sobrepeso) e  $\geq 30 \text{ kg}/\text{m}^2$  (obesidade) (WHO, 1995). O PC foi medido, utilizando fita métrica não extensível, na menor circunferência entre as costelas e a crista ilíaca, com o indivíduo de pé e o abdômen relaxado, ao final de uma expiração normal (LOHMAN *et al.*, 1988), e categorizado de acordo com os pontos de corte definidos pela OMS em PC normal quando  $\text{PC} < 94$  cm para homens e  $< 80$  cm para mulheres e PC aumentado quando  $\text{PC} \geq 94$  cm para homens e  $\geq 80$  cm para mulheres (WHO, 1998).

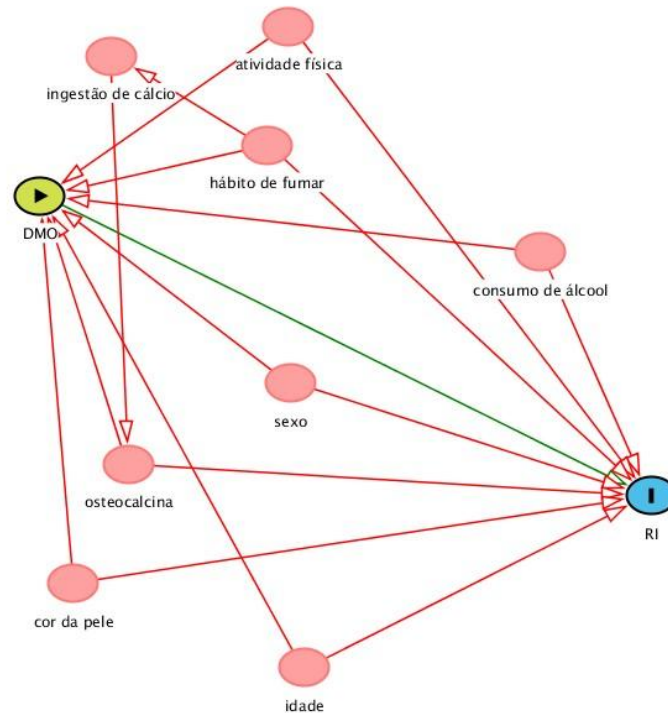
#### 5.3.3.1.5 Osteocalcina

A osteocalcina total foi determinada por método imunorradiométrico (DSL-7600, IRMA, Webster, TX, EUA).

#### 5.3.3.2 Diagrama causal

DAGitty é o *software* utilizado para a construção e análise de diagramas causais (DAGs) e encontra-se disponível *online* em [www.dagitty.net](http://www.dagitty.net). O DAG é um modelo gráfico que descreve hipóteses sobre o processo causal. A presença de uma seta entre duas variáveis representa efeito causal direto e significa que o processo de determinação de uma variável (para a qual a seta aponta) é influenciado pelo *status* de outra variável (da qual a seta parte). Segundo o manual do *software*, a seta entre duas variáveis representa apenas parte do efeito causal, ou seja, aquele que não é mediado por outras variáveis presentes no DAG (TEXTOR *et al.*, 2011).

Diversos fatores descritos na literatura podem se associar à etiologia da RI e afetar a sensibilidade e secreção de insulina. No presente estudo, as seguintes covariáveis foram incluídas no DAG: ingestão de cálcio, idade, sexo, cor da pele, tabagismo, etilismo, prática de atividade física e osteocalcina. Assim, os potenciais fatores de confusão envolvidos na associação entre DMO e RI foram identificados por meio do DAG apresentado na **Figura 5**. O PC foi tratado como fator modificador de efeito e, portanto, não foi incluído no DAG. O consumo de cálcio foi incluído por afetar a OC e ser afetado pelo tabagismo. No entanto, segundo avaliação do DAG, ao ajustar nosso modelo pela variável mais proximal, OC, o efeito do consumo de cálcio já estaria sendo captado e, por este motivo, esta covariável não foi incluída em nosso modelo estatístico.







**Figura 5.** Diagrama causal da associação entre densidade mineral óssea e resistência à insulina.

**Nota:** Ajustes mínimos suficientes para estimar o efeito total da DMO sobre a RI sugeridos pelo DAG – idade, OC, cor da pele, sexo, atividade física, consumo de álcool e tabagismo.

**Abreviações:** DMO, densidade mineral óssea; RI, resistência à insulina.

#### Legenda:

-  Exposição
-  Desfecho
-  Antecede a exposição
-  Antecede a Exposição e Desfecho

#### 5.4 Análises estatísticas

Primeiramente foi realizada análise exploratória dos dados para avaliação da distribuição das variáveis.

Para descrever as características gerais da população foram utilizadas médias (desvio padrão) ou medianas (intervalo interquartil) e proporções para as variáveis contínuas simétricas, assimétricas e variáveis categóricas, respectivamente.

Para explorar potenciais fatores associados à distribuição das variáveis de desfecho (HOMA1-IR, HOMA2-S e HOMA2- $\beta$ ), essas foram descritas em medianas e intervalos interquartis, estratificadas pelas categorias de covariáveis e variáveis de exposição (DMO, coluna lombar, colo do

fêmur e fêmur proximal total). As variáveis contínuas foram categorizadas em tercís, e as comparações entre as categorias foram realizadas utilizando os testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis.

Para avaliar a associação entre a DMO e RI (HOMA1-IR), sensibilidade à insulina (HOMA2-S) e secreção de insulina (HOMA2- $\beta$ ), modelos de regressão linear foram construídos para cada resultado. Para esta análise, HOMA1-IR, HOMA2-S e HOMA2- $\beta$  foram log-transformados. Considerando que a inflamação associada ao tecido adiposo visceral pode alterar o metabolismo ósseo, o PC foi testado como fator modificador de efeito nos modelos de regressão linear. Para interpretação das interações, foram construídos gráficos para cada área anatômica óssea avaliada (coluna lombar, colo do fêmur e fêmur proximal total) e os resultados (HOMA1-IR, HOMA2-S e HOMA2- $\beta$ ), estratificados de acordo com os pontos de corte da OMS para PC em PC normal e PC aumentado (WHO, 1998).

A OC foi incluída nos modelos como um fator de confusão devido a sua associação com as variáveis de exposição e desfecho e observou-se se a associação entre a DMO e metabolismo da glicose é dependente deste marcador. As demais covariáveis foram selecionadas para inclusão no modelo final com base no DAG.

Na avaliação da distribuição das variáveis de desfecho e também nas regressões múltiplas, as associações com  $p < 0,05$  foram consideradas significativas, exceto na avaliação de interações, em que valor de  $p < 0,1$  foi considerado significativo (TWISK, 2006). Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* estatístico para análise de dados Stata (STATA) versão 12.0 (STATA Statistical Software: Release 12. College Station, TX: StataCorp LP).

## 5.5 Questões éticas

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo sob o número de protocolo 7606/99. O termo de consentimento foi estruturado em 3 fases de acordo com as avaliações que os indivíduos consentiam em participar (todas as avaliações incluindo os exames mais invasivos, avaliação que não incluía determinados testes invasivos, avaliação que incluía apenas alguns dos testes invasivos). Essa estratégia permitiu a obtenção de informações a partir de uma proporção maior da população (BARBIERI *et al.*, 2006).



## 6. Resultados

Artigo: **Waist circumference is an effect modifier of the association between bone mineral density and glucose metabolism**

## Abstract

**Background:** Bone may play an important role in insulin resistance but results remain controversial. The objective of this study is to evaluate the association between bone mineral density (BMD) and glucose metabolism and investigate if waist circumference (WC) is an effect modifier of this association.

**Methods:** Cross-sectional analysis with 468 young adults from fourth phase of prospective birth cohort of Ribeirão Preto, Brazil. BMD, total osteocalcin (OC), fasting plasma glucose and insulin concentrations were assessed. Insulin resistance (IR), sensitivity and secretion were estimated by HOMA1-IR, HOMA2-S and HOMA2- $\beta$  indexes. Multiple linear regression models were constructed to estimate the association between BMD and glucose metabolism. WC was tested as an effect modifier and OC as a confounder. The covariates were selected based on Direct Acyclic Graph.

**Results:** Significant interaction between BMD and WC on glucose metabolism was observed in the adjusted models ( $p < 0.1$ ). Subjects with increased WC presented a positive association between BMD and log HOMA1-IR while an inverse association was found in those with normal WC ( $p = 0.036$ ). BMD was negatively associated with log HOMA2-S in individuals with increased WC and positively in those with normal WC ( $p = 0.042$ ). No significant associations between BMD, log HOMA2- $\beta$  and OC and glucose metabolism markers were observed.

**Conclusions:** BMD was associated with glucose metabolism, independently of OC. WC modifies this association.

## Introduction

Insulin resistance (IR) is characterized by a reduction of the action of the hormone due to reduced sensitivity in target sites, such as muscle, adipose tissue and the liver, resulting in hyperglycemia. To maintain glucose homeostasis, the pancreas adapts through changes in the pancreatic  $\beta$ -cells, resulting in increased insulin secretion. However, exceeding the functional and adaptive capacity can result in the development of type 2 diabetes mellitus (DM2)(1).

Several factors, such as being overweight, age, sex, skin color and lifestyle (physical activity, smoking and alcohol)(2-4), may be involved in the etiology of IR. Obesity, and more specifically, visceral obesity, is associated with a chronic inflammatory response associated with the development of IR(1). In addition to these classic factors, Lee et al. (2007) detected the possible role of bone markers in IR in experimental models(5).

Bone mineral density (BMD) results of the remodeling process, i.e., the action of bone metabolism markers, which act by stimulating bone formation and reabsorption. The visceral adipose tissue is associated with the genesis of osteoclasts and therefore with increased bone reabsorption(6). Thus, this tissue can affect bone turnover and the concentration of bone turnover markers, such as osteocalcin (OC), a protein synthesized by osteoblasts during bone formation, which seems to be inversely associated with body fat(7). Recent investigations have studied the effects of bone turnover markers in glucose metabolism, adding evidence of the existence of a possible bone-pancreas endocrine axis(5, 8). In this context, OC seems to be positively associated with proliferation of pancreatic  $\beta$ -cells, insulin secretion and sensitivity and inversely associated with IR in experimental models. In humans, these associations remain controversial in the literature(5, 9, 10).

The association between bone and glucose metabolism is not well defined and few studies have sought to study BMD in this context. We expect an inverse association between BMD and IR in young adults with less deposition of visceral fat, which also appear to have a higher concentration of OC (7), and tested if this is dependent of OC. In individuals with increase of visceral fat deposition, we suspect that this association can be modified due to changes in bone metabolism. So we treat waist circumference as a modifying effect on the association between bone and glucose metabolism.

The objective of this study was to evaluate if BMD predicts alterations in glucose metabolism (IR, sensitivity and secretion), and assess the potential role of OC in this association.

## Methods

### Study design and participants

This cross-sectional study was developed with data collected in the fourth phase of the prospective cohort study of individuals born in Ribeirão Preto from the 1<sup>st</sup> of June 1978 to the 31<sup>st</sup> of

May, 1979. At baseline, information was obtained from 9,067 live newborns delivered in the maternity hospitals of Ribeirão Preto. Infants born to mothers who did not reside in the municipality (n=2,094) and twins (n=146) were excluded from the original study. The initial sample comprised 6,827 infants born to mothers residing in Ribeirão Preto.

In 2002, when the fourth cohort follow-up was conducted, 5,665 young adults (83% of original sample) between 23 and 25 years of age were identified as living in the city. Ribeirão Preto consists of 4 geo-economic regions. A sub sample was created from the original study, of which one of three individuals who lived in the same geo-economic area were invited to participate in this phase of the study, resulting in a total of 2,063 young adults (31.8% of birth cohort).

Of the 2,063 individuals included in fourth phase of the cohort, 513 agreed to undergo the BMD evaluation. Seventeen subjects were excluded due to the presence of a condition that would interfere with the clinical assessment or measures of bone metabolism (i.e., type 1 diabetes, asthmatics using corticosteroids, amaurosis, anorexia nervosa, scoliosis, urolithiasis and stroke). Additionally, for the multiple models, 26 subjects and 2 subjects were excluded because their total OC and markers of glucose metabolism (fasting glucose and insulin), respectively, were not measured. The final sample of the present study comprised 468 individuals (females=235) who underwent BMD, OC and HOMA [(homeostasis model assessment (HOMA), IR, insulin sensitivity (S), and  $\beta$ -cell function ( $\beta$ )] evaluations. More detailed information about this cohort can be obtained from previous publication(11).

### Measurements

A 40-mL blood sample was collected by a trained professional after 12-hour fasting period. All laboratory tests (fasting insulin and glucose and OC) were analyzed at the time of data collection. Fasting glucose and insulin were determined using commercial kits by GOD/PAP human diagnostic colorimetric enzymatic method (Chronolab AG, Zug, Switzerland) and radioimmunoassay (Insulin kit, DPC, Los Angeles, CA, USA), respectively. OC was determined using an immunoradiometric method (DSL-7600, IRMA, Webster, TX, USA).

IR was estimated using the original HOMA1-IR, calculated according to the formula: fasting plasma glucose (mmol/L) x fasting plasma insulin ( $\mu$ U/mL)/22.5(12). To estimate insulin sensitivity (HOMA2-S) and secretion (HOMA2-  $\beta$ ), we used the HOMA computer model (HOMA2 model), available from <https://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/>.

BMD ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) were obtained by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) using Hologic QDR-4500 (Waltham, MA, USA) equipment. Measurements of absolute precision error (and the percentage coefficient of variation) for BMD were  $0.007 \text{ g}/\text{cm}^2$  (0.66%),  $0.015 \text{ g}/\text{cm}^2$  (1.77%) and  $0.007 \text{ g}/\text{cm}^2$  (0.70%) for the three evaluated anatomic areas: the lumbar spine, femoral neck and total

proximal femur, respectively. The phantom coefficient of variation throughout the study was 0.38%. A standardized technician performed the quality control and analysis of all measurements. The analysis was performed in the nuclear medicine laboratory of the Clinics Hospital, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil.

The following socio-demographic and lifestyle variables were obtained through structured questionnaires administered during interviews: sex (male; female), age (23-25), self-classified skin color (white; mulatto/black/yellow), schooling ( $\leq 8$ ; 9-11 and  $\geq 12$  years of study) and smoking (smokers; non-smokers).

Physical activity was performed using the short version of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ), validated for the Brazilian population, and categorized according to the recommendations as low, moderate, or high activity(13).

Caloric intake (kcal/day) was estimated based on a food frequency questionnaire (FFQ), an adaptation of a validated questionnaire(14), administered in interviews by nutritionists and containing a list of 75 food items(15). The calculation for this measure was performed using Dietsys version 4.0 software (National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA). Alcohol consumption was estimated based on the FFQ, expressed as a percentage of total dietary energy per day.

Adult weight and height were obtained by a trained medical doctor and a nurse using standardized techniques(16). A mechanical scale (Filizola, São Paulo, Brazil) with an accuracy of 100 g and a freestanding wood stadiometer (University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil) with an accuracy of 0.1 cm were used. Body mass index (BMI) was categorized as  $< 25$  (underweight or normal weight), 25 to 29.9 (overweight) and  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$  (obesity)(17).

Waist circumference (WC) was measured by a D-loop non-stretch fiberglass tape as the smallest circumference between the ribs and the iliac crest while the subject stood with the abdomen relaxed at the end of a normal expiration(18). WC is a very practical and internationally used to evaluate the deposition of intra-abdominal fat (or visceral adipose tissue). Individuals with increased WC are at risk of adverse consequences of obesity. The individuals were classified as normal/ increased WC (women:  $< 80 \text{ cm}$ ;  $\geq 80 \text{ cm}$ ; men:  $< 94 \text{ cm}$ ;  $\geq 94 \text{ cm}$ ) according to cutoff points of WC proposed by the World Health Organization (WHO)(19).

### **Ethics**

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Clinics Hospital, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, in February 2000 (protocol no. 7606/99). All participants signed a term of consent, which was obtained freely and spontaneously, after all necessary clarifications had been provided.

## Statistical analyses

The subject characteristics are described using means (standard deviation) or medians (interquartile range) for continuous variables and proportions for categorical variables.

The study outcomes were described using medians and interquartile ranges stratified by categories of potentially associated factors. Continuous variables were categorized into tertiles, and comparisons between categories were performed using Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis tests. To evaluate the association between BMD and IR (HOMA1-IR) sensitivity (HOMA2-S) and secretion (HOMA2- $\beta$ ), multiple linear regression models were fitted for each outcome. For this analysis, HOMA1-IR, HOMA2-S and HOMA2- $\beta$  were log-transformed.

WC was tested as an effect modifier in multiple linear regression models considering that inflammation associated with visceral adipose tissue can affect bone metabolism markers, which may explain the association between BMD and IR. We constructed linear prediction plots of the associations between each anatomic bone area (spinal, femoral neck and proximal femur) and the outcomes, stratified by WC cutoff points (normal/ increased), in order to interpret the interactions.

The covariates were selected for inclusion in the final model based on a directed acyclic graph [(DAG, [www.dagitty.net](http://www.dagitty.net)), Supplemental Figure 1]. A DAG is a graphic model, also known as a causal diagram, in which potential confounding factors that can distort the causal inference process can be identified and included as covariates in adjusted models(20). DAGs can make more explicit the relationship between exposure and outcome and help avoid inappropriate adjustments.

OC concentration was included in the models as a confounder because of its association with both the exposure and the outcome(8, 21). We observed whether the association between BMD and glucose metabolism is dependent of OC or if there is an independent pathway linking BMD and IR.

In the multiple models, associations with p-value < 0.05 were considered significant, except in the evaluation of interactions, in which a p-value < 0.1 was considered significant(22). All analyses were performed using Stata Data Analysis and Statistical Software (STATA) version 12.0 (StataCorp) 2011. Stata Statistical Software: Release 12. College Station, TX: StataCorp LP).

## Results

We evaluated 468 (233 men and 235 women) adults. The study participants had a mean age of 23.5 (0.5) years, a mean BMI of 23.7 (4.2) kg/m<sup>2</sup> and a mean WC of 80.3 (11.4) cm. The majority of the sample is white (65%), had more than 8 years of schooling (88%), reported moderate or high physical activity (74%) and were non-smoking (85%). The mean calorie intake and alcohol consumption were 2,188.9 (713.4) kcal/day and 1.8% (2.3) of EI/day, respectively. The median and interquartile range of IR, insulin sensitivity and  $\beta$ -cell function were 1.1 (0.7:1.7), 136.6 (92.7:217.9)

and 98.1 (73.7:132.4), respectively. The mean OC concentration was 12.6 (5.1) ng/mL, and the BMD was 1.0 (0.1) g/cm<sup>2</sup> for the spinal anatomic area, 0.9 (0.2) g/cm<sup>2</sup> for the femoral neck and 1.0 (0.2) g/cm<sup>2</sup> for the proximal femur (**Table 1**).

A positive association between nutritional status markers (BMI and WC) and HOMA1-IR and HOMA2- $\beta$  and an inverse association with HOMA2-S was found. Individuals who reported low physical activity had higher median HOMA1-IR and HOMA2- $\beta$  values and lower HOMA2-S values than those reporting moderate or high levels of activity. The median HOMA1-IR and HOMA2- $\beta$  levels differed between the sexes, i.e., men presented with higher mean IR values and lower hormone secretion than women. Subjects classified in the 1<sup>st</sup>tertile of OC presented with significantly higher median levels of HOMA2- $\beta$  than those in the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> tertiles. The femoral neck and proximal femur BMD were inversely associated with insulin sensitivity and were positively associated with IR (**Table 2**).

We found a significant interaction between BMD and WC in the fully adjusted regression (model 2). We observed a positive association between BMD (of the femoral neck and proximal femur anatomic sites) and the log HOMA1-IR level in individuals with increased WC and an inverse association in those with normal WC. BMD (of the femoral neck and proximal femur anatomic sites) was negatively associated with the log HOMA2-S level in subjects with increased WC and positively associated in those with normal WC. We did not observe significant associations between BMD and the log HOMA2- $\beta$  level and OC and the log HOMA1-IR, HOMA2-S and HOMA2- $\beta$  levels (**Table 3 and Figures 1, 2 and 3**).

## Discussion

The present study has three main results. First, we found that BMD predict alterations in glucose metabolism in young adults. Second, we observed that the direction of the association differed according to WC classification, i.e., adults with increased WC had a positive association between BMD and IR, while those with normal WC had an inverse association between these two factors. The association between BMD and insulin sensitivity occurred in the opposite direction, i.e., we observed an inverse association in individuals with increased WC and a positive association in those with normal WC. Finally, we did not observe any significant association between OC and glucose metabolism in the adjusted models.

This study has some potential limitations. Although we used a large sample size from a birth cohort, only 24.9% (n=513/2,063) of the individuals evaluated in the fourth phase of the birth cohort follow-up consented to undergo DXA assessments, and after exclusions, the final sample comprised 468 subjects who had valid BMD measurements. Additionally, this study was based on a cross-

sectional analysis, a study design that cannot determine whether the results are merely associations or if BMD exerts a causal effect on glucose metabolism in these young adults. Finally, although in experimental studies OC uncarboxylated has been reported to be the metabolically active form(5, 8), we did not differentiate plasma OC by gamma-carboxylation status, and our assessment included all forms of OC. The strength of this study is the number of young adults evaluated by DXA, a very accurate procedure for measuring bone density. Moreover, our statistical analysis included multiple regression models, while most studies of OC use correlation tests(7). In the multivariate analysis, we evaluated the inclusion of co-variables based on a DAG that allows for the minimization of bias in epidemiological studies. DAGs allows the identification of the minimum sufficient adjustment to estimate the total and direct effect of a certain exposure on the studied outcome(20). To the best of our knowledge, this is only the second study that has evaluated if BMD, assessed by a gold standard measure (DXA), predict alterations in glucose metabolism (IR, sensitivity and secretion) in young adults. Most studies have assessed the association between markers of bone turnover (such as OC) and glucose metabolism.

This study provides new information about the association between bone and glucose metabolism. We found a significant association between BMD and IR and insulin sensitivity and a significant interaction between BMD and WC, in which the association between BMD and the log HOMA1-IR and log HOMA2-S levels were different according to cut-off points of WC. Pirila et al. (2014) study the association between BMD and glucose metabolism, and they found a non-significant association in the unadjusted model, which persisted after adjusting the analysis for sex, fat mass and lifestyle factors, such as smoking, alcohol consumption and physical activity, in 155 healthy young adults(23). Although Pirila et al. (2014) considered fat mass as a confounder, the adipose tissue was not tested as an effect modifier in the association between bone and glucose metabolism, as done in our study.

It is known that body fat, particularly visceral fat, may affect bone metabolism markers and BMD. Chronic low-grade inflammation associated with visceral fat is related to the genesis of osteoclasts, increased bone resorption and decreased OC concentration (6, 7). Individuals with obesity present increased risk of fractures (24) possibly associated with metabolic dysfunction that result in reduction of bone turnover and bone quality.(25). Therefore, considering the effects of inflammation on bone turnover and mass, our conceptual framework considers that WC plays an important role in the association between BMD and IR. We have hypothesized that WC acts as an effect modifier and not as a confounder, and for this reason, this marker of visceral fat deposition was not included in the DAG that depicted the theoretical relationship between all involved



variables. Inflammation is associated with visceral fat, and increasing concentrations of pro-inflammatory cytokines precede IR alterations(1), not the other way around.

OC is one of the most studied bone biomarkers in the association with glucose metabolism, and this association has been extensively studied in the last decade(5, 26). We did not find a significant association between OC concentrations and HOMA1-IR or HOMA2-S in either the crude or adjusted analysis. Animal studies, however, have demonstrated the positive effect of OC on insulin secretion and the sensitivity and proliferation of pancreatic  $\beta$ -cells(5, 27). To exert these effects, OC binds to its receptor GPCR6a in pancreatic  $\beta$ -cells and can also increase the expression of anti-inflammatory adipokines and reduce the secretion of pro-inflammatory cytokines(8). In humans, the findings remain controversial. In line with our results, Polgreen et al. (2012) evaluated a sample of 137 young adults (18.6 years) and found no association between OC and HOMA1-IR(28). In addition, other studies found no association between OC and HOMA1-IR, HOMA2- $\beta$ , QUICKI insulin sensitivity marker, blood glucose and insulin in pre- and post-menopausal women(9, 29). On the other hand, some studies have found an inverse association between OC and IR and a positive association between OC and insulin sensitivity and secretion(7, 26, 30). The differences between these studies and ours may be explained by the fact that we studied young adults while the others studies investigated older people (approximately 50 years of age), which tend to have higher IR. Moreover, we also found methodological differences as most studies used only correlation statistical procedures(7, 26), and only one study performed adjusted regression models like ours(30). Unlike our study, none of the published articles evaluated the selection of covariates with a DAG model. Finally, we expected that the addition of OC in the regression model could explain the association between BMD and IR, especially in individuals with normal WC, however, we observed that associations between bone and glucose metabolism are independent of this bone metabolism marker (because the inclusion of OC in the regression model did not affect the association between BMD and glucose metabolism). We suggest that further studies be performed to investigate the action of other biomarkers that can justify this relationship.

Some studies have demonstrated that osteoprotegerin (OPG), that promotes bone formation, appears to be increased in metabolic disorders, such as obesity(31) and was positively associated with IR, evaluated by HOMA1-IR (32). Additionally, Gannagé-Yared et al. (2008) evaluated individuals with and without obesity and identified a positive association between OPG and HOMA1-IR only in subjects with obesity (33). OPG was also positively correlated with pro-inflammatory markers such as C-reactive protein and tumor necrosis factor- $\alpha$ (32, 34) and the infusion of OPG in animals increased inflammation in adipose tissue(34). This association of OPG with inflammation may explain its association with IR. In addition to OPG, the amino terminal

propeptide of procollagen type 1 (P1NP), a marker of bone formation as OC, was also positively associated with HOMA1-IR in young women with overweight or obesity (10). Because of its positive effect on bone mass and IR, we suggest that OPG and P1NP are bone metabolism markers that may explain the different association found in patients with increased WC, i.e., the positive association between BMD and HOMA1-IR observed in our study.

It is recognized that IR is involved in the pathophysiology of DM2, a global public health problem(35). The association between bone and IR suggests the existence of bone-pancreas axis. However, the exact mechanism that links bone mass and glucose metabolism is not fully understood, and this study sought to contribute evidence to clarify this relation. We believe that a better understanding of this association can contribute to improve IR. Corroborating this statement, other studies have been developed with the aim of modulating pharmacologically bone metabolism markers to improve glycemic control(36). Additionally, disorders associated with IR, such as obesity, seem related to reduced bone quality and formation and increased bone fracture risk(24, 25). Thus, the investigation of the relationship between bone and glucose metabolism may not only contribute to the glycemic control but also to bone fragility prevention.

Moreover, as expected, we found that subjects with obesity and those with increased WC present higher IR and secretion and lower insulin sensitivity. As described by Clausen et al. (1996), an inverse association between obesity and insulin sensitivity is accepted longstanding(37). The inflammation associated with adipose tissue plays an important, well acknowledged role in the development of IR(1). Greater insulin secretion was found in these individuals, which characterizes the pancreatic response in compensation of IR, leading to hyperinsulinemia in this population(1).

It is known that the increased secretion of adiponectin and the positive effect of estrogen on glucose homeostasis contributes to the lower IR observed in women compared to men(38), as found in our results. In addition, we found that men had a higher mean BMI and WC compared to women (data not shown), which may also explain the higher rate of IR in this group.

## **Conclusion**

We conclude that BMD was associated with glucose metabolism and that this association is independent of OC. We also found that the WC modifies the association between bones and IR and sensitivity. These results indicate that BMD may play a role in the metabolic profile of IR and obesity. However, further studies are needed to assess the direction of the association between BMD and IR and to test the possible mechanisms involved in this relationship.

## References

- 1.Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444(7121):840-6.
- 2.Lee JM, Okumura MJ, Davis MM, Herman WH, Gurney JG. Prevalence and determinants of insulin resistance among U.S. adolescents: a population-based study. *Diabetes Care*. 2006;29(11):2427-32.
- 3.Willi C, Bodenmann P, Ghali WA, Faris PD, Cornuz J. Active smoking and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2007;298(22):2654-64.
- 4.Kim JY, Lee DY, Lee YJ, Park KJ, Kim KH, Kim JW, et al. Chronic alcohol consumption potentiates the development of diabetes through pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction. *World J Biol Chem*. 2015;6(1):1-15.
- 5.Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*. 2007;130(3):456-69.
- 6.Aguirre L, Napoli N, Waters D, Qualls C, Villareal DT, Armamento-Villareal R. Increasing adiposity is associated with higher adipokine levels and lower bone mineral density in obese older adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(9):3290-7.
- 7.Bao Y, Ma X, Yang R, Wang F, Hao Y, Dou J, et al. Inverse relationship between serum osteocalcin levels and visceral fat area in Chinese men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(1):345-51.
- 8.Ferron M, Lacombe J. Regulation of energy metabolism by the skeleton: osteocalcin and beyond. *Arch Biochem Biophys*. 2014;561:137-46.
- 9.Lu C, Ivaska KK, Alen M, Wang Q, Törmäkangas T, Xu L, et al. Serum osteocalcin is not associated with glucose but is inversely associated with leptin across generations of nondiabetic women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(11):4106-14.
- 10.Lucey AJ, Paschos GK, Thorsdottir I, Martínéz JA, Cashman KD, Kiely M. Young overweight and obese women with lower circulating osteocalcin concentrations exhibit higher insulin resistance and concentrations of C-reactive protein. *Nutr Res*. 2013;33(1):67-75.
- 11.Barbieri MA, Bettiol H, Silva AA, Cardoso VC, Simões VM, Gutierrez MR, et al. Health in early adulthood: the contribution of the 1978/79 Ribeirão Preto birth cohort. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39(8):1041-55.
- 12.Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28(7):412-9.
- 13.Craig CL, Marshall AL, Sjöström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Med Sci Sports Exerc*. 2003;35(8):1381-95.
- 14.Cardoso MA, Stocco PR. [Development of a quantitative questionnaire of food intake in japanese immigrants and their descendants residents in Sao Paulo, Brazil]. *Cad Saude Publica*. 2000;16(1):107-14.
- 15.Ribeiro AB, MA C. Construção de um questionário de frequência alimentar como subsídio para programas de prevenção de doenças crônicas não transmissíveis. 2002;15:239-45.
- 16.Tanner JM. Normal growth and techniques of growth assessment. *Clin Endocrinol Metab*. 1986;15(3):411-51.
- 17.World Health Organization. WHO. Physical Status: The Use and Interpretation of Anthropometry. Geneva: Technical Report Series 854; 1995.
- 18.Lohman T, Roche A, Martorell R. Anthropometric Standardization Reference Manual. Human Kinetics Books, Champaign III. 1988:177.
- 19.World Health Organization. WHO. Obesity: prevention and managing the global epidemic. Geneva: Report of the WHO Consultation on Obesity; 1998.
- 20.Textor J, Hardt J, Knüppel S. DAGitty: a graphical tool for analyzing causal diagrams. *Epidemiology*. 2011;22(5):745.

21. Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev.* 1989;69(3):990-1047.
22. Twisk J. *Applied Multilevel Analysis: A Practical Guide.* United Kingdom. United Kingdom: Cambridge Univ. Press; 2006.
23. Pirilä S, Taskinen M, Turanlahti M, Kajosaari M, Mäkitie O, Saarinen-Pihkala UM, et al. Bone health and risk factors of cardiovascular disease--a cross-sectional study in healthy young adults. *PLoS One.* 2014;9(10):e108040.
24. Nielson CM, Marshall LM, Adams AL, LeBlanc ES, Cawthon PM, Ensrud K, et al. BMI and fracture risk in older men: the osteoporotic fractures in men study (MrOS). *J Bone Miner Res.* 2011;26(3):496-502.
25. Lecka-Czernik B, Stechschulte LA, Czernik PJ, Dowling AR. High bone mass in adult mice with diet-induced obesity results from a combination of initial increase in bone mass followed by attenuation in bone formation; implications for high bone mass and decreased bone quality in obesity. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;410:35-41.
26. Jung KY, Kim KM, Ku EJ, Kim YJ, Lee DH, Choi SH, et al. Age- and sex-specific association of circulating osteocalcin with dynamic measures of glucose homeostasis. *Osteoporos Int.* 2016;27(3):1021-9.
27. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(13):5266-70.
28. Polgreen LE, Jacobs DR, Nathan BM, Steinberger J, Moran A, Sinaiko AR. Association of osteocalcin with obesity, insulin resistance, and cardiovascular risk factors in young adults. *Obesity (Silver Spring).* 2012;20(11):2194-201.
29. Caglar GS, Ozdemir ED, Kiseli M, Demirtas S, Cengiz SD. The association of osteocalcin and adiponectin with glucose metabolism in nondiabetic postmenopausal women. *Gynecol Obstet Invest.* 2014;77(4):255-60.
30. Gravenstein KS, Napora JK, Short RG, Ramachandran R, Carlson OD, Metter EJ, et al. Cross-sectional evidence of a signaling pathway from bone homeostasis to glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(6):E884-90.
31. Suliburska J, Bogdanski P, Gajewska E, Kalmus G, Sobieska M, Samborski W. The association of insulin resistance with serum osteoprotegerin in obese adolescents. *J Physiol Biochem.* 2013;69(4):847-53.
32. Yaturu S, Rains J, Jain SK. Relationship of elevated osteoprotegerin with insulin resistance, CRP, and TNF-alpha levels in men with type 2 diabetes. *Cytokine.* 2008;44(1):168-71.
33. Gannagé-Yared MH, Yaghi C, Habre B, Khalife S, Noun R, Germanos-Haddad M, et al. Osteoprotegerin in relation to body weight, lipid parameters insulin sensitivity, adipocytokines, and C-reactive protein in obese and non-obese young individuals: results from both cross-sectional and interventional study. *Eur J Endocrinol.* 2008;158(3):353-9.
34. Bernardi S, Fabris B, Thomas M, Toffoli B, Tikellis C, Candido R, et al. Osteoprotegerin increases in metabolic syndrome and promotes adipose tissue proinflammatory changes. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;394(1-2):13-20.
35. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004;27(5):1047-53.
36. D'Amelio P, Sassi F, Buondonno I, Spertino E, Tamone C, Piano S, et al. Effect of intermittent PTH treatment on plasma glucose in osteoporosis: A randomized trial. *Bone.* 2015;76:177-84.
37. Clausen JO, Borch-Johnsen K, Ibsen H, Bergman RN, Hougaard P, Winther K, et al. Insulin sensitivity index, acute insulin response, and glucose effectiveness in a population-based sample of 380 young healthy Caucasians. Analysis of the impact of gender, body fat, physical fitness, and lifestyle factors. *J Clin Invest.* 1996;98(5):1195-209.
38. Geer EB, Shen W. Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gend Med.* 2009;6 Suppl 1:60-75.

## Tables

**Table 1.** Descriptive characteristics of a young adults sample, 2002-2004 Ribeirão Preto cohort, Brazil, fourth follow-up.

Characteristics	n= 468
Age (years)	23.5 (0.5)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.7 (4.2)
WC (cm)	80.3 (11.4)
Sex	
Women	235 (50)
Men	233 (50)
Skin color	
White	304 (65)
Black/mullato/yellow	164 (35)
Schooling (years)	
≤ 8	58 (12)
9-11	262 (56)
≥12	148 (32)
Energy intake (kcal/day)	2188.9 (713.4)
Alcohol consumption (% of EI/day)	1.8 (2.3)
Physical activity	
Low	121 (26)
Moderate	200 (43)
High	147 (31)
Smoking	
Yes	68 (15)
No	400 (85)
HOMA1-IR	1.1 (0.7:1.7)
HOMA2-S	136.6 (92.7:217.9)
HOMA2-β	98.1 (73.7:132.4)
Osteocalcin (ng/mL)	12.6 (5.1)
BMD Spinal (g/cm <sup>2</sup> )	1.0 (0.1)
BMD Femoral neck (g/cm <sup>2</sup> )	0.9 (0.2)
BMD Proximal femur (g/cm <sup>2</sup> )	1.0 (0.2)

**Notes:** Continuous variables are expressed as mean (standard deviation) or median (interquartile range). Categorical variables are expressed as absolute and relative frequency. For EI variable, we had 1 exclusion due to high calorie value (>6000 kcal/day).

**Abbreviations:** BMI = body mass index; WC = waist circumference; EI = energy intake; HOMA = homeostatic model assessment; HOMA1-IR = insulin resistance; HOMA2-S = insulin sensitivity; HOMA2-β = β-cell function (insulin secretion); BMD = bone mineral density.

**Table 2.** Distribution of insulin resistance (**HOMA1-IR<sup>1</sup>**), insulin sensitivity (**HOMA2-S<sup>2</sup>**) and  $\beta$  cell function (**HOMA2- $\beta$ <sup>2</sup>**) in 468 young adults according to categories of selected variables, 2002-2004 Ribeirão Preto cohort, Brazil, fourth follow-up.

	n	HOMA1-IR	p <sup>1</sup>	HOMA2-S	p <sup>1</sup>	HOMA2- $\beta$	p <sup>1</sup>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )							
< 25	312	1.0 (0.6;1.4) <sup>a</sup>		157.9 (110.6;247.2) <sup>a</sup>		92.0 (70.2;122.2) <sup>a</sup>	
≥ 25-29.9	116	1.4 (0.9;1.9) <sup>b</sup>		116.3 (84.9;170.1) <sup>b</sup>		108.9 (77.9;139.5) <sup>b</sup>	
≥ 30	40	2.5 (1.5;3.3) <sup>c</sup>	<b>&lt;0.001</b>	68.9 (50.3;100.0) <sup>c</sup>	<b>&lt;0.001</b>	144.4 (109.8;182.0) <sup>c</sup>	<b>&lt;0.001</b>
WC <sup>2</sup>							
Normal	363	1.0 (0.6;1.5)		154.5 (108.0;242.7)		92.3 (70.5;122.0)	
Increased	105	1.8 (1.1;3.2)	<b>&lt;0.001</b>	88.9 (55.4;135.4)	<b>&lt;0.001</b>	129.4 (95.0;165.5)	<b>&lt;0.001</b>
Sex							
Women	235	1.1 (0.7;1.5)		140.2 (100.0;224.8)		104.3 (76.5;134.2)	
Men	233	1.3 (0.8-1.9)	<b>0.016</b>	131.5 (83.1;204.8)	0.105	92.4 (69.9;131.0)	<b>0.024</b>
Physical activity							
Low	121	1.3 (0.9;2.0) <sup>a</sup>		118.5 (80.9;174.7) <sup>a</sup>		111.8 (88.5;147.5) <sup>a</sup>	
Moderate	200	1.1 (0.7;1.6) <sup>b</sup>		136.7 (101.4;228.0) <sup>b</sup>		94.6 (72.8;126.3) <sup>b</sup>	
High	147	1.0 (0.6;1.7) <sup>b</sup>	<b>0.007</b>	152.1 (93.9;262.4) <sup>b</sup>	<b>0.002</b>	87.5 (67.0;125.8) <sup>b</sup>	<b>&lt;0.001</b>
Smoking							
No	400	1.1 (0.7;1.7)		136.0 (95.0;217.9)		98.7 (73.7;131.3)	
Yes	68	1.1 (0.7;1.9)	0.907	146.5 (82.5;214.1)	0.890	94.5 (69.9;147.9)	0.955
Skin color							
White	304	1.1 (0.7;1.6)		141.1 (97.8;223.9)		95.1 (72.4;129.3)	
Black/mullato/yellow	164	1.2 (0.8;2.0)	0.055	128.8 (81.2;194.3)	0.055	100.4 (74.9;141.5)	0.154
Schooling (years)							
≤ 8	58	1.2 (0.7;2.0)		117.6 (77.2;208.6)		104.9 (76.4;135.8)	
9-11	262	1.2 (0.7;1.7)		133.6 (90.2;211.9)		97.5 (72.9;131.7)	
≥12	148	1.1 (0.7;1.6)	0.177	151.2 (100.7;221.6)	0.117	95.6 (73.8;132.5)	0.349
Alcohol consumption (% of EI/day)							
1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> tertiles (0.0-2.1)	315	1.1 (0.7;1.7)		136.1 (93.9;217.5)		98.3 (74.8;134.0)	
3 <sup>rd</sup> tertile (2.2–12.1)	153	1.1 (0.7;1.7)	0.727	139.8 (89.6;218.4)	0.857	98.0 (69.1;130.2)	0.479
Energy intake (kcal/day)							
1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> tertiles (851.1-2377.6)	313	1.1 (0.7;1.6)		141.3 (96.6;211.9)		98.9 (73.8;134.2)	
3 <sup>rd</sup> tertile (2394.1-4940.7)	154	1.3 (0.7;1.8)	0.221	125.7 (88.5;219.1)	0.363	96.5 (72.1;131.0)	0.602
Osteocalcin (ng/mL)							
1 <sup>st</sup> tertile (2.9–9.6)	151	1.2 (0.8;1.9)		131.8 (83.5;197.6)		106.6 (78.5;144.6) <sup>a</sup>	
2 <sup>nd</sup> tertile (9.8–14.3)	161	1.1 (0.7;1.6)		139.8 (99.7;219.1)		93.8 (72.9;130.2) <sup>b</sup>	
3 <sup>rd</sup> tertile (14.4–32.9)	156	1.1 (0.6;1.7)	0.174	151.1 (95.0;238.6)	0.110	93.4 (68.6;120.7) <sup>b</sup>	<b>0.018</b>

BMD Spinal (g/cm <sup>2</sup> )							
1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> tertiles (0.7-1.1)	309	1.1 (0.7;1.6)		141.0 (97.2;224.3)		98.5 (73.1;130.2)	
3 <sup>rd</sup> tertile (1.1-1.4)	159	1.2 (0.7;1.8)	0.062	123.0 (85.4;200.0)	0.089	97.0 (74.5;134.6)	0.415
BMD Femoral neck (g/cm <sup>2</sup> )							
1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> tertiles (0.5-1.0)	310	1.1 (0.7;1.6)		140.6 (99.4;229.5)		99.9 (73.7;130.9)	
3 <sup>rd</sup> tertile (1.0-1.5)	158	1.3 (0.8;1.9)	<b>0.013</b>	125.7 (80.9;197.2)	<b>0.036</b>	95.3 (73.7;135.8)	0.864
BMD Proximal femur (g/cm <sup>2</sup> )							
1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> tertiles (0.6-1.0)	309	1.1 (0.7;1.5)		147.2 (100.0;229.5)		99.0 (73.7;129.3)	
3 <sup>rd</sup> tertile (1.0-1.5)	159	1.4 (0.9;2.3)	<b>&lt;0.001</b>	115.7 (75.0;180.8)	<b>0.002</b>	96.3 (73.7;141.4)	0.447

<sup>1</sup>p-value refers to Kruskal Wallis test and Mann-Whitney U test. Values with differing superscript letters (a, b, c) denote statistically significant differences across the categories.

<sup>2</sup>Categorized using World Health Organization cutoff points, normal WC: <80cm for women and <94 men; increased WC: ≥80 cm for women and ≥94 for men.

**Notes:** Data are expressed as median (interquartile range). For EI variable, we had 1 exclusion due to high calorie value (>6000 kcal/day).

**Abbreviations:** HOMA = homeostatic model assessment; HOMA1-IR = insulin resistance; HOMA2-S = insulin sensitivity; HOMA2-β = β-cell function (insulin secretion); BMI = body mass index; WC = waist circumference; EI = energy intake; BMD = bone mineral density.

**Table 3.** Linear regression between bone mineral density (BMD; g/cm<sup>2</sup>) and insulin resistance (**HOMA1-IR**<sup>1</sup>), insulin sensitivity (**HOMA2-S**<sup>2</sup>) and  $\beta$  cell function (**HOMA2- $\beta$** <sup>2</sup>) in 468 young adults, 2002-2004 Ribeirão Preto cohort, Brazil, fourth follow-up.

	<b>HOMA1-IR</b>				<b>HOMA2-S</b>				<b>HOMA2-<math>\beta</math></b>			
	<b>Model 1</b>		<b>Model 2</b>		<b>Model 1</b>		<b>Model 2</b>		<b>Model 1</b>		<b>Model 2</b>	
	$\beta^1$ (95% CI)	$p^2$	$\beta^1$ (95% CI)	$p^2$	$\beta^1$ (95% CI)	$p^2$	$\beta^1$ (95% CI)	$p^2$	$\beta^1$ (95% CI)	$p^2$	$\beta^1$ (95% CI)	$p^2$
<b>BMD - Spinal</b>												
Spinal (g/cm <sup>2</sup> )	-0.2 (-0.8;0.4)	0.510	-0.5 (-1.1;0.1)	0.133	0.2 (-0.3;0.8)	0.432	0.4 (-0.2;1.0)	0.160	-0.2 (-0.6;0.1)	0.196	-0.2 (-0.5;0.2)	0.424
WC (normal/increased) <sup>3</sup>	-0.0 (-1.4;1.3)	0.936	-0.2 (-1.6;1.2)	0.763	0.1 (-1.2;1.4)	0.885	0.2 (-1.1;1.5)	0.760	-0.1 (-1.0;0.7)	0.735	-0.1 (-1.0;0.8)	0.836
<i>Interaction term</i>												
Spinal#WC	0.6 (-0.7;1.9)	0.344	0.8 (-0.5;2.0)	0.246	-0.6 (-1.8;0.6)	0.324	-0.7 (-1.9;0.5)	0.256	0.4 (-0.4;1.2)	0.322	0.3 (-0.5;1.2)	0.401
Osteocalcin (ng/mL)	-0.0 (-0.0;0.0)	0.230	-0.0 (-0.0;0.0)	0.114	0.0 (-0.0;0.0)	0.189	0.0 (-0.0;0.0)	0.139	-0.0 (-0.0;0.0)	0.079	-0.0 (-0.0;0.0)	0.364
<b>BMD - Femoral neck (FN)</b>												
FN (g/cm <sup>2</sup> )	-0.1 (-0.6;0.3)	0.553	-0.5 (-1.0;0.0)	0.052	0.2 (-0.2;0.6)	0.385	0.5 (-0.0;1.0)	0.066	-0.3 (-0.6;-0.0)	<b>0.038</b>	-0.2 (-0.5;0.1)	0.245
WC (normal/increased) <sup>3</sup>	-0.4 (-1.3;0.5)	0.395	-0.3 (-1.3;0.5)	0.440	0.4 (-0.5;1.3)	0.383	0.3 (-0.5;1.2)	0.457	-0.2 (-0.8;0.3)	0.392	-0.1 (-0.7;0.4)	0.606
<i>Interaction term</i>												
FN#WC	1.0 (0.1;1.9)	<b>0.032</b>	1.0 (0.1;1.9)	<b>0.036</b>	-1.0 (-1.9;-0.1)	<b>0.033</b>	-0.9 (-1.8;-0.0)	<b>0.042</b>	0.6 (-0.0;1.2)	<b>0.061</b>	0.4 (-0.1;1.0)	0.135
Osteocalcin (ng/mL)	-0.0 (-0.0;0.0)	0.269	-0.0 (-0.0;0.0)	0.119	0.0 (-0.0;0.0)	0.228	0.0 (-0.0;0.0)	0.144	-0.0 (-0.0;0.0)	0.110	-0.0 (-0.0;0.0)	0.378
<b>BMD - Proximal femur (PF)</b>												
PF (g/cm <sup>2</sup> )	-0.1 (-0.5;0.4)	0.799	-0.5 (-1.0;0.0)	0.080	0.1 (-0.3;0.5)	0.571	0.4 (-0.1;0.9)	0.098	-0.3 (-0.6;-0.0)	<b>0.047</b>	-0.2 (-0.5;0.2)	0.307
WC (normal/increased) <sup>3</sup>	-0.2 (-1.2;0.7)	0.617	-0.2 (-1.2;0.7)	0.638	0.2 (-0.7;1.2)	0.605	0.2 (-0.7;1.1)	0.647	-0.2 (-0.8;0.4)	0.591	-0.1 (-0.7;0.5)	0.726
<i>Interaction term</i>												
PF#WC	0.8 (-0.1;1.7)	<b>0.090</b>	0.8 (-0.1;1.7)	<b>0.086</b>	-0.8 (-1.6; 0.1)	<b>0.091</b>	-0.7 (-1.6;0.1)	<b>0.097</b>	0.4 (-0.1;1.0)	0.137	0.4 (-0.2;1.0)	0.205
Osteocalcin (ng/mL)	-0.0 (-0.0; 0.0)	0.248	-0.0 (-0.0;0.0)	0.113	0.0 (-0.0;0.0)	0.212	0.0 (-0.0;0.0)	0.138	-0.0 (-0.0;0.0)	0.106	-0.0 (-0.0;0.0)	0.373

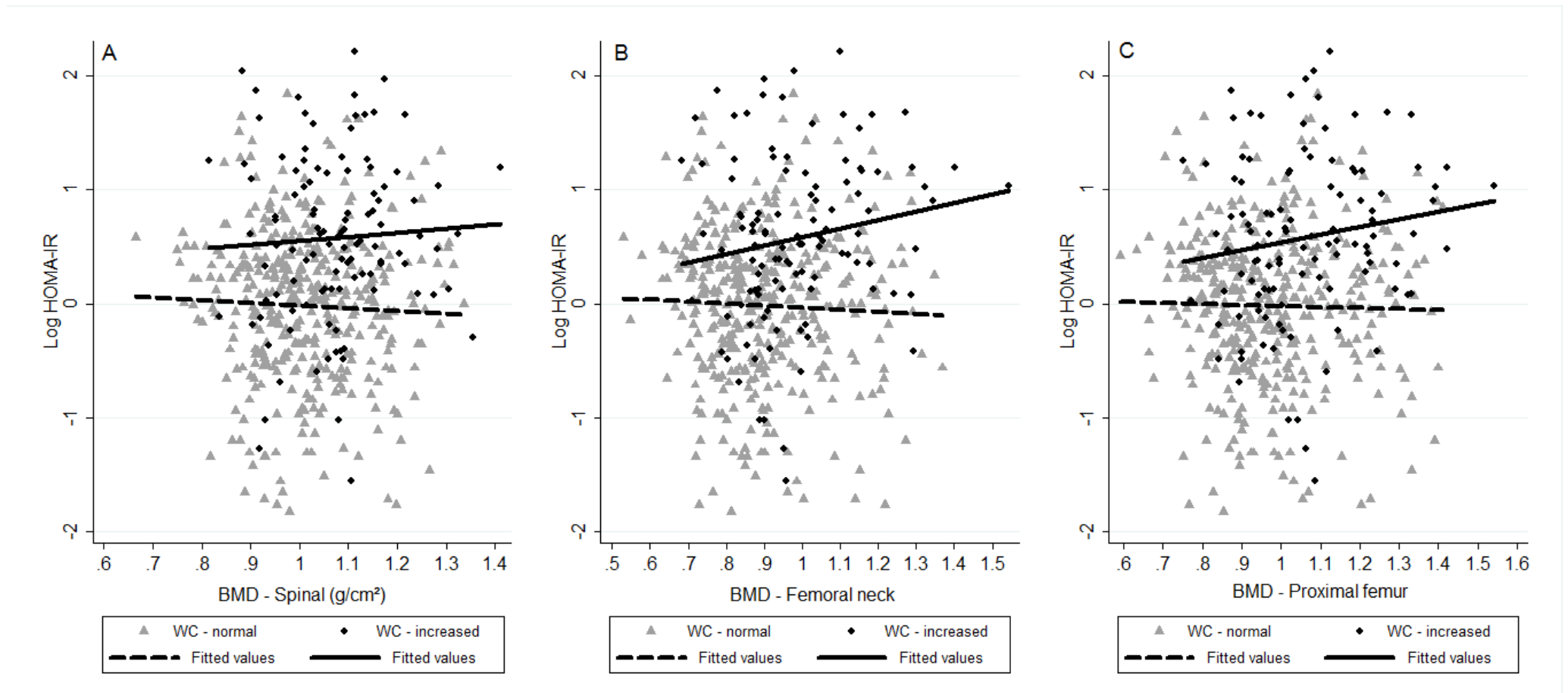
<sup>1</sup>Linear regression coefficient; <sup>2</sup>p-value refers to linear regression.

<sup>3</sup>Categorized using World Health Organization cutoff points, normal WC: <80cm for women and < 94 men; increased WC:  $\geq$ 80 cm for women and  $\geq$ 94 for men.

**Notes:** Model 1 was adjusted only for osteocalcin and the interaction between BMD and WC, Model 2 was further adjusted for physical activity, smoking, alcohol intake, sex, age and skin color.

**Abbreviations:** CI = confidence interval; HOMA = homeostatic model assessment; HOMA1-IR = insulin resistance; HOMA2-S = insulin sensitivity; HOMA2- $\beta$  =  $\beta$ -cell function (insulin secretion); WC = waist circumference; BMD = bone mineral density.



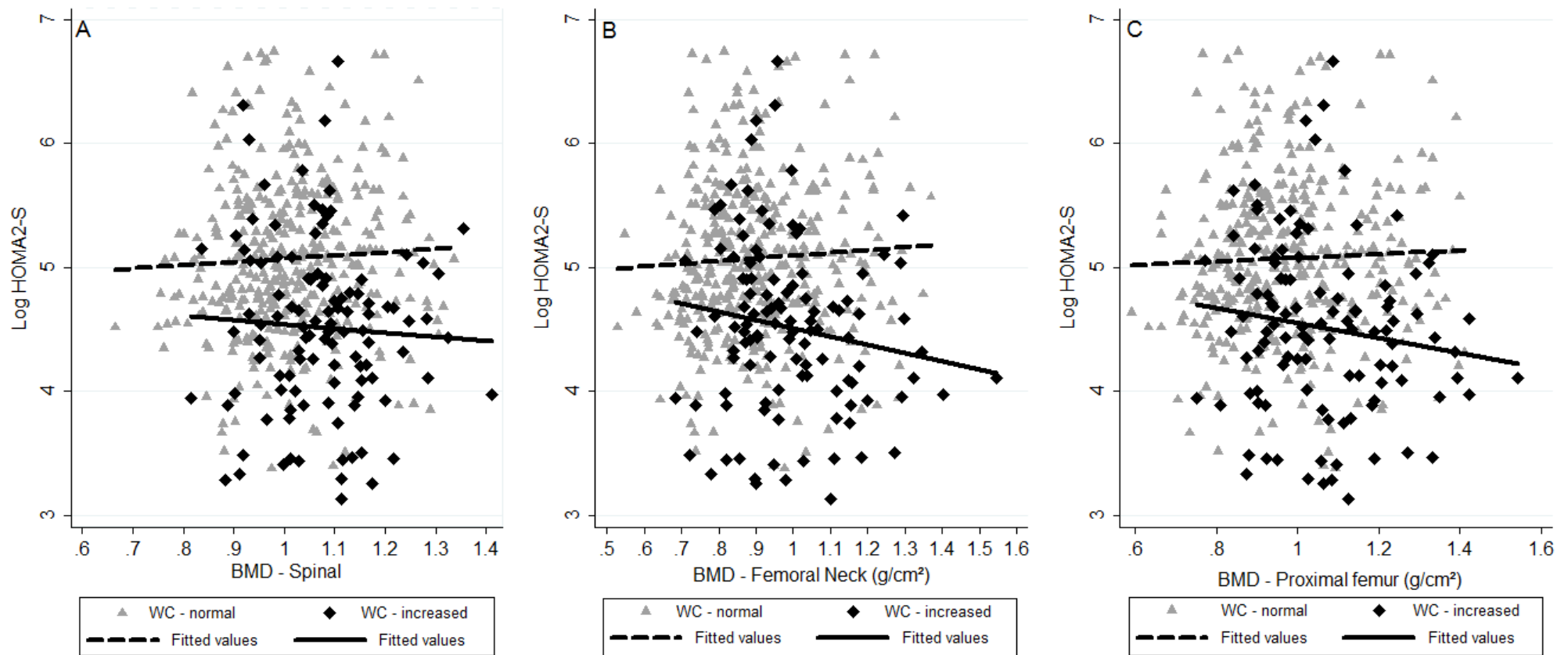


**Figure 1.** Scatter and linear prediction between BMD and Log HOMA1-IR according to WC in 468 young adults, 2002-2004 Ribeirão Preto, Brazil, fourth cohort.

**A)** Spinal BMD. **B)** Femoral neck BMD. **C)** Proximal femur BMD.

**Abbreviations:** HOMA1-IR = homeostatic model assessment - insulin resistance; WC = waist circumference; BMD = bone mineral density.

**Note:** Fitted values were predicted using linear regression models; WC was categorized using World Health Organization cutoff points, normal WC: <80cm for women and <94 men; increased WC:  $\geq 80$  cm for women and  $\geq 94$  cm for men.

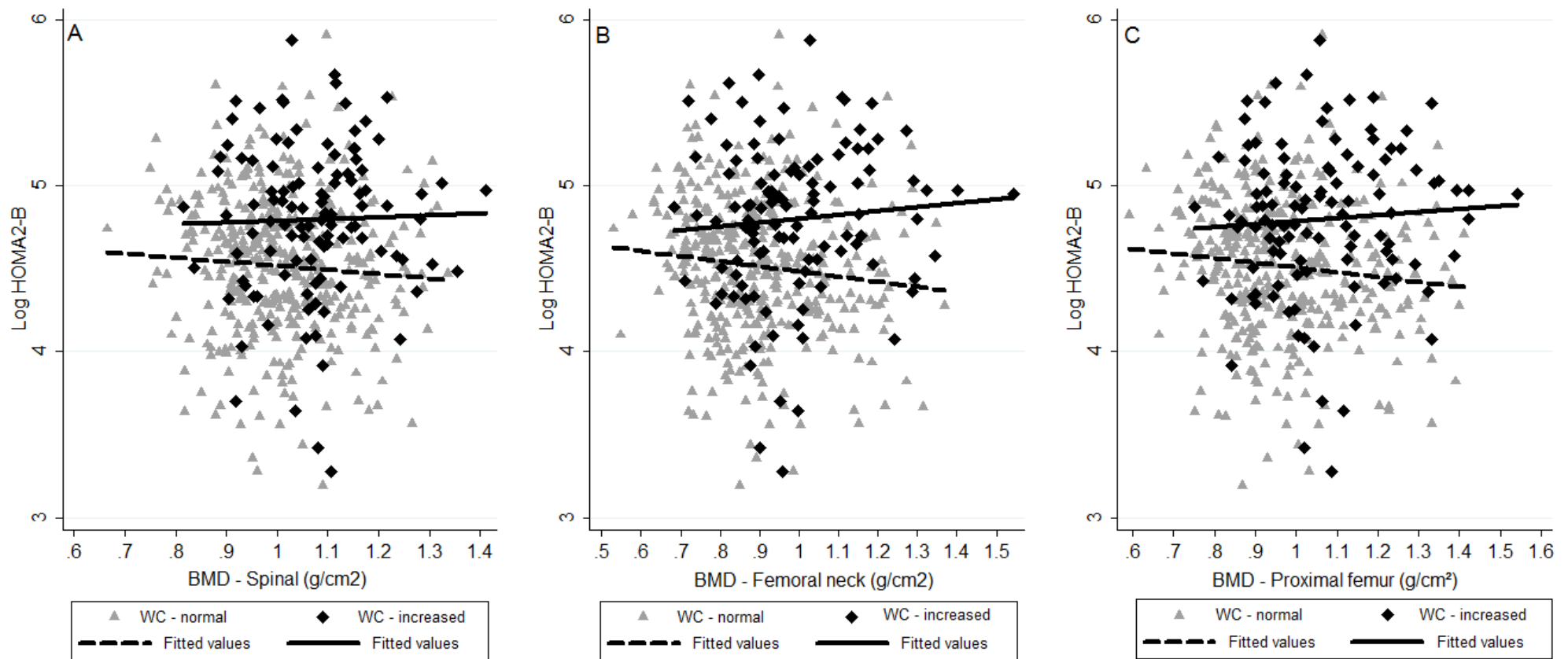


**Figure 2.** Scatter and linear prediction between BMD and Log HOMA2-S according to WC in 468 young adults, 2002-2004 Ribeirão Preto, Brazil, fourth cohort.

A) Spinal BMD. B) Femoral neck BMD. C) Proximal femur BMD.

**Abbreviations:** HOMA2-S = homeostatic model assessment - insulin sensitivity; WC = waist circumference; BMD = bone mineral density.

**Note:** Fitted values were predicted using linear regression models; WC was categorized using World Health Organization cutoff points, normal WC: <80cm for women and <94 men; increased WC:  $\geq 80$  cm for women and  $\geq 94$  cm for men.



**Figure 3.** Scatter and linear prediction between BMD and Log HOMA2- $\beta$  according to WC in 468 young adults, 2002-2004 Ribeirão Preto, Brazil, fourth cohort.

A) Spinal BMD. B) Femoral neck BMD. C) Proximal femur BMD.

**Abbreviations:** HOMA2- $\beta$  = homeostatic model assessment -  $\beta$ -cell function; WC = waist circumference; BMD = bone mineral density.

**Note:** Fitted values were predicted using linear regression models; WC was categorized using World Health Organization cutoff points, normal WC: <80cm for women and <94 men; increased WC:  $\geq$ 80 cm for women and  $\geq$ 94 cm for men.

## 7. Conclusão:

Na amostra estudada observamos que a hiperadiposidade visceral pode modificar a associação entre a DMO e os marcadores de resistência e sensibilidade à insulina. Em adultos jovens com PC aumentado, foi encontrada associação positiva entre a DMO e a RI, enquanto aqueles com PC normal apresentaram associação inversa. Em contrapartida, quanto à sensibilidade à insulina, verificou-se associação inversa da DMO com este parâmetro em indivíduos com PC aumentado e positiva naqueles com PC normal. Em relação à secreção de insulina, não foi observada associação significativa entre a DMO e este marcador.

Ao contrário do esperado, não foi observada associação significativa entre OC e o metabolismo de glicose, indicando que a associação entre DMO e os marcadores de resistência e sensibilidade à insulina são independentes da concentração sérica de OC. Neste contexto, salientamos que o enfoque do estudo é epidemiológico e, portanto, sugerimos que outros marcadores ósseos possam ser avaliados na tentativa de elucidar a via metabólica que justifique a associação verificada entre DMO e o metabolismo de glicose.

Ademais, consideramos que nossos resultados são inovadores, uma vez que segundo nossa pesquisa, este é o primeiro estudo que se propôs a avaliar a associação entre DMO e a resistência, sensibilidade e secreção de insulina, testando o perímetro da cintura como fator modificador de efeito. Os resultados da presente dissertação fornecem novas evidências sobre a associação entre o osso e o metabolismo de glicose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, L. et al. Increasing adiposity is associated with higher adipokine levels and lower bone mineral density in obese older adults. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 99, n. 9, p. 3290-3297, 2014.
- AMADEI, S. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006.
- ARAÚJO, L. Deficiência de vitamina D em obesos e cirurgia bariátrica. **Evidências em obesidade-ABESO**, v. 61, p. 8-10, 2013.
- ARMSTRONG, M. E. et al. Different effects of age, adiposity and physical activity on the risk of ankle, wrist and hip fractures in postmenopausal women. **Bone**, v. 50, n. 6, p. 1394-1400, 2012.
- BAO, Y. et al. Inverse relationship between serum osteocalcin levels and visceral fat area in Chinese men. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, n. 1, p. 345-351, 2013.
- BARBIERI, M. A. et al. Health in early adulthood: the contribution of the 1978/79 Ribeirão Preto birth cohort. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 8, p. 1041-1055, 2006.
- BASTARD, J. P. et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **Eur Cytokine Netw**, v. 17, n. 1, p. 4-12, 2006.
- BERNARDI, S. et al. Osteoprotegerin increases in metabolic syndrome and promotes adipose tissue proinflammatory changes. **Mol Cell Endocrinol**, v. 394, n. 1-2, p. 13-20, 2014.
- BHUPATHIRAJU, S. N. et al. Centrally located body fat is associated with lower bone mineral density in older Puerto Rican adults. **Am J Clin Nutr**, v. 94, n. 4, p. 1063-1070, 2011.
- BIELEMANN, R. M.; MARTINEZ-MESA, J.; GIGANTE, D. P. Physical activity during life course and bone mass: a systematic review of methods and findings from cohort studies with young adults. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 14, p. 77-92, 2013.
- BIVER, E. et al. Influence of adipokines and ghrelin on bone mineral density and fracture risk: a systematic review and meta-analysis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 9, p. 2703-2713, 2011.
- BOOTH, S. L. et al. The role of osteocalcin in human glucose metabolism: marker or mediator? **Nat Rev Endocrinol**, v. 9, n. 1, p. 43-55, 2013.
- BRITO, I.; LOPES, A.; ARAÚJO, L. Associação da cor da pele com diabetes mellitus tipo 2 e intolerância à glicose em mulheres obesas de Salvador, Bahia. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**, v. 45, n. 5, p. 475-480, 2001.
- CAGLAR, G. S. et al. The association of osteocalcin and adiponectin with glucose metabolism in nondiabetic postmenopausal women. **Gynecol Obstet Invest**, v. 77, n. 4, p. 255-260, 2014.
- CALLEWAERT, F.; BOONEN, S.; VANDERSCHUEREN, D. Sex steroids and the male skeleton: a tale of two hormones. **Trends Endocrinol Metab**, v. 21, n. 2, p. 89-95, 2010.
- CARDOSO, M. A.; STOCCO, P. R. Development of a quantitative questionnaire of food intake in Japanese immigrants and their descendants residents in Sao Paulo, Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 16, n. 1, p. 107-114, 2000.
- CAVALHEIRA J.B.C; ZECCHIN H.G; SAAD M.J.A. Vias de sinalização da insulina. **Arq. Bras. Endocrinologia Metab.**, v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.
- CEDDIA, R. B. et al. Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. **FASEB J**, v. 16, n. 10, p. 1163-1176, 2002.
- CHEN, J. et al. Ethanol impairs estrogen receptor signaling resulting in accelerated activation of senescence pathways, whereas estradiol attenuates the effect of ethanol in osteoblasts. **J of Bone and Mineral Research**, v. 24, n. 2, p. 221-230, 2009.

- CHEN, X. et al. Osteocalcin is inversely associated with glucose levels in middle-aged Tibetan men with different degrees of glucose tolerance. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 30, n. 6, p. 476-482, 2014.
- CHEN, X. X.; YANG, T. Roles of leptin in bone metabolism and bone diseases. **J Bone Miner Metab**, v. 33, n. 5, p. 474-485, 2015.
- CLAUSEN, J. O. et al. Insulin sensitivity index, acute insulin response, and glucose effectiveness in a population-based sample of 380 young healthy Caucasians. Analysis of the impact of gender, body fat, physical fitness, and life-style factors. **J Clin Invest**, v. 98, n. 5, p. 1195-1209, 1996.
- COHEN, A. et al. Abdominal fat is associated with lower bone formation and inferior bone quality in healthy premenopausal women: a transiliac bone biopsy study. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, n. 6, p. 2562-2572, 2013.
- CRAIG, C. L. et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. **Med Sci Sports Exerc**, v. 35, n. 8, p. 1381-1395, 2003.
- CSALA, M. [Hyper-free fatty acidemia - insulin resistance and  $\beta$ -cell death]. **Orv Hetil**, v. 157, n. 19, p. 733-739, 2016.
- D'AMELIO, P. et al. Effect of intermittent PTH treatment on plasma glucose in osteoporosis: A randomized trial. **Bone**, v. 76, p. 177-184, 2015.
- DAVIS, S. K. et al. Association of ADIPOQ gene with type 2 diabetes and related phenotypes in African American men and women: the Jackson Heart Study. **BMC Genet**, v. 16, p. 147:159, 2015.
- EKMEKCI, H.; EKMEKCI, O. B. The role of adiponectin in atherosclerosis and thrombosis. **Clin Appl Thromb Hemost**, v. 12, n. 2, p. 163-168, 2006.
- FELSON, D. T. et al. Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: the Framingham study. **J Bone Miner Res**, v. 8, n. 5, p. 567-573, 1993.
- FERRON, M. et al. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 13, p. 5266-5270, 2008.
- FERRON, M.; LACOMBE, J. Regulation of energy metabolism by the skeleton: osteocalcin and beyond. **Arch Biochem Biophys**, v. 561, p. 137-146, 2014.
- FRENKEL, B. et al. Regulation of adult bone turnover by sex steroids. **J Cell Physiol**, v. 224, n. 2, p. 305-310, 2010.
- GAGGINI, M.; SAPONARO, C.; GASTALDELLI, A. Not all fats are created equal: adipose vs ectopic fat, implication in cardiometabolic diseases. **Horm. Mol. Biol. Clin. Invest**, v. 22, n. 1, p. 7-18, 2015.
- GANNAGÉ-YARED, M. H. et al. Osteoprotegerin in relation to body weight, lipid parameters insulin sensitivity, adipocytokines, and C-reactive protein in obese and non-obese young individuals: results from both cross-sectional and interventional study. **Eur J Endocrinol**, v. 158, n. 3, p. 353-359, 2008.
- GEER, E. B.; SHEN, W. Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. **Gend Med**, v. 6 Suppl 1, p. 60-75, 2009.
- GOWER, B. A. et al. Associations of total and undercarboxylated osteocalcin with peripheral and hepatic insulin sensitivity and  $\beta$ -cell function in overweight adults. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, n. 7, p. E1173-80, 2013.
- GRAVENSTEIN, K. et al. Cross-sectional evidence of a signaling pathway from bone homeostasis to glucose metabolism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 96, n. 6, p. E884-90, 2011.
- GUTIÉRREZ, O. M. et al. Racial differences in the relationship between vitamin D, bone mineral density, and parathyroid hormone in the National Health and Nutrition Examination Survey. **Osteoporos Int**, v. 22, n. 6, p. 1745-1753, 2011.

- HAMMARSTEDT, A. et al. The effect of PPAR $\gamma$  ligands on the adipose tissue in insulin resistance. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 73 p. 65–75 2005.
- HAUSCHKA, P. V. et al. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. **Physiol Rev**, v. 69, n. 3, p. 990-1047, 1989.
- HWANG, Y. C. et al. Circulating osteocalcin level is not associated with incident type 2 diabetes in middle-aged male subjects: mean 8.4-year retrospective follow-up study. **Diabetes Care**, v. 35, n. 9, p. 1919-1924, 2012a.
- \_\_\_\_\_. Circulating osteocalcin level is associated with improved glucose tolerance, insulin secretion and sensitivity independent of the plasma adiponectin level. **Osteoporos Int**, v. 23, n. 4, p. 1337-1342, 2012b.
- JUNG, K. Y. et al. Age- and sex-specific association of circulating osteocalcin with dynamic measures of glucose homeostasis. **Osteoporos Int**, v. 27, n. 3, p. 1021-1029, 2016.
- JUNG, U. J.; CHOI, M. S. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 4, p. 6184-6223, 2014.
- KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840-846, 2006.
- KANAZAWA, I. Adiponectin in metabolic bone disease. **Curr Med Chem**, v. 19, n. 32, p. 5481-5492, 2012..
- KANAZAWA, I. et al. Serum osteocalcin level is positively associated with insulin sensitivity and secretion in patients with type 2 diabetes. **Bone**, v. 48, n. 4, p. 720-725, 2011.
- KARSENTY, G. Convergence between bone and energy homeostases: leptin regulation of bone mass. **Cell Metab**, v. 4, n. 5, p. 341-348, 2006.
- KAUTZKY-WILLER, A.; HARREITER, J.; PACINI, G. Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. **Endocr Rev**, v. 37, n. 3, p. 278-316, 2016.
- KENNEDY, A. et al. Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. **J Nutr**, v. 139, n. 1, p. 1-4, 2009.
- KIM, J. Y. et al. Chronic alcohol consumption potentiates the development of diabetes through pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction. **World J Biol Chem**, v. 6, n. 1, p. 1-15, 2015.
- KINDBLOM, J. M. et al. Plasma osteocalcin is inversely related to fat mass and plasma glucose in elderly Swedish men. **J Bone Miner Res**, v. 24, n. 5, p. 785-791, 2009.
- LECKA-CZERNIK, B. et al. High bone mass in adult mice with diet-induced obesity results from a combination of initial increase in bone mass followed by attenuation in bone formation; implications for high bone mass and decreased bone quality in obesity. **Mol Cell Endocrinol**, v. 410, p. 35-41, 2015.
- LEE, B. C.; LEE, J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. **Biochim Biophys Acta**, v. 1842, n. 3, p. 446-462, 2014.
- LEE, J. M. et al. Prevalence and determinants of insulin resistance among U.S. adolescents: a population-based study. **Diabetes Care**, v. 29, n. 11, p. 2427-2432, 2006.
- LEE, N. K. et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. **Cell**, v. 130, n. 3, p. 456-469, 2007.
- LI, L. et al. Impact of Physical Activity on Glycemic Control and Insulin Resistance: A Study of Community-dwelling Diabetic Patients in Eastern China. **Intern Med**, v. 55, n. 9, p. 1055-1060, 2016.
- LOHMAN, T.; ROCHE, A.; MARTORELL, R. Anthropometric Standartization Reference Manual. **Human Kinetics Books, Champaign III.**, p. 177, 1988.

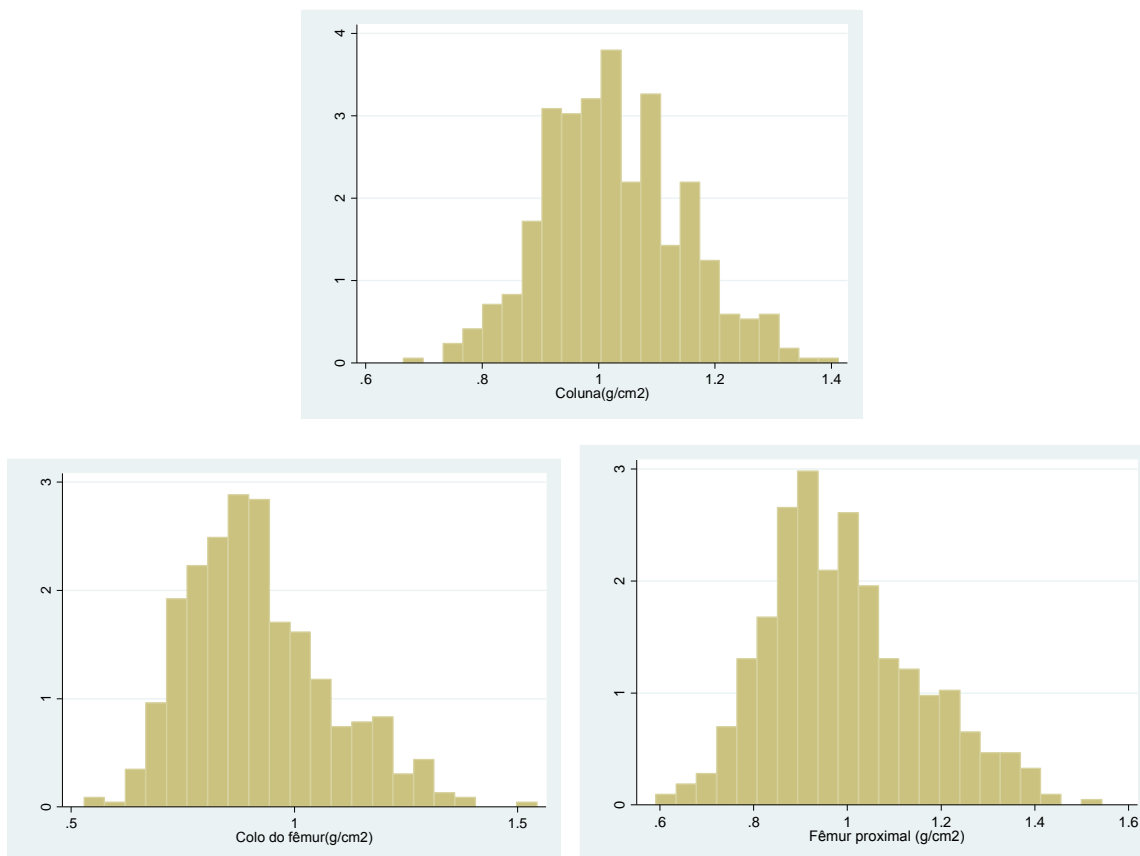
- LOUREIRO, M. B. et al. Low bone mineral density is associated to poor glycemic control and increased OPG expression in children and adolescents with type 1 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 103, n. 3, p. 452-457, 2014.
- LU C. et al. Serum osteocalcin is not associated with glucose but is inversely associated with leptin across generations of nondiabetic women. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 11, p. 4106-4114, 2012.
- LUCEY, A. J. et al. Young overweight and obese women with lower circulating osteocalcin concentrations exhibit higher insulin resistance and concentrations of C-reactive protein. **Nutr Res**, v. 33, n. 1, p. 67-75, 2013.
- LUCHS, A. Transdução de sinal: um olhar sobre a insulina. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 65, n. 3, p. 157-164, 2006.
- MADEIRA, F. B. et al. Normal weight obesity is associated with metabolic syndrome and insulin resistance in young adults from a middle-income country. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e60673, 2013.
- MATTHEWS, D. R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412-419, 1985.
- MCKEOWN, N. M. et al. Carbohydrate nutrition, insulin resistance, and the prevalence of the metabolic syndrome in the Framingham Offspring Cohort. **Diabetes Care**, v. 27, n. 2, p. 538-546, 2004.
- MORIGNY, P. et al. Adipocyte lipolysis and insulin resistance. **Biochimie**, v. 125, p. 259-266, 016.
- NEELAND, I. J. et al. Dysfunctional adiposity and the risk of prediabetes and type 2 diabetes in obese adults. **JAMA**, v. 308, n. 11, p. 1150-1159, 2012.
- NIELSON, C. M. et al. BMI and fracture risk in older men: the osteoporotic fractures in men study (MrOS). **J Bone Miner Res**, v. 26, n. 3, p. 496-502, 2011.
- NORDSTRÖM, P. et al. Do both areal BMD and injurious falls explain the higher incidence of fractures in women than in men? **Calcif Tissue Int**, v. 89, n. 3, p. 203-210, 2011.
- OHKUMA, T. et al. Dose- and time-dependent association of smoking and its cessation with glycemic control and insulin resistance in male patients with type 2 diabetes mellitus: the Fukuoka Diabetes Registry. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0122023, 2015.
- ORWOLL, E. S.; BELKNAP, J. K.; KLEIN, R. F. Gender specificity in the genetic determinants of peak bone mass. **J Bone Miner Res**, v. 16, n. 11, p. 1962-1971, 2001.
- OSHIMA, K. et al. Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 331, n. 2, p. 520-526, 2005.
- PAULI, J. et al. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 53, n. 4, p. 388-408, 2009.
- PEREIRA-SANTOS, M. et al. Obesity and vitamin D deficiency: a systematic review and meta-analysis. **Obes Rev**, v. 16, n. 4, p. 341-349, 2015.
- PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Etiology of insulin resistance. **Am J Med**, v. 119, n. 5 Suppl 1, p. S10-6, 2006.
- PI, M.; WU, Y.; QUARLES, L. D. GPRC6A mediates responses to osteocalcin in  $\beta$ -cells in vitro and pancreas in vivo. **J Bone Miner Res**, v. 26, n. 7, p. 1680-1683, 2011.
- PICCOLO, R. S. et al. Relative Contributions of Socioeconomic, Local Environmental, Psychosocial, Lifestyle/Behavioral, Biophysiological, and Ancestral Factors to Racial/Ethnic Disparities in Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 39, n. 7, p. 1208-1217, 2016.
- PIRILÄ, S. et al. Bone health and risk factors of cardiovascular disease--a cross-sectional study in healthy young adults. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e108040, 2014.



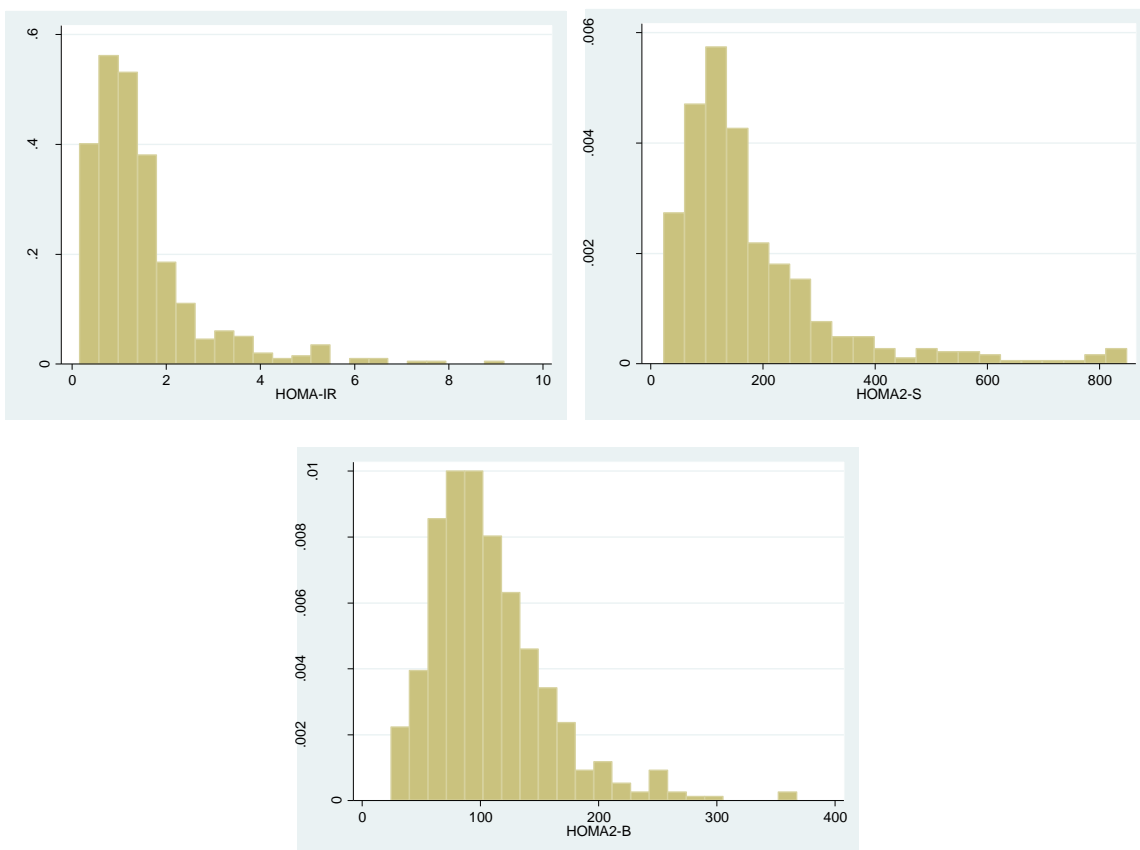
- PITTAS, A. G. et al. Association between serum osteocalcin and markers of metabolic phenotype. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 94, n. 3, p. 827-832, 2009.
- POLGREEN, L. E. et al. Association of osteocalcin with obesity, insulin resistance, and cardiovascular risk factors in young adults. **Obesity (Silver Spring)**, v. 20, n. 11, p. 2194-2201, 2012.
- PRADO, W. et al. Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício. **Rev Bras Med Esporte**, v. 15, n. 5, 2009.
- REID, I. R. Relationships among body mass, its components, and bone. **Bone**, v. 31, n. 5, p. 547-555, 2002.
- RIBEIRO A.B.; CARDOSO, M.A. Construção de um questionário de frequência alimentar como subsídio para programas de prevenção de doenças crônicas não transmissíveis. **Rev. Nutr. [online]**, v. 15, p. 239-245, 2002.
- RONA, R. J.; GULLIFORD, M. C.; CHINN, S. Effects of prematurity and intrauterine growth on respiratory health and lung function in childhood. **BMJ**, v. 306, n. 6881, p. 817-820, 1993.
- RONIS, M. J.; MERCER, K.; CHEN, J. R. Effects of nutrition and alcohol consumption on bone loss. **Curr Osteoporos Rep**, v. 9, n. 2, p. 53-59, 2011.
- RUI, X. et al. Differential pattern for regulating insulin secretion, insulin resistance, and lipid metabolism by osteocalcin in male and female T2DM patients. **Med Sci Monit**, v. 20, p. 711-719, 2014.
- SOCIDADE BRASILEIRA DE DIABETES. SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2014-2015. São Paulo: AC Farmacêutica, 2015.
- SCHLÜSSEL, M. M. et al. Birth weight and bone mass in young adults from Brazil. **Bone**, v. 46, n. 4, p. 957-963, 2010.
- SEGOVIA, S. A. et al. Maternal obesity, inflammation, and developmental programming. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 418975, 2014.
- SHEA, M. K. et al. Gamma-carboxylation of osteocalcin and insulin resistance in older men and women. **Am J Clin Nutr**, v. 90, n. 5, p. 1230-1235, 2009.
- SIDDIQUI, J. A.; PARTRIDGE, N. C. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. **Physiology (Bethesda)**, v. 31, n. 3, p. 233-245, 2016.
- SILVA, I.; BRANCO, J. C. Rank/Rankl/opg: literature review. **Acta Reumatol Port**, v. 36, n. 3, p. 209-218, 2011.
- SULIBURSKA, J. et al. The association of insulin resistance with serum osteoprotegerin in obese adolescents. **J Physiol Biochem**, v. 69, n. 4, p. 847-853, 2013.
- TANNER, J. M. Normal growth and techniques of growth assessment. **Clin Endocrinol Metab**, v. 15, n. 3, p. 411-451, 1986.
- TEXTOR, J.; HARDT, J.; KNÜPPEL, S. DAGitty: a graphical tool for analyzing causal diagrams. **Epidemiology**, v. 22, n. 5, p. 745, 2011.
- TRAVASSOS, C.; WILLIAMS, D. R. The concept and measurement of race and their relationship to public health: a review focused on Brazil and the United States. **Cad Saude Publica**, v. 20, n. 3, p. 660-678, 2004.
- TWISK, J. Applied Multilevel Analysis: A Practical Guide. United Kingdom. United Kingdom: **Cambridge Univ. Press**, 2006.
- VELDHUIS-VLUG, A. G.; FLIERS, E.; BISSCHOP, P. H. Bone as a regulator of glucose metabolism. **Neth J Med**, v. 71, n. 8, p. 396-400, 2013.
- WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

- WILLI, C. et al. Active smoking and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **JAMA**, v. 298, n. 22, p. 2654-2664, 2007.
- WONGDEE, K.; CHAROENPHANDHU, N. Update on type 2 diabetes-related osteoporosis. **World J Diabetes**, v. 6, n. 5, p. 673-678, 2015.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Physical Status: The Use and Interpretation of Anthropometry. Geneva: **Technical Report Series** 854, 1995.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. Obesity: prevention and managing the global epidemic. Geneva: **Report of the WHO Consultation on Obesity**, 1998.
- WRONSKA, A.; KMIEC, Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 205, n. 2, p. 194-208, 2012.
- YAMAUCHI, T. et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. **Nat Med**, v. 7, n. 8, p. 941-946, 2001.
- YATURU, S.; RAINS, J.; JAIN, S. K. Relationship of elevated osteoprotegerin with insulin resistance, CRP, and TNF-alpha levels in men with type 2 diabetes. **Cytokine**, v. 44, n. 1, p. 168-171, 2008.
- YOON, V.; MAALOUF, N. M.; SAKHAEI, K. The effects of smoking on bone metabolism. **Osteoporos Int**, v. 23, n. 8, p. 2081-2092, 2012.
- ZAIDI, M. et al. Minireview: The link between fat and bone: does mass beget mass? **Endocrinology**, v. 153, n. 5, p. 2070-2075, 2012.
- ZEYDA, M.; STULNIG, T. M. Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. **Gerontology**, v. 55, n. 4, p. 379-86, 2009.
- ZHANG, P. et al. Visceral adiposity is negatively associated with bone density and muscle attenuation. **Am J Clin Nutr**, v. 101, n. 2, p. 337-343, 2015.

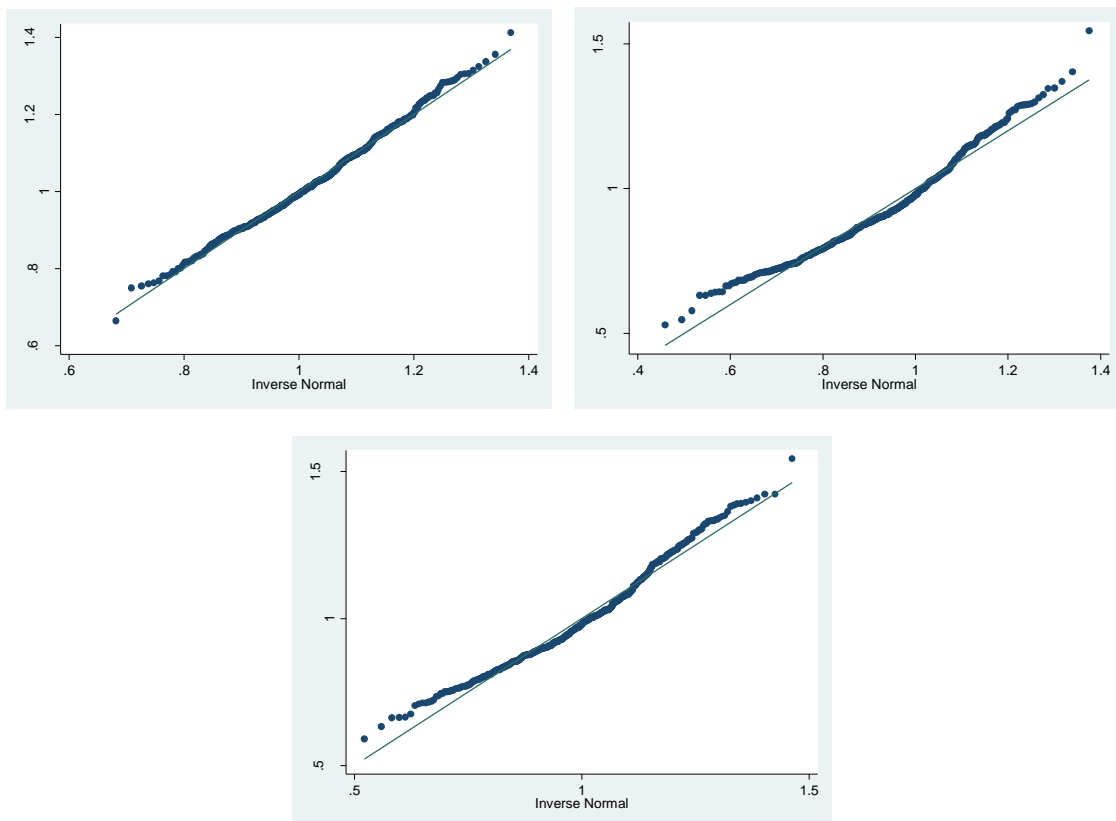
**ANEXO**  
ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS DADOS



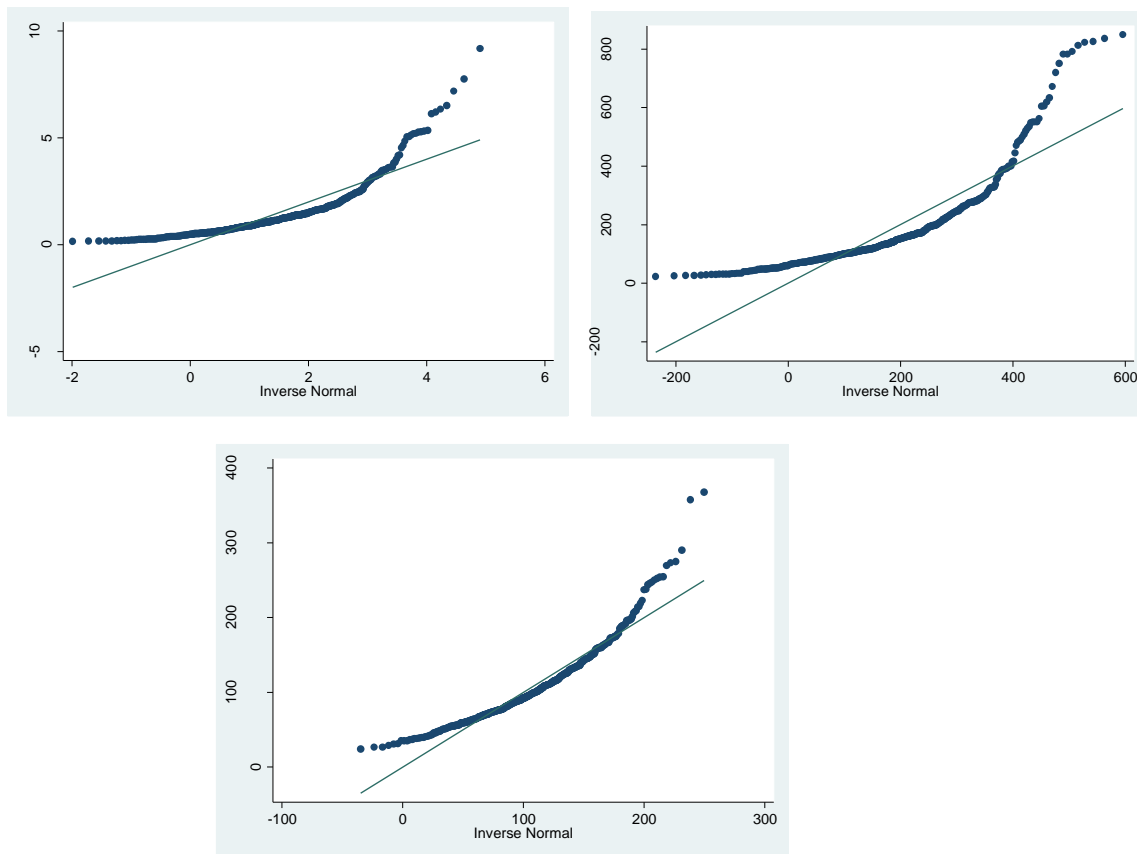
**Figura 1.** Histograma das variáveis de exposição – Densidade Mineral Óssea (coluna lombar colo do fêmur e fêmur proximal total).



**Figura 2.** Histograma das variáveis de desfecho – HOMA1-IR, HOMA2-S e HOMA2 $\beta$ .



**Figura 3.** Distribuição das variáveis de exposição – Densidade Mineral Óssea (coluna lombar colo do fêmur e fêmur proximal total).



**Figura 4.** Distribuição das variáveis de desfecho - HOMA1-IR, HOMA2-S e HOMA2 $\beta$ .