

**Adriana Maria Kakehasi**

**DENSIDADE DE CÉLULAS PARIETAIS E ENDÓCRINAS DA MUCOSA GÁSTRICA DO  
CORPO (OXÍNTICA) DE MULHERES COM E SEM OSTEOPOROSE PRIMÁRIA**

**Universidade Federal de Minas Gerais**

**2003**

**Adriana Maria Kakehasi**

**DENSIDADE DE CÉLULAS PARIETAIS E ENDÓCRINAS DA MUCOSA GÁSTRICA DO CORPO (OXÍNTICA) DE MULHERES COM E SEM OSTEOPOROSE PRIMÁRIA**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina, área de concentração Gastroenterologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina.**

**Orientador: Prof. Alfredo José Afonso Barbosa**

**Co-orientador: Luiz Gonzaga Vaz Coelho**

**Laboratório de Patologia Digestiva e Neuroendócrina (LPDN), Faculdade de Medicina da UFMG, com a colaboração dos Departamentos de Clínica Médica (Ambulatório de Úlcera Péptica) e Aparelho Locomotor (Reumatologia) e do Hospital das Clínicas da UFMG (Instituto ALFA de Gastroenterologia).**

**2003**

K13d    Kakehasi, Adriana Maria  
          Densidade de células parietais e endócrinas da  
mucosa  
          gástrica do corpo (oxíntica) de mulheres com e sem  
          osteoporose primária/Adriana Maria  
Kakehasi. Belo Horizonte,            2003.  
          82 f. ilustr.  
          Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de  
          Minas Gerais. Faculdade de Medicina.  
          Área de concentração: Gastroenterologia  
          Orientador: Alfredo José Afonso Barbosa  
          Co-orientador: Luiz Gonzaga Vaz Coelho  
          1. Mucosa gástrica/patologia. 2.  
          Osteoporose/etiologia. 3. Células parietais gástricas.  
          4. Células APUD. 5. Contagem de células. 6.  
          Mulheres. I. Título.

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

REITORA: Prof. Dra. Ana Lúcia Almeida Gazzola

VICE-REITOR: Prof. Dr. Marcos Borato Viana

PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dra. Maria Sueli de Oliveira Pires

## **FACULDADE DE MEDICINA**

DIRETOR: Prof. Dr. Geraldo Alves Brasileiro

VICE-DIRETOR: Prof. Dr. Joel Alves Lamounier

## **CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

COORDENADOR: Prof. Dr. Francisco José Pena

## **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GASTROENTEROLOGIA**

### **COLEGIADO**

Prof. Dr. Aloísio Sales da Cunha (Coodenador)

Prof. Dr. Marco Túlio costa Diniz (Sub-Coordenador)

Prof. Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho

Prof. Dra. Andréa Maria Camargos Rocha

Prof. Dra. Teresa Cristina Abreu Ferrari

Sr. Aguinaldo Soares Lima (Representante Discente)

## **AGRADECIMENTOS**

Professores Luiz Gonzaga Vaz Coelho, Luis de Paula Castro e Alúcio Sales da Cunha, por acreditarem na idéia deste estudo.

Dra. Cláudia Maria de Castro Mendes, pela mais pronta e eficiente colaboração.

Professor Eugênio Marcos Andrade Goulart, pela orientação estatística.

Sra. Rosângela Castilho Ferreira, pela amizade e carinho com que trabalhou neste projeto.

Srtas Fabíola e Helen, pela dedicação empenhada na realização deste estudo.

Colegas do Laboratório de Patologia Digestiva e Neuroendócrina (LPDN), pela harmônica convivência.

Funcionários do Instituto Alfa de Gastroenterologia, Hospital das Clínicas da UFMG, pela disposição em ajudar na realização desta pesquisa.

Alunos André Lopes Portugal e Felipe Assis Lisboa, pela ajuda e assistência em informática.

Professor Geraldo Cunha Cury, pela ajuda na elaboração final deste manuscrito e pelos 10 anos de amizade.

Família Kakehasi.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Professor Alfredo José Afonso Barbosa, há 10 anos exercendo importante influência em minha formação pessoal e profissional. Vivendo a laboriosa arte da pesquisa científica em nosso país e convivendo sob os preceitos das melhores qualidades humanas, disso resultam o reconhecimento de seu trabalho e o harmonioso ambiente de trabalho do Laboratório de Patologia Digestiva e Neuroendócrina.

Muito obrigada.

## RESUMO

**Introdução e objetivos:** A osteoporose, resultante da perda progressiva da massa óssea, afeta 30% das mulheres na pós-menopausa e estudos experimentais têm demonstrado a presença de fator gástrico influenciando o metabolismo do cálcio. O objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações histopatológicas da mucosa gástrica de mulheres na pós-menopausa, com ênfase na densidade de células parietais e endócrinas da mucosa oxíntica, correlacionando-as com a densidade mineral óssea. **Pacientes e métodos:** Foram estudadas 50 mulheres no período do climatério, idade média de  $61,7 \pm 7$  anos, e sem terapia de reposição hormonal, submetidas à endoscopia digestiva alta e à densitometria óssea através da absorciometria de raio-X de dupla energia. Fragmentos da mucosa gástrica foram submetidos às colorações pela eosina-hematoxilina para avaliação histológica, e pela prata (método de Grimelius) para estudo das células endócrinas, e à imunohistoquímica com anticorpos monoclonais contra células parietais. A infecção pelo *Helicobacter pylori* foi avaliada através da histologia, teste da urease e teste respiratório com carbono marcado ( $^{13}\text{C}$ ). **Resultados:** Em 32 (64%) das pacientes a mucosa gástrica revelou sinais de pangastrite crônica ativa, e em 20 (40%) delas havia sinais de atrofia da mucosa oxíntica. A prevalência da infecção pelo *Helicobacter pylori* nas 50 pacientes foi de 68% (34 pacientes). A prevalência de osteopenia e osteoporose da coluna lombar, nesta amostra, foi de 42% (21 pacientes) e 36% (18 pacientes), respectivamente. A densidade de células parietais para pacientes com e sem osteoporose foi  $948 \pm 188$  e  $804 \pm 203$ , respectivamente ( $p=0,038$ ). A densidade de células endócrinas para pacientes com e sem osteoporose foi  $190 \pm 101$  e  $173 \pm 66$ , respectivamente ( $p=0,49$ ). Não houve diferença na taxa de infecção pelo *Helicobacter pylori* entre mulheres com e sem osteoporose. **Conclusões:** O presente estudo sugere que mulheres com osteoporose apresentam mucosa gástrica melhor preservada do que aquelas com densidade mineral óssea normal em coluna lombar. Não houve diferença significativa entre densidade de células endócrinas da mucosa oxíntica, infecção pelo *Helicobacter pylori* e a densidade mineral óssea da coluna lombar.

## ABSTRACT

**Introduction and objectives:** Osteoporosis is a result of progressive bone loss and affects 30% of postmenopausal women. A gastric factor that could influence calcium metabolism has been demonstrated by experimental studies. The objective of this study was to evaluate the histopathological changes of gastric mucosa in postmenopausal women, through parietal and endocrine cell density, correlating them with bone mineral density. **Patients and methods:** Fifty postmenopausal women, mean age  $61,7 \pm 7$  years, without hormonal replacement therapy were submitted to gastroduodenal endoscopy and bone densitometry by dual energy X-ray absorptiometry. Tissue samples were submitted to eosin-hematoxylin staining for histopathological study, Grimelius staining for endocrine cell and to immunohistochemistry with antiparietal cell monoclonal antibody. *Helicobacter pylori* infection was evaluated by histology, urease test and breath test with  $^{13}\text{C}$ . **Results:** In thirty-two (64%) patients the gastric mucosa showed signs of active chronic gastritis, and in 20 (40%) of them, there were signs of oxyntic atrophy. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection was 68% (34 patients). The prevalence of lumbar spine osteopenia and osteoporosis in this sample of patients was 42% (21 patients) and 36% (18 patients), respectively. The parietal cell density for patients with and without osteoporosis was  $948 \pm 188$  and  $804 \pm 203$ , respectively ( $p=0,038$ ). The endocrine cell density for patients with and without osteoporosis was  $190 \pm 101$  e  $173 \pm 66$ , respectively ( $p=0,49$ ). There was no correlation between *Helicobacter pylori* infection in women with and without osteoporosis. **Conclusions:** The results of the present study suggest that women with osteoporosis have a better preserved gastric mucosa than those with normal lumbar spine mineral density. There was no significant difference between endocrine cell density in oxyntic mucosa, *Helicobacter pylori* infection and lumbar spine mineral density.



## SUMÁRIO

1. Justificativa	15
2. Revisão da literatura	17
2.1 Osteoporose	17
2.2 Osteoporose secundária à gastrectomia	24
2.3 Mucosa gástrica: componentes exócrino e endócrino	28
2.4 Mucosa gástrica e metabolismo ósseo	32
3. Objetivos do trabalho	36
4. Pacientes e métodos	37
4.1 Pacientes	37
4.2 Estudo da infecção pelo <i>Helicobacter pylori</i>	39
4.3 Endoscopia digestiva alta	39
4.4 Colorações para estudo histológico	40
4.5 Avaliação histopatológica	42
4.6 Avaliação da população de células parietais da mucosa oxíntica	43
4.7 Avaliação da população de células endócrinas da mucosa oxíntica	43
5. Análise estatística	44
6. Resultados	45
6.1 Avaliação das pacientes	45
6.2 Avaliação endoscópica	47

6.3 Avaliação histológica da mucosa gástrica	47
6.4 Avaliação da infecção pelo <i>Helicobacter pylori</i>	49
6.5 Avaliação da população de células parietais da mucosa oxíntica	50
6.6 Avaliação da população de células endócrinas da mucosa oxíntica	52
6.7 Avaliação da densidade mineral óssea da coluna lombar e fêmur	54
6.8 Correlação entre células parietais, células endócrinas e densidade mineral óssea	57
6.9 Correlação entre infecção pelo <i>Helicobacter pylori</i> e densidade mineral óssea	60
7. Discussão	61
8. Conclusões	71
9. Referências bibliográficas	73

## LISTA DE FIGURAS E QUADROS

FIGURA 1. Mucosa gástrica oxíntica sem alterações histopatológicas relevantes (normal), A - corpo, B - antro, HE, 50X..

FIGURA 2. Mucosa gástrica oxíntica evidenciando gastrite crônica ativa com sinais de atrofia glandular, A - corpo, B – antro, HE, 50X.

FIGURA 3. Células parietais da mucosa gástrica oxíntica, A - sem atrofia, B - com atrofia, pela imunohistoquímica, 50X.

FIGURA 4. Células endócrinas da mucosa oxíntica, Grimelius, A - 50 e B - 100X.

FIGURA 5. Densitometria óssea evidenciando osteoporose em coluna lombar (T-score L2-L4 = - 3,2).

FIGURA 6. Densitometria óssea evidenciando densidade mineral óssea normal em coluna lombar (T-score L2-L4 = - 0,9).

QUADRO 1. Fatores de risco para osteoporose

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1. Características clínicas de 50 pacientes do sexo feminino, no período do climatério, estudadas no presente trabalho.
- TABELA 2. Diagnóstico histológico da mucosa gástrica e prevalência da infecção pelo Hp em 50 mulheres no período do climatério.
- TABELA 3. Densidade de células parietais, segundo a presença de atrofia na mucosa gástrica de 50 mulheres no período do climatério.
- TABELA 4. Densidade de células endócrinas, segundo presença de atrofia na mucosa gástrica de 50 mulheres no período do climatério.
- TABELA 5. Diagnóstico densitométrico em coluna lombar e fêmur em 50 mulheres no período do climatério.
- TABELA 6. Características clínicas das 50 pacientes segundo a presença ou ausência de osteoporose em coluna lombar.
- TABELA 7. Densidade de células parietais da mucosa oxíntica, de acordo com a presença de osteoporose em coluna lombar em 50 mulheres no período do climatério.
- TABELA 8. Densidade de células endócrinas e relação CP/CE da mucosa oxíntica, de acordo com a presença de osteoporose em coluna lombar, em 50 mulheres no período do climatério.
- TABELA 9. Prevalência da infecção pelo Hp e correlação com a densidade mineral óssea em coluna lombar em 50 mulheres no período do climatério.

## LISTA DE ABREVIATURAS

APUD	<i>Amine Precursor Uptake and Decarboxilation</i>
CP	Células parietais
Células D	Células produtoras de somatostatina
Células EC	Células enterocromafins
Células ECL	Células <i>enterochromaffin-like</i>
Células G	Células produtoras de gastrina
DP	Desvio-padrão
DII	Doença inflamatória intestinal
HE	Hematoxilina-Eosina
Hp	<i>Helicobacter pylori</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMC	Índice de massa corporal
LPDN	Laboratório de Patologia Digestiva e Neuroendócrina
M	Molar
mm	Milímetros
mm <sup>2</sup>	Milímetros quadrados
ml	Mililitros
mg	Miligramas
mg%	Miligramas por cento

OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS-BSA	Tampão fosfato com 0,1% de albumina bovina
PTH	Paratormônio
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
$\mu\text{m}$	Micrômetro

## 1. JUSTIFICATIVA

A osteoporose, conseqüência da perda progressiva de massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, com conseqüente aumento do risco de fraturas (1), é a doença óssea mais comum, observada em mulheres na pós-menopausa e, com o avançar da idade, freqüente também em homens. Um aspecto particular da osteoporose é a normalidade da taxa entre os componentes mineral e orgânico da matriz óssea, que a distingue da osteomalácia, doença caracterizada por deficiência relativa da mineralização em relação ao conteúdo colágeno do osso. A conseqüência mais relevante da osteoporose é a ocorrência de fraturas, sendo as mais comuns, as fraturas vertebrais, do punho e do fêmur.

Não existem dados precisos sobre a prevalência da osteoporose no Brasil. Uma estimativa, entretanto, pode ser feita. De acordo com dados do último censo (ano 2000), admite-se para o Brasil uma população de 163.275.000 habitantes, dos quais 81 milhões são do sexo feminino. Vinte e seis a trinta milhões estão acima dos 50 anos e, desses, 12 milhões têm mais de 60 anos. Considerando em 25 a 30% a taxa média relativa à freqüência da osteoporose em mulheres após a menopausa (2), pode-se estimar em 5,5 milhões o número de pacientes acometidas por essa enfermidade em nosso país.

Com relação às fraturas ósseas devido à ou associadas à osteoporose no Brasil, no ano de 1998, o seu número atingiu 94.120 fraturas vertebrais, e 37.000 fraturas de punho e fêmur, cada uma delas. Calcula-se que os custos financeiros tenham atingido, somente em relação às fraturas de fêmur, cerca de R\$ 27.300.000,00 (3). A fratura de fêmur apresenta mortalidade de 25% no primeiro ano e 50% das pacientes necessitam de algum tipo de auxílio definitivo após a sua ocorrência, perdendo a independência para a vida diária (4).

Um dos fatores mais importantes que determinam o aparecimento da osteoporose e explica sua maior prevalência no sexo feminino, é a deficiência estrogênica na pós-menopausa. Além disso, outras condições estão diretamente

implicadas, como idade, raça, hábitos de vida, doenças inflamatórias crônicas e doenças do aparelho gastrointestinal.

Existe clara correlação entre a ocorrência de osteoporose com a retirada cirúrgica do estômago (gastrectomia) (5-7). Apesar dos resultados não serem uniformes (8-10), a gastrectomia é reconhecida como um fator de risco para o desenvolvimento de osteoporose e os pacientes submetidos ao procedimento cirúrgico apresentam maior incidência de fraturas (8). Uma série de fatores, relacionados à deficiência de absorção de cálcio e vitamina D, perda ponderal e desnutrição, podem estar implicados na doença óssea pós-gastrectomia, mas sua etiopatogênese ainda não está totalmente esclarecida (12-13).

Em estudos experimentais, onde se utilizou o rato como modelo, um grupo sueco de pesquisadores tem demonstrado a presença de um fator endócrino gástrico atuando no metabolismo ósseo, uma vez que a administração de extrato protéico da mucosa oxíntica pôde prevenir a perda óssea observada em ratos submetidos à gastrectomia (9). Até o presente momento não se conhecem estudos correlacionando possíveis alterações da mucosa gástrica exócrina e endócrina com a densidade mineral óssea em humanos.

A infecção pelo *Helicobacter pylori* (Hp), que tem distribuição mundial e alta prevalência em nosso meio, pode estar associada a uma série de alterações histopatológicas da mucosa gástrica, como a gastrite crônica, a úlcera péptica e o câncer gástrico. Com relação à osteoporose, um recente estudo europeu, mostrou associação com a infecção pelo Hp, com bases em avaliação sorológica (10).

Diante dessas evidências, este trabalho foi realizado com o objetivo de se conhecer melhor possíveis inter-relações entre mucosa gástrica, infecção pelo Hp e osteoporose. Para este objetivo propôs-se o estudo histopatológico e imunocitoquímico da mucosa gástrica de mulheres no período do climatério, com ênfase na densidade das células parietais (CP) e células argirófilas da mucosa oxíntica e correlacionando estes dados com a densidade mineral óssea.



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Osteoporose

A osteoporose foi descrita inicialmente em 1885 por Pommer, que a diferenciou da osteomalácia e do raquitismo e, posteriormente, por Albright e Reifenstein, que descreveram a osteoporose juvenil, a pós-menopausa e a senil (11).

Definida como perda de massa óssea e alteração da microarquitetura do esqueleto, a osteoporose é a doença óssea mais comum (12). Resulta da diminuição absoluta e global da quantidade de tecido ósseo, abaixo daquela requerida para o suporte mecânico do esqueleto (1). A osteoporose não resulta exclusivamente de perda óssea. Homens e mulheres, com o avançar da idade, perdem lentamente massa óssea e indivíduos que não atingem o potencial ósseo máximo durante a infância e adolescência, podem apresentar osteoporose mesmo sem perda acelerada. Sua principal consequência clínica e que resulta da fragilidade óssea, é o aumento do risco de fraturas. O defeito básico é a perda tanto da matriz mineral quanto do componente orgânico, ou seja, a razão entre conteúdo mineral e colágeno está preservada, o que a diferencia da osteomalácia, na qual existe uma perda predominante da mineralização.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), pacientes são definidos como portadores de osteoporose quando apresentam densidade mineral óssea abaixo de 2,5 desvios-padrão em relação à média observada na população jovem. Este conceito é apoiado em medidas baseadas na absorciometria de raio-X de dupla energia (13). Existe uma correlação inversa entre baixa densidade óssea e risco de fraturas, sendo que o risco de fratura vertebral é multiplicado por 2 a cada diminuição de um DP na massa óssea (14). É uma doença difusa, que acomete todo o esqueleto, e sua prevalência aumenta com a idade. Existem também situações de

acometimento localizado, como as imobilizações por fraturas e a distrofia simpática reflexa.

Existem diferenças étnicas e geográficas na epidemiologia da osteoporose, sendo mais comum em caucasianos do que em negros e mais freqüente em mulheres do que em homens, numa proporção de 6:1, embora, com o aumento da expectativa de vida, tenha se tornado um problema de saúde pública em ambos os sexos (15). No continente europeu, a incidência de fraturas osteoporóticas chega a variar mais de sete vezes de um país para outro, com as maiores taxas ocorrendo em países nórdicos (16).

A prevalência de osteopenia/osteoporose nos Estados Unidos é de 28 milhões de pessoas, com 1,5 milhões de fraturas por ano, sendo que 300.000 são fraturas de quadril (2). No Brasil, estimando-se que 35% das mulheres irão ter osteoporose após a menopausa (17), esse número pode chegar a mais de cinco milhões. Apenas um terço das mulheres brasileiras têm a doença diagnosticada e, dessas, somente 20% estão recebendo tratamento adequado.

A probabilidade da ocorrência de fratura de quadril para mulheres brancas acima dos 50 anos, durante o tempo restante de vida, é estimado em torno de 14% (18). Estima-se que a prevalência de fraturas vertebrais em mulheres com mais de 50 anos se aproxime dos 30% (13, 19) e que pelo menos 90% das fraturas de quadril em mulheres idosas possam ser atribuídas à osteoporose.

Estimativas colocam a osteoporose em lugar de destaque, como uma das principais causas de morbidade e mortalidade da população feminina, sendo que após os 65 anos a incidência de fraturas de quadril por osteoporose em mulheres brancas é maior que a incidência de acidente vascular cerebral, câncer de mama e *diabetes mellitus* (20).

A massa óssea é condição determinada geneticamente (21), e estudos recentes têm demonstrado associação entre osteoporose e polimorfismo gênico, como por exemplo, polimorfismo dos genes para os receptores para estrógeno e vitamina D (22).

Até a terceira década de vida ocorre ganho ósseo, quando atingimos o “pico de massa óssea”, sendo que aporte adequado de cálcio e atividade física podem assegurar o alcance do máximo de massa óssea. A perda óssea que se inicia após o pico de massa óssea atinge homens e mulheres, mas essas últimas estão mais predispostas a osteoporose, admitindo-se que isso se deva ao fato de que no período do climatério os ovários sofrem um processo de atrofia, passando a produzir menor quantidade de estrógeno, hormônio fundamental para a manutenção da massa óssea feminina. Este hormônio sexual apresenta efeito antireabsortivo por diminuir a frequência de ativação dos ciclos de remodelação óssea, e também por diminuir a produção local de citocinas, como as interleucinas 1 e 6, estimuladoras da reabsorção óssea (23). A perda óssea em mulheres na pós-menopausa e sem terapia de reposição hormonal é mais acentuada nos primeiros anos, atinge preferencialmente o osso trabecular, e pode chegar a 4% ao ano, com uma perda aproximada de 15% em cinco anos (24). Mulheres com anorexia nervosa, atletas profissionais, e aquelas ooforectomizadas também estão sujeitas à falência gonadal e, conseqüentemente, à perda óssea acelerada.

Fatores de risco para osteoporose como a idade e a densidade mineral óssea, estão bem estabelecidos, por guardarem estreita relação com a incidência de fraturas. Outros fatores de risco se relacionam diretamente com a massa óssea e, conseqüentemente, com risco aumentado de fraturas. Os fatores de risco podem ser classificados em uma das cinco categorias: idade ou relacionado à idade, genético, ambiental, hormonal ou doenças crônicas e características físicas ósseas (QUADRO 1). O impacto desses fatores no aparecimento da osteoporose é influenciado pela idade em que eles se manifestam como pode ser exemplificado pelo efeito devastador da deficiência estrogênica sobre a massa óssea, iniciada na adolescência. Tabagismo, baixo índice de massa corporal, e história familiar positiva para osteoporose são fatores de risco estabelecidos para osteoporose, enquanto alcoolismo, uso de bebidas cafeínadas e sedentarismo na adolescência têm relação inconsistente com a densidade mineral óssea (18). Doenças que diminuem os níveis de estrógeno ou vitamina D, que prejudicam a absorção cálcio, e também aquelas que determinam processo inflamatório sistêmico, com liberação de citocinas ativadoras dos osteoclastos, podem alterar negativamente o equilíbrio ósseo.

O tecido ósseo é composto pela matriz extracelular e pelas células responsáveis pela formação e reabsorção ósseas. Esta matriz constitui-se principalmente de fibras colágenas tipo I e cristais de hidroxiapatita. As células são de dois tipos, os osteoclastos, de origem hematopoética e responsáveis pela reabsorção óssea, e os osteoblastos, provenientes de células mesenquimais, produtores da matriz óssea.

Existem dois tipos de tecido ósseo segundo sua disposição histológica, o osso cortical, que é compacto e está presente em ossos longos, e o osso trabecular, que tem taxa de mineralização menor, sendo formado por lâminas horizontais e verticais que se interconectam. O osso trabecular ou esponjoso é microscopicamente igual ao cortical, mas seu metabolismo é mais intenso e está presente nas vértebras, íleo e extremidades dos ossos longos.

Seja no osso cortical ou trabecular, um processo contínuo de formação acoplado à reabsorção, chamado ciclo de remodelamento, garante um tecido são e forte, pois há inicialmente a retirada do osso velho por ação dos osteoclastos e deposição de nova matriz, posteriormente mineralizada pelos osteoblastos. O equilíbrio entre esses dois processos garante a manutenção da massa óssea em indivíduos adultos e qualquer alteração no sentido de ruptura deste equilíbrio é capaz de resultar em osteoporose. A perda óssea acelerada, em mulheres em menopausa recente, está associada à atividade reabsortiva aumentada. Já em pacientes idosas ocorre diminuição da atividade osteoblástica, mas o resultado final é o mesmo, culminando com baixa densidade mineral óssea.

A avaliação clínica de pacientes com suspeita de osteoporose inclui a identificação de fatores de risco na intenção de determinar aqueles com indicação para realização de densitometria óssea, intervenção preventiva relacionada a hábitos de vida e investigação de causas secundárias. Queixas de dores ósseas são úteis, alertando principalmente para pesquisa de causa secundária de osteoporose, ou distúrbio sistêmico envolvendo o esqueleto, uma vez que a osteoporose primária não é condição dolorosa, até que ocorram fraturas. Pacientes podem queixar-se de dor em coluna vertebral, aumento da cifose torácica ou diminuição da estatura, embora muitas fraturas vertebrais passem despercebidas. Ao contrário, fraturas de

quadril e punho raramente não são diagnosticadas, pela necessidade de atendimento médico para imobilização ou mesmo tratamento cirúrgico.

A avaliação laboratorial na osteoporose deve ser definida individualmente, sendo que muitos exames, indicados após minuciosa avaliação clínica, podem definir diagnóstico de causas secundárias para osteoporose. A pesquisa dos níveis sanguíneos de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina estão, geralmente, dentro dos limites da normalidade em pacientes com osteoporose primária.

Os marcadores de remodelação óssea são capazes de predizer variações na massa óssea e risco de fraturas (25), e podem ser úteis no acompanhamento da eficácia do tratamento e aderência do paciente, por sofrerem alterações mais precocemente do que medidas de massa óssea através da densitometria (26). Devido grande variação individual e ainda limitações técnicas para dosagem dos marcadores de formação e reabsorção óssea, mais estudos são necessários para determinação do benefício de seu uso, e quais os marcadores de maior valor prático.

Não há como identificar indivíduos que irão sofrer fraturas por osteoporose, mas a verificação dos fatores de risco pode auxiliar a identificação de pessoas com maior chance para ocorrência deste evento. A densidade mineral óssea continua sendo o melhor preditor isolado de risco de fratura, tanto quanto a hipertensão arterial para o acidente vascular cerebral (27). A densitometria óssea mede a quantidade de cálcio presente nas regiões avaliadas, e baseia-se no princípio de que a quantidade de radiação atenuada pelo tecido ósseo relaciona-se à espessura e composição. A absorciometria de raio-x de dupla energia é mundialmente usada, com excelente acurácia e precisão, utilização de baixas doses de radiação e capacidade de medir a densidade mineral óssea em sítios apendicular e axial (28). Outros métodos diagnósticos existem, porém nenhum suplanta a densitometria óssea em sua utilidade e segurança, tendo se tornado padrão-ouro para o diagnóstico de osteoporose (29). O uso da radiografia convencional é útil para o diagnóstico de fraturas, mas é método pouco preciso para o diagnóstico de osteoporose, pois a perda óssea deve exceder 30-40% para ser observada através deste exame complementar (30) e, embora o ultrassom ósseo apresente atributos desejáveis, como baixo custo e utilização de pequena quantidade de radiação, ainda

não existem critérios universalmente aceitos para o diagnóstico ultrassonográfico de osteoporose.

A osteoporose evolui silenciosamente e, se não tratada, o faz com acúmulo de graves limitações para pacientes acometidas, muitas vezes associadas a quadro álgico decorrente das fraturas, com necessidade constante de cuidados e medicações. Nenhum tratamento disponível até o momento, principalmente se iniciado em fase avançada, é capaz de restaurar a saúde óssea em seu sentido mais completo, ou seja, não conhecemos meios para devolver-lhe a microarquitetura óssea, ainda que a quantidade de massa óssea venha a aumentar. O ideal seria garantir osso forte e resistente durante o crescimento, evitar doenças, hábitos de vida e drogas sabidamente capazes de diminuir massa óssea, e minimizar excesso medicamentoso e quedas para os idosos.

## QUADRO 1. Fatores de risco para osteoporose

---

### Idade ou relacionado à idade

Aumento de 1,4-1,8 vezes o risco para osteoporose a cada década de vida

### Genético

Étnico: Caucasóides e orientais > negros

Sexo: mulheres > homens

História familiar

### Ambiental

Deficiência de cálcio

Sedentarismo

Medicações: corticosteróides, anticonvulsivantes

Tabagismo

Quedas

### Endócrino ou doenças crônicas

Deficiência estrogênica

Deficiência androgênica

Gastrectomia

Hipertireoidismo

Cirrose hepática

Doença inflamatória intestinal

### Características físicas ósseas

Densidade

Tamanho e geometria

Microarquitetura e composição

---

## 2.2 Osteoporose secundária à gastrectomia

A osteoporose primária pode ocorrer em homens e mulheres, em qualquer idade, mas é mais freqüente nas mulheres após a menopausa e em homens em idade avançada. Por sua vez, o termo osteoporose secundária é aplicado quando identificamos causa responsável que não a idade e a deficiência estrogênica da menopausa natural. Uma série de causas secundárias, como endocrinopatias, doenças malignas, uso de medicações, doenças crônicas inflamatórias e gastrintestinais, podem determinar perda óssea e aumentar o risco de fraturas.

Aproximadamente 20% das mulheres inicialmente diagnosticadas como portadoras de osteoporose primária apresentam causa secundária identificável e, nos homens, esse percentual pode chegar a 64% (18, 31).

Um grupo importante de pacientes sob o risco de desenvolvimento de osteoporose secundária é aquele com desequilíbrio endócrino, seja endógeno ou exógeno. O tipo mais comum de osteoporose secundária é a induzida por corticóide, porque doses suprafisiológicas causam diminuição da formação e aumento da reabsorção óssea, perda renal de cálcio e diminuição de sua absorção intestinal. A incidência de fraturas osteoporóticas em pacientes usuários de corticóide pode chegar a 30 a 50% (32). O hipertireoidismo também está relacionado à perda óssea trabecular, caracterizada por aumento das áreas de reabsorção e do número de osteoclastos locais, mas o risco de fraturas é relativamente baixo, pela reversibilidade da osteopenia, com o tratamento adequado (33).

A ocorrência de osteoporose induzida pela heparina está relacionada ao tempo de uso (mais de quatro a cinco meses) e à dose (mais de 15.000 unidades ao dia), mas os mecanismos ainda não estão totalmente esclarecidos, sugerindo-se que esta droga seja capaz de estimular a diferenciação de osteoclastos (32). A utilização prolongada de anticonvulsivantes, como difenilhidantoína e fenobarbital, pode causar baixa massa óssea por acelerar o metabolismo hepático da vitamina D (34).



Um grupo heterogêneo de doenças do trato gastrointestinal e do fígado são responsáveis por distúrbios osteometabólicos, podendo ocorrer osteoporose, hiperparatireoidismo secundário ou osteomalácia, embora não sejam conhecidos os mecanismos que determinam que tipo específico de doença óssea cada paciente apresentará (35). O trato gastrointestinal está, obviamente, associado à absorção de nutrientes críticos à saúde óssea, e situações de enfermidade em qualquer de seus segmentos, seja pela presença de processo inflamatório, seja pela alteração anatômica em casos de ressecções, podem fazer com que distúrbios deles resultantes tenham influência negativa sobre a homeostase óssea.

Os distúrbios osteometabólicos que ocorrem em pacientes com doenças do trato gastrointestinal têm prevalência variável, e diminuição da massa óssea pode ser encontrada em até 50% dos pacientes com doença celíaca e em 41% dos pacientes com Doença de Crohn (36). Na doença celíaca os mecanismos etiopatogênicos incluem deficiência na absorção de cálcio e vitamina D, mas hipogonadismo e resistência periférica à testosterona em homens parecem contribuir. Pacientes com Doença de Chron parecem ter risco maior para osteoporose do que pacientes com colite ulcerativa, relacionando-se ao uso de corticóide, baixo índice de massa corporal e deficiência de testosterona.

Os osteoclastos são ativados por citocinas produzidas em vigência de processo inflamatório sistêmico, como as interleucinas 1, 6 e o fator de necrose tumoral. Os osteoblastos expressam um ligante de superfície (*receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand*, ou RANKL) que pode se ligar a receptores ativadores de osteoclastos (*receptor activator of NF- $\kappa$ B*, ou RANK) ou à osteoprotegerina, receptor solúvel e neutralizador, também produzido pelos osteoblastos (37-39). A importância deste sistema de interação entre células ósseas para melhor entendimento da osteoporose baseia-se em evidências nas quais a deficiência genética de RANKL, com conseqüente impossibilidade de ativação dos osteoclastos, leva a quadro grave de osteopetrose, e que o estrógeno aumenta os níveis de osteoprotegerina ao mesmo tempo em que diminui os de RANKL, minimizando ativação osteoclástica. Também existe relação reguladora entre RANKL e células efetoras dos processos inflamatórios e auto-imunes, linfócitos T e células dendríticas, podendo ser este um mecanismo pelo qual as doenças inflamatórias sistêmicas influenciam o

metabolismo ósseo, podendo levar ou contribuir para o aparecimento da osteoporose (40).

A gastrectomia é, reconhecidamente, um fator de risco para osteoporose (41-43), cuja incidência pode chegar a 40% dos pacientes submetidos ao procedimento cirúrgico (44). Em estudo epidemiológico, 355 homens americanos com mais de 60 anos foram avaliados com relação a fatores de risco para osteoporose e, após análise multivariada, a presença de gastrectomia correlacionou-se a baixa massa óssea, assim como a idade, a presença de artrite reumatóide e a corticoterapia (45). No estudo de Adachi (5), a incidência de osteoporose pós-gastrectomia foi de 37%: 18% em homens e 71% em mulheres, estando relacionada à idade e sexo feminino. Dados de um estudo multicêntrico envolvendo 9704 mulheres com mais de 65 anos, publicados em 1993, mostraram que a cirurgia gástrica se relacionava à baixa massa óssea em antebraço e calcâneo (46). A diminuição da massa óssea causada pela gastrectomia ocorre não só em sítios apendiculares como também na coluna vertebral (47).

Além de relacionar-se à baixa massa óssea, a gastrectomia também se associa ao aumento no risco de fratura. Num recente trabalho, foram estudados 730 homens com mais de 60 anos em seis países europeus e a gastrectomia foi encontrada em 3,6% dos pacientes com fratura de quadril, representando risco relativo de 1,79 (IC 95% 1,13-2,85) (48). Em estudo de 438 pacientes submetidos à gastrectomia por úlcera péptica, seguidos por 15,6 anos, a incidência de fratura de quadril foi de 25% com risco relativo de 2,5 (IC 95% 1,9-2,3) e a de vértebras foi de 41% com risco relativo de 4,7 (IC 95% 3,8-4,7) (47). As mulheres sofreram mais fraturas que os homens, 72% e 48%, respectivamente, e o risco de fratura não esteve associado ao tabagismo, alcoolismo ou índice de massa corporal. Em 2001, metanálise de Espallargues (49), identificou 80 fatores de risco para osteoporose e classificou-os de acordo com sua força de associação. Deste total, apenas 15% foram considerados alto risco para osteoporose quando presentes e a gastrectomia encontrava-se entre eles.

A prevalência de osteoporose pós-gastrectomia parece não diferir entre os dois procedimentos utilizados para realização da cirurgia, gastrectomia parcial ou total, e nem mesmo em relação à indicação da cirurgia, úlcera péptica ou neoplasia,

parece existir diferença (5) (47). O tempo decorrido da cirurgia parece estar relacionado a risco aumentado para osteoporose, pois Liedman, em 1997, não encontrou diferença na densidade mineral óssea de pacientes após cinco anos do procedimento cirúrgico quando comparados ao grupo controle, demonstrando que mais tempo seria necessário para o aparecimento da doença osteometabólica (50).

Durante longo período de observação, em média 20 anos, de 165 homens e 62 mulheres gastrectomizados, evidenciou-se osteoporose em 22% e 86% dos pacientes, respectivamente. Neste estudo o exame diagnóstico para a osteoporose foi a radiografia convencional do segundo metacarpo direito e o diagnóstico de osteomalácia baseou-se apenas na elevação da fosfatase alcalina e seu retorno aos níveis normais após teste terapêutico com vitamina D (51).

Em 1997, Zittel e colaboradores (52) estudaram 60 pacientes de ambos os sexos, cinco a vinte anos após a gastrectomia, utilizando radiografia convencional e tomografia computadorizada quantitativa da coluna lombar, além da dosagem sérica de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina. A diminuição do cálcio sérico em 68% dos pacientes operados, poderia explicar a prevalência de 55% de fraturas vertebrais encontrada nesses pacientes. A causa da hipocalcemia seria a diminuição da ingestão de leite e derivados para evitar a intolerância alimentar, a diminuição da liberação do cálcio ligado a proteínas pela ação ineficiente das proteases em ambiente agora alcalino, o aumento da velocidade do trânsito alimentar e a exclusão de áreas como o duodeno e jejuno proximal, impedindo a absorção de cálcio. Em estudo experimental em porcos gastrectomizados, Maier, em 1999 (53), observou que os animais poderiam apresentar dificuldade de absorção do cálcio, pois encontrou baixa densidade mineral óssea associada à hipocalcemia e aumento secundário dos níveis de PTH.

Contrariando a hipótese de dificuldade na absorção de cálcio pela perda da acidez gástrica, estudo da densidade mineral óssea em uso de drogas bloqueadoras da secreção ácida, não encontrou diferença significativa em relação ao grupo controle (54). Por outro lado, estudos comparando pacientes submetidos à gastrectomia ou vagotomia, mostraram que somente aqueles submetidos à ressecção gástrica evoluíram com baixa massa óssea (55, 56).

Um outro mecanismo passível de contribuição para a osteoporose pós-gastrectomia seria a diminuição da absorção da vitamina D ocasionada pela esteatorréia ou pela alteração da dieta, com menor oferta alimentar desta vitamina. Entretanto, parte da vitamina D utilizada no organismo humano provém da ação da luz solar sobre a pele, o que seria suficiente para suprir as necessidades diárias. Mellstron e colaboradores (57), em 1993, estudaram 129 homens submetidos à gastrectomia parcial comparando-os a um grupo controle. A idade média dos pacientes era de 72,1 anos e o tempo médio decorrido da cirurgia foi de 28,5 anos. Os resultados mostraram diminuição da massa óssea em pacientes operados em relação aos controles e maior prevalência de fraturas vertebrais (19% contra 4%). Neste estudo não foram encontradas diferenças nos níveis de cálcio, PTH ou vitamina D. De interesse, a endoscopia digestiva alta realizada em 78 pacientes após a cirurgia evidenciou a presença de gastrite atrófica em 76 deles, mas não relata pesquisa para a presença do Hp. A biópsia óssea marcada com tetraciclina foi realizada em sete pacientes com fraturas vertebrais e em nenhuma das amostras havia evidências de osteomalácia. Além disso, nos estudos de Liedman (50), os níveis de cálcio, fósforo e vitamina D também eram normais nos pacientes gastrectomizados.

Embora a gastrectomia tenha indicação cada vez menos freqüente, mais estudos são necessários para tentar esclarecer a etiopatogenia da doença óssea pós-gastrectomia, principalmente aqueles que envolvam mulheres, grupo mais predisposto à ocorrência da osteoporose.

### **2.3 Mucosa gástrica: componentes exócrino e endócrino**

A mucosa gástrica humana pode ser dividida em três tipos diferentes: a mucosa cárdica, restrita à zona proximal, próxima da abertura do esôfago e de função ainda desconhecida, a mucosa oxíntica (fúndica ou do corpo), a mais extensa e rica em células parietais responsáveis pela secreção de ácido e a mucosa

antral ou pilórica caracterizada pela presença de glândulas mucosas situada na região distal do órgão.

A estreita mucosa da região cárdica do estômago não é ainda bem definida pelos diversos autores, em parte devido ao fato de apresentar variações de seu padrão histológico entre diferentes indivíduos e mesmo entre diferentes regiões amostradas para exame. Possui glândulas mucosas, tipo antrais, freqüentemente com presença de numerosas células parietais ou mesmo apenas glândulas do tipo oxíntica.

Entre os diversos tipos celulares que compõem a mucosa gástrica fúndica, as células parietais apresentam características estruturais típicas, principalmente pela riqueza de mitocôndrias e de canálculos secretores, estes responsáveis pela produção de íons  $H^+$  que são secretados na luz do estômago, de considerável importância nos mecanismos digestórios locais. As células parietais são cúbicas ou cilíndricas baixas, apresentam núcleo em posição central, e citoplasma que se cora em vermelho intenso pela Hematoxilina-Eosina (HE). As células parietais se distribuem ao longo da espessura de toda a mucosa do corpo e fundo do estômago do homem, concentrando-se mais no terço médio e sendo mais rarefeitas na base da mucosa. Nesta última região localizam-se principalmente as células responsáveis pela secreção dos pepsinogênios, chamadas de células zimogênicas ou principais, de citoplasma mais basófilo quando coradas pelo HE. As fovéolas da mucosa oxíntica são curtas e constituídas por células mucosas que secretam produtos de pH neutro ou fracamente acidófilo, o mesmo acontecendo com o epitélio mucoso de revestimento.

Por sua vez, a mucosa antral é constituída quase que exclusivamente por glândulas mucosas que se abrem na luz através de fovéolas longas e revestidas por epitélio mucoso que também secretam mucinas neutras ou fracamente acídicas.

O Hp é encontrado exclusivamente na mucosa gástrica, e associa-se a inúmeras afecções, como a gastrite crônica, a úlcera péptica e o câncer gástrico. Sua presença está universalmente associada a achados histológicos de gastrite, mais intensa nas regiões do antro e cárdia, de onde, com o passar do tempo atinge

o corpo, resultando em redução da secreção ácida e, eventualmente, em diminuição da população de glândulas e conseqüente atrofia da mucosa (58).

A mucosa gástrica, do mesmo modo como a mucosa intestinal, é sede de numerosas células endócrinas, principalmente na região das glândulas oxínticas. No final da década de 1960, com o isolamento dos primeiros hormônios gastrintestinais e a produção de anticorpos contra os mesmos, iniciou-se a utilização e aperfeiçoamento de métodos imunocitoquímicos para a identificação dos diferentes hormônios nos tipos específicos de células endócrinas. Pearse verificou, estudando essas células, que elas eram capazes de descarboxilar o L-5-hidroxitriptofano e o L-diidroxifenilalanina em suas respectivas aminas, a serotonina e a dopamina, graças à enzima L-aminoácido descarboxilase, e passou a agrupá-las dentro de um grupo denominado Amine Precursor Uptake and Decarboxilation (APUD) (59).

Entre os mamíferos, as células endócrinas do sistema digestivo estão distribuídas ao longo da mucosa gastrintestinal, no pâncreas e vias biliares. As células endócrinas mais bem conhecidas são as antrais, com papéis mais ou menos bem definidos, e facilmente identificadas através de anticorpos. As células da mucosa cárdica têm sido pouco estudadas e, dados recentes, têm demonstrado que a maioria delas ou mesmo a única, são constituídas pelas células endócrina enterocromafim (EC) produtora de serotonina (60). Na mucosa oxíntica, apesar de sediar numerosas células endócrinas, não conhecemos bem todos os seus tipos nem o papel que cada uma desempenha na homeostase gástrica. O elemento predominante é a chamada célula *Enterochromaffin-like* (ECL), que não mantém contato com a luz glandular, ou seja, é fechada, muito sensível a gastrina, respondendo num primeiro momento através do aumento da atividade da enzima formadora de histamina, a histidina descarboxilase e, num segundo tempo, com hiperplasia celular (61). A histamina, provavelmente o mais importante estimulador da secreção ácida entre os mamíferos, provém de duas fontes na mucosa do corpo gástrico, das células ECL e dos mastócitos.

As células ECL podem ser facilmente identificadas através das características ultraestruturais de suas vesículas de secreção, que apresentam dimensões variáveis sendo, de um modo geral grandes, às vezes totalmente vacuolizados e outras vezes com “núcleo” (*core*) elétron-denso, pequeno e excêntrico. A mucosa gástrica

humana apresenta uma concentração relativamente pequena de células ECL e um número proporcionalmente maior de mastócitos e, na impossibilidade de se demonstrar com precisão as células ECL à microscopia ótica, alguns autores têm utilizado metodologia e critérios que dão números aproximados desses elementos. Por exemplo, aplicando-se a imunocitoquímica (Cromogranina A) ou utilizando-se o método da prata (Grimelius), obtém-se o número total de células endócrinas da mucosa, do qual se subtrai o número das células positivas para serotonina e somatostatina, considerando a diferença como o número de células ECL.

A análise ultraestrutural, quantitativa e qualitativa da mucosa oxíntica humana, através da microscopia eletrônica, mostra população mais heterogênea de células endócrinas, classificadas de acordo com seus grânulos de secreção. As células ECL foram as mais freqüentemente encontradas (30 a 40%), seguidas pelas células P (20 a 30%) e depois as células D (20 a 25%). As células P possuem grânulos de secreção semelhantes aqueles do epitélio respiratório, não apresentam produto conhecido e podem ser identificadas apenas pela microscopia eletrônica. Entre estas células endócrinas da mucosa oxíntica estariam aquelas responsáveis pela secreção de fator implicado na deposição de cálcio nos ossos.

Na mucosa antral ocorrem três tipos de células endócrinas, que podem ser caracterizadas morfológicamente à microscopia eletrônica ou pela imunocitoquímica; são as células G, produtoras de gastrina, as células D, produtoras de somatostatina e as células EC, que produzem serotonina. As células G compõem cerca de 60% das células endócrinas antrais, localizam-se no terço superficial da mucosa, próximas a luz glandular, de onde podem receber estímulos. As células D têm distribuição mais irregular e se localizam na metade basal da mucosa. As células EC antrais são menos numerosas, apresentam conteúdo serotoninérgico e seu papel fisiológico na mucosa gástrica é desconhecido.

A gastrina é o principal peptídeo da mucosa gástrica que regula a secreção ácida em suas três fases: cefálica, gástrica e intestinal, e estimula a proliferação dos componentes da mucosa do corpo gástrico. Por outro lado, a acidez é o principal fator inibidor da secreção de gastrina, ocorrendo através do estímulo de secreção de somatostatina pelas células D pela diminuição local do pH (62).

## 2.4 Mucosa gástrica e metabolismo ósseo

Tem sido verificado desde o início da década de 1970 que a gastrina e a pentagastrina têm efeito hipocalcemiante em ratos e suínos (63) (64). A princípio, tentou-se explicar que a diminuição dos níveis séricos de cálcio em resposta à gastrina pudesse ocorrer devido ao aumento da secreção de calcitonina pelas células C da tireóide (63). Schulak e Kaplan (65) demonstraram, em 1974, que a queda do cálcio sérico em resposta à gastrina ocorria mesmo em animais submetidos à retirada cirúrgica da tireóide e paratireóide, sugerindo que não havia dependência de liberação de calcitonina para explicar a hipocalcemia.

Posteriormente, realizaram experimento em que os animais eram submetidos a retirada cirúrgica de segmento intestinal, do estômago, dos rins e da glândula suprarenal, para então receberem a infusão de gastrina.(66) O objetivo desse estudo era avaliar a participação de outros órgãos que não a tireóide ou paratireóide, na resposta hipocalcemiante à administração da gastrina. Observaram que os animais continuavam a apresentar queda da calcemia em resposta à gastrina mesmo após ablação intestinal, renal ou suprarenal. Assim, estavam eliminadas as hipóteses de que a hipocalcemia induzida pela gastrina fosse ocasionada por aumento da excreção renal de cálcio, ação de substância *calcitonina-like* produzida pela suprarenal, ou por influência na ativação da vitamina D. Interessantemente, em animais nos quais o procedimento cirúrgico consistiu de gastrectomia, não foi observada a hipocalcemia esperada em resposta à gastrina, sugerindo a existência de um outro efector gástrico, e deixando um papel intermediário à gastrina. Estudou-se qual porção da mucosa gástrica seria responsável por tal efeito e demonstrou-se que a retirada de 25% distais da mucosa (antrectomia) não alterava a resposta hipocalcemiante, mas com a retirada da mucosa oxíntica (fundectomia), nenhuma alteração na dosagem de cálcio sérico acontecia após a infusão da gastrina. Estava então tendo início a idéia de que o estômago pudesse participar da homeostase do cálcio, assim como a calcitonina, o PTH e a vitamina D.

Ainda com relação à calcitonina, Fahrenkrug e colaboradores (67), em 1977, não encontraram influência da hipergastrinemia crônica nas concentrações séricas de calcitonina, observando os dados obtidos em 13 pacientes com elevação da



gastrina causada pela acloridria, em casos de anemia perniciosa. Um outro estudo, no início da década de 80, também não encontrou correlação entre a hipergastrinemia de pacientes com anemia perniciosa com os níveis sanguíneos de calcitonina (68). Mais uma vez, Kaplan e colaboradores (69) evidenciaram a participação do estômago na regulação do cálcio, demonstrando um efeito hipocalcemiante com a administração de gastrina, histamina e colecistocinina que, entretanto, era perdido quando os animais previamente eram submetidos à gastrectomia.

Estudo experimental, utilizando o rato como modelo, Per Person e colaboradores observaram que a colecistocinina, mas não a gastrina, era capaz de estimular a secreção de calcitonina pelas células C da tireóide (70). Em animais submetidos à antrectomia, com conseqüente diminuição dos níveis de gastrina, ou naqueles fundectomizados, com hipergastrinemia, o número de células C da tireóide e a concentração sérica de calcitonina mantiveram-se semelhantes aos controles.

Com o conhecimento de que ocorria hipocalcemia em resposta à gastrina, mais especificamente, através da mucosa oxíntica, estudos experimentais foram conduzidos no sentido de determinar qual órgão poderia estar sendo responsável pelo acúmulo deste cátion. Assim, a hipocalcemia em ratos, após a administração de gastrina, não pôde ser explicada pela deposição de cálcio nos rins, fígado, músculos e pulmões (71). Neste mesmo trabalho, a utilização de cálcio marcado (<sup>45</sup>Ca) sugeriu que a inibição do efluxo de cálcio dos ossos fosse o responsável pela hipocalcemia induzida pela gastrina. Os animais receberam o cálcio marcado e procedeu-se à retirada de uma tíbia para controle do osso contralateral. A seguir, administrou-se gastrina intraperitoneal para comparar, após uma hora, a quantidade de cálcio nos dois ossos. O resultado foi o achado de que a tíbia, sob a ação da gastrina, continha 25% a mais de cálcio do que a tíbia controle.

Com essa descoberta, iniciava-se agora uma nova etapa nos estudos das inter-relações entre mucosa gástrica e metabolismo ósseo que havia começado 10 anos atrás, quando ocorreram as primeiras observações entre os níveis séricos de cálcio e gastrina. Como era evidente a relação entre a mucosa oxíntica, com os níveis sérico de cálcio e sua retenção óssea, Persson e Hakanson (9), em 1989, apresentaram elegante trabalho tentando esclarecer a natureza do fator

hipocalcemiantes da mucosa oxíntica. Utilizando extratos de mucosa oxíntica, mostraram que a administração a animais gastrectomizados era capaz de restaurar o efeito hipocalcemiante de maneira idêntica ao da gastrina quando administrada a animais controles. Submetendo o extrato à digestão com duas diferentes enzimas, a leucina aminopeptidase e a tripsina, foi possível mostrar que o fator hipocalcêmico da mucosa gástrica era de natureza protéica e de baixo peso molecular. A ação da primeira enzima, mas não da segunda, causava inatividade do extrato em relação ao cálcio, sugerindo a existência de peptídeo sem aminoácidos básicos residuais. Neste mesmo trabalho, verificaram que a hipocalcemia em resposta à gastrina não ocorria por perda gástrica ou excreção renal de cálcio, uma vez que a queda do cálcio sérico não era acompanhada pelo aumento da quantidade deste cátion no suco gástrico e urina dos animais. Finalmente, a administração de gastrina ou do extrato obtido da mucosa oxíntica, mostrou aumento da captação do  $^{45}\text{Ca}$  em rádio e esterno, sugerindo que ambos, tanto o extrato quanto a gastrina, apresentam o mesmo efeito hipocalcêmico. Este achado, somado aos conhecimentos anteriores, indicava que a gastrina teria papel de mediadora desse efeito, ou seja, a gastrina estaria atuando sobre um fator presente na mucosa oxíntica que seria o responsável final pela hipocalcemia. Pela primeira vez, a partir desses achados, esse fator gástrico possivelmente responsável pela hipocalcemia, foi denominado gastrocalcina.

Em 1993, Persson e colaboradores (72) mostraram em estudo experimental que a falta da produção ácida do estômago não era responsável pela perda óssea observada em animais submetidos à gastrectomia, uma vez que a administração de omeprazol, um potente inibidor da secreção ácida, não ocasionava perda de massa óssea. Completando esse estudo, os autores forneceram um suplemento parenteral de cálcio a animais gastrectomizados, garantindo o aporte do íon, possivelmente não absorvido pela perda do ácido, resultado da retirada do estômago. Apesar da reposição, esses animais não deixaram de perder massa óssea, que chegou a 40% após seis semanas.

A importância da integridade da mucosa gástrica e da densidade óssea foi mais uma vez estudada em 1995, demonstrando-se uma perda da espessura dos ossos do crânio, através de análise microscópica, em ratos submetidos à gastrectomia, e que também ocorria apesar da reposição de cálcio (73).

Como a utilização de extrato protéico de mucosa oxíntica foi possível induzir a mesma hipocalcemia observada quando da administração da gastrina, inclusive em animais gastrectomizados, hipotetizou-se a existência de produto hormonal existente naquele extrato e que as células ECL poderiam ser as responsáveis pela sua produção. Essas células contêm numerosas vesículas e alguns grânulos densos, estocam histamina e peptídeos derivados da cromogranina-A, como a pancreastatina, em proporções variadas, e são as células endócrinas predominantes na mucosa oxíntica (74).

Assim, em 2001, demonstrou-se o efeito de extratos de grânulos e vesículas derivados de células ECL na mobilização do cálcio intracelular em culturas de osteoblastos (75). Os extratos causaram elevação do cálcio intracelular, mas isso não se deveu à ação da histamina ou da pancreastatina. Esse efeito pôde ser abolido pela pré-digestão pela leucina aminopeptidase, remetendo à existência de um novo hormônio osteotrópico produzido na mucosa gástrica, implicado no aparecimento da osteopenia pós-gastrectomia.

Em 2002, mais dois estudos publicados por Hakanson e colaboradores (76, 77) trouxeram novas informações sobre a doença óssea causada pela gastrectomia. Levando em consideração que a perda óssea advém do desequilíbrio entre formação e reabsorção ósseas, estudou-se a recuperação em defeito ósseo causado cirurgicamente na mandíbula de ratos previamente gastrectomizados e seus controles, sendo que os resultados não mostraram diferenças entre os dois grupos, sugerindo que o efeito osteopênico da gastrectomia ocorre por aumento da reabsorção óssea e não por diminuição da formação (77). Num segundo trabalho, os animais foram divididos em grupos para serem submetidos à gastrectomia e ooforectomia. O efeito da administração de bisfosfonato (alendronato), estrógeno ou PTH foi estudado quanto à capacidade de prevenir a osteopenia esperada após cada um desses procedimentos. Através do estudo da massa óssea em vértebra lombar e fêmur, constatou-se que o alendronato era capaz de prevenir a perda óssea após a gastrectomia e ooforectomia enquanto o estrógeno e o PTH somente demonstraram essa propriedade nos animais ooforetomizados. Este estudo, além de discutir os diferentes mecanismos de ação destas drogas, propõe, pela primeira vez, um diferencial terapêutico do alendronato e provavelmente de outros bisfosfonatos, no manejo de pacientes gastrectomizados com baixa massa óssea (76).

Todos os dados discutidos acima colocam em evidência a participação do estômago no metabolismo do cálcio e na densidade mineral óssea. Essa participação pode dever-se não só pela facilitação da absorção do cálcio e da vitamina D, mas também pela possível produção de um peptídeo capaz de influenciar o metabolismo ósseo, impedindo a reabsorção óssea ou aumentando a incorporação do cálcio nos ossos.

### **3. OBJETIVOS DO TRABALHO**

1. Estudar as alterações histopatológicas da mucosa gástrica, em pacientes do sexo feminino no período do climatério, enfatizando os seguintes parâmetros:
  - (a) Presença e características gerais da gastrite;
  - (b) Densidade glandular da mucosa antral e oxíntica, principalmente desta última, com ênfase na avaliação e número de células parietais e endócrinas como parâmetros para avaliar o grau de atrofia glandular;
  - (c) Presença do *Helicobacter pylori*.
2. Estudar a densidade mineral óssea das pacientes.
3. Correlacionar os resultados obtidos do estudo histopatológico da mucosa gástrica com aqueles da densitometria óssea.

### **4. PACIENTES E MÉTODO**

## 4.1 Pacientes

As pacientes foram atendidas no Ambulatório de Dispepsia do Serviço de Gastroenterologia e no Ambulatório do Serviço de Reumatologia, ambos funcionando no Anexo Bias Fortes da Faculdade de Medicina da UFMG, situado à Alameda Álvaro Celso, 175.

Os atendimentos foram agendados conforme demanda espontânea de ambos os serviços ou por encaminhamento médico. As queixas que motivaram as consultas e os encaminhamentos foram a presença de dispepsia e o próprio conhecimento da realização deste estudo por parte das pacientes. Após avaliação clínica, análise dos critérios de inclusão e exclusão, as pacientes foram orientadas sobre os objetivos do estudo, bem como todos os procedimentos envolvidos em suas etapas e, em conformidade com termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da UFMG (Anexo 1), deram seu consentimento por escrito em participar da pesquisa.

Os critérios de inclusão foram:

1. Pacientes do sexo feminino;
2. Pacientes com idade igual ou superior a 50 anos;
3. Pacientes há mais de cinco anos sem apresentar fluxos menstruais;
4. Pacientes em concordância em participar do estudo e que tivessem assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os critérios de exclusão foram:

1. Tabagismo;
2. Etilismo;
3. Uso de terapia de reposição hormonal;

4. Uso de anticonvulsivantes;
5. Uso de medicação bloqueadora da secreção ácida gástrica;
6. Uso de medicação antiinflamatória não-hormonal ou corticóide;
7. Uso de suplemento de cálcio, vitamina D ou seus metabólitos ativos (alfacalcidol ou calcitriol);
8. História de distúrbio tireoidiano ou uso de hormônio tireoidiano exógeno;
9. Presença de úlcera péptica ativa ou em cicatrização à endoscopia digestiva alta;
10. História de doença neoplásica ou síndrome de má-absorção intestinal;
11. Uso de diurético tiazídico.

As pacientes foram atendidas no período de março de 2002 a março de 2003 e cinquenta pacientes satisfizeram os critérios de inclusão, não apresentavam critérios para exclusão e concordaram em participar do estudo. As pacientes foram encaminhadas inicialmente para realização de teste respiratório e endoscopia digestiva alta, ambos no Instituto Alfa de Gastroenterologia no Hospital das Clínicas da UFMG. Após esta etapa, as pacientes foram encaminhadas para o Instituto de Patologia Clínica Hermes Pardini, à Rua Aimorés, 66, mediante agendamento prévio e de acordo com a conveniência individual, para coleta de amostra de sangue e exame de densitometria óssea.

Na amostra de sangue foram realizados os seguintes exames: hemograma, pesquisa para a presença do anticorpo anticélula parietal, e dosagens para determinação das concentrações séricas de cálcio iônico, fósforo, paratormônio, fosfatase alcalina óssea específica e vitamina B12.

Os métodos utilizados foram a quimioluminescência para o PTH e vitamina B12, o imunensaio por captura para a fosfatase alcalina óssea específica, o método do eletrodo seletivo com correção automática para a variação do pH para o cálcio iônico, o método cinético U.V. para o fósforo, a imunofluorescência para o anticorpo anticélula parietal, e a contagem automatizada através de citometria de fluxo para o

hemograma. Dois mililitros de soro foram congelados à - 70°C, para estudos posteriores.

A densitometria óssea foi analisada sempre por um único profissional após ter sido realizada em um único aparelho, utilizando-se equipamento Lunar Prodigy (GE Medical System, Lunar Radiation Corp., Madison, WI) sendo obtidas de todas as pacientes, medidas da densidade mineral óssea da coluna lombar e fêmur proximal direito, expressas em  $\text{g/cm}^2$  e em desvios-padrão em relação à média da densidade mineral óssea da população jovem (*T-score*) e da população de mesma faixa etária (*Z-score*).

Após a realização de todas as etapas do estudo, as pacientes foram solicitadas a retornarem para nova consulta médica para entrega dos resultados dos exames, orientação, acompanhamento e tratamento, se pertinente.

## **4.2 Estudo da infecção pelo Hp**

A presença da bactéria Hp foi avaliada através do teste respiratório com carbono marcado ( $^{13}\text{C}$ ), do teste da urease e da histologia. Os dois primeiros foram realizados no Instituto Alfa de Gastroenterologia e o terceiro no Laboratório de Patologia Digestiva e Neuroendócrina (LPDN). Foram consideradas infectadas as pacientes que apresentaram positividade para a presença da bactéria ao exame histológico ou em pelo menos dois dos exames acima relacionados.

## **4.3 Endoscopia Digestiva Alta**

Todos os exames endoscópicos foram realizados no Instituto Alfa de Gastroenterologia, sempre pelo mesmo profissional e seguindo um mesmo

protocolo. À aplicação de anestésico, para facilitar a introdução do endoscópio, seguiu-se a administração endovenosa de 2,5 mg de midazolam. Os aparelhos utilizados foram os endoscópios do Serviço de Endoscopia do Instituto Alfa de Gastroenterologia, das marcas Fujinon e Olympus, utilizando pinça padrão para biópsia endoscópica.

Foram colhidos, sempre nesta ordem, três fragmentos da mucosa antral (um distal, um proximal e um para teste da urease) e oito fragmentos da mucosa oxíntica, compreendendo quatro da grande curvatura e quatro da parede posterior. Duas amostras da mucosa oxíntica, uma da grande curvatura e outra da parede posterior, foram armazenadas a - 70°C para estudos posteriores.

#### **4.4 Colorações para estudo histológico**

Os fragmentos foram fixados em formol tamponado ou líquido de Bouin por quatro a seis horas, lavados em álcool 70% e mantidos nesta solução por 18 a 24 horas até o início do processamento para inclusão em parafina. Para esta última finalidade os fragmentos, sempre que possível, eram orientados através de exame em lupa estereoscópica Stemi SV 11 (Zeiss, Alemanha) para melhorar a obtenção de cortes histológicos de 4 µm contendo todos os elementos da mucosa gástrica, quais sejam: epitélio de revestimento, região foveolar, camada glandular e muscular da mucosa, esta última representada inteiramente ou apenas pela presença dos feixes musculares mais superficiais localizados na base da região glandular.

Todas as lâminas foram rotuladas de acordo com os registros padronizados do LPDN e separadas por região. Em todos os fragmentos da mucosa antral e oxíntica foram procedidas colorações pelo HE para avaliação histológica da mucosa gástrica. Após esta avaliação, somente fragmentos que apresentavam toda a espessura da mucosa foram selecionados para as colorações especiais para células parietais e endócrinas.

Utilizou-se para a demonstração de células parietais o método da imunoperoxidase indireta e anticorpo monoclonal específico (78). O método inclui



várias etapas de incubação dos cortes com anticorpos e, finalmente, a revelação. Entre cada uma das etapas os cortes foram lavados com PBS 0,01 M. As diferentes etapas de incubação foram:

1. Tratamento dos cortes histológicos com soro normal de coelho, diluído a 1:50 em PBS-BSA 0,5%, para células parietais, e incubação das lâminas em câmara úmida por 30 minutos;
2. Tratamento dos cortes histológicos com soro monoclonal (isotipo IgG2a) 5H7H8, diluído 1:8, que reage especificamente contra células parietais de mamíferos, seguido de incubação em câmara úmida a 4°C pelo período de 18-24 horas;
3. Tratamento dos cortes histológicos com anticorpo de coelho antitimoglobulinas de camundongo, conjugado com peroxidase (Dako Corporation), diluído a 1:100 em PBS-BSA, e incubação em câmara úmida por 30 minutos;
4. Três banhos consecutivos em tampão-fosfato 0,01 M, pH 7,2, por cinco minutos cada e revelação em solução de diaminobenzidina (25 mg%) em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,2, com 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, por cinco minutos, com controle ao microscópio;
5. Lavagem em tampão-fosfato 0,01 M, pH 7,2, e contra coloração com hematoxilina diluída por 30 segundos, desidratação e montagem em bálsamo.

Para verificação e estudo da distribuição das células endócrinas presentes na mucosa oxíntica, foi realizada a coloração pela prata, utilizando-se a técnica de Grimelius (79). Resumidamente, os cortes histológicos foram mergulhados em solução de nitrato de prata a 0,08 mg% em tampão acetato 0,02 M, pH 5,6, por 3,5 horas a 60°C. Após este período os cortes foram submersos em solução reveladora constituída de hidroquinona (1,0g) e sulfito de sódio anidro (5,0g) em 100 ml de água destilada por dois minutos, a 60°C, com controle microscópico.

#### **4.5 Avaliação histopatológica da mucosa gástrica**

Todos os fragmentos foram corados pelo HE para o estudo histológico da mucosa. Foi considerada dentro da normalidade a mucosa que apresentava ausência ou número muito reduzido de células inflamatórias mononucleadas dispersas na lâmina própria. Além disso, foi também utilizado como critério de normalidade a preservação da integridade morfológica do epitélio glandular.

A avaliação da presença e intensidade de infiltrado inflamatório na mucosa antral e oxíntica através da coloração pelo HE, foi feita considerando-se os seguintes aspectos: (a) presença de polimorfonucleares e mononucleares na lâmina própria, graduando-se a intensidade em discreta, moderada e intensa; (b) distribuição do infiltrado na mucosa (superficial, metade superior ou ocupando toda a mucosa); (c) presença de metaplasia intestinal; (d) presença de sinais histológicos convencionais de atrofia glandular, também graduada em discreta, moderada e intensa; (e) presença da bactéria Hp (80). A pesquisa do Hp foi feita em locais de epitélio gástrico íntegro, sem metaplasia intestinal, e nos casos em que a mucosa apresentava sinais inflamatórios. Não se encontrando a bactéria durante o exame histológico, procedeu-se a coloração pelo Giemsa para confirmação ou não do resultado.

#### **4.6 Avaliação da população de células parietais da mucosa oxíntica**

A atrofia glandular do corpo gástrico, assim como no antro, foi estudada primeiramente de acordo com a avaliação dos cortes histológicos corados pela HE, seguindo as recomendações do Sistema Sydney revisado para classificação de gastrites (80), que recomenda a utilização de uma escala visual para graduação da variável, classificando a atrofia em ausente, discreta, moderada ou intensa.

Posteriormente, o estudo da densidade glandular da mucosa oxíntica foi realizado nas lâminas coradas para células parietais, em microscópio binocular de luz, com auxílio de ocular reticulada, em aumento 400 vezes (ocular de 10 vezes e objetiva de 40 vezes). O retículo da ocular era constituído por um quadrado dividido em 10 colunas e 10 fileiras. No aumento utilizado (400X), cada lado do quadrado media 0,2 mm (200  $\mu$ m) e cada divisão menor, 0,02 mm.

Em cada um dos fragmentos selecionados para a contagem de células parietais, seguiu-se um mesmo procedimento: contagem das células marcadas com o anticorpo específico dentro da abrangência da ocular reticulada que era movida perpendicularmente, a partir da base da mucosa, em direção ao epitélio superficial. Foram contadas tantas colunas quantas foram possíveis, em cortes que apresentavam toda a espessura da mucosa. Muitos dos fragmentos obtidos da mucosa oxíntica não puderam ser utilizados para esta finalidade em virtude de terem sido cortados tangencialmente. A área foi então calculada considerando-se a altura média da mucosa glandular e a extensão percorrida pela ocular reticulada. Desta maneira, foi calculada a densidade de células parietais (células/  $\text{mm}^2$ ) em cada lâmina e, posteriormente, para cada paciente.

#### **4.7 Avaliação da população de células endócrinas da mucosa oxíntica**

O estudo da população de células endócrinas na mucosa oxíntica foi realizado em lâminas contendo fragmentos submetidos à coloração de Grimelius, que evidencia todas as células endócrinas da mucosa com exceção das células D. Para esta avaliação utilizou-se microscópio de luz, e foram contadas as células positivas para a prata, em toda a espessura da mucosa, da base ao epitélio de revestimento. Esta espessura geralmente abrangia um ou dois campos microscópicos no aumento de 400x. Nestas condições, o diâmetro do campo microscópico era de 0,45 mm e para o cálculo da área foi realizada a medida da altura média da mucosa em cada fragmento submetido à contagem. As contagens foram feitas nos mesmos fragmentos por dois observadores independentemente.

Convencionou-se contar somente células que exibiam morfologia e localização características. O resultado final expressa a média da densidade de células endócrinas (células/ mm<sup>2</sup>) encontrada cada fragmento.

## **5. Análise estatística**

Para o armazenamento e análise de dados foi empregado o programa estatístico SPSS 8.0 (Statistical Package for social Sciences) para Windows, Chicago, IL, USA. Para todos os testes de significância utilizou-se o nível de confiança de 95%. Para avaliação de diferença entre freqüências foi utilizado o teste do Qui-quadrado e para avaliação de diferença entre variáveis contínuas utilizou-se o teste T de Student e a regressão linear.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Avaliação das pacientes

Foram examinadas, no período de março de 2002 a março de 2003, aproximadamente 120 pacientes provenientes da região metropolitana de Belo Horizonte, das quais 55 pacientes foram incluídas neste estudo, por satisfazerem inicialmente os critérios de inclusão e concordarem em participar. Todas as pacientes foram avaliadas clinicamente e acompanhadas durante todo o estudo pelo mesmo pesquisador (A.M. Kakehasi).

Com a realização dos exames laboratoriais, foram excluídas pacientes que apresentaram pesquisa para o anticorpo contra células parietais positiva, num total de quatro, e uma paciente para a qual foi feito o diagnóstico de hiperparatireoidismo, devido à elevação do PTH e hipercalcemia, confirmados em duas ocasiões. Esta última paciente foi encaminhada à Endocrinologia para avaliação complementar e cirurgia. Assim, 50 pacientes constituíram o grupo que seguiu o estudo conforme o protocolo determinado. A idade média das pacientes foi de  $61,6 \pm 7$  anos, variando de 50 a 79 anos e o tempo médio de climatério foi de  $12,7 \pm 8$  anos; 41 (82%) pacientes eram pardas, sete (14%) brancas e duas (4%), negras. O índice de massa corporal (IMC) variou de 20 a 43, com média de  $27,3 \pm 4,5$ . A média de gestações por paciente para aquelas que engravidaram foi de  $5 \pm 3,82$ , e 86% delas amamentaram. Vinte e sete por cento das pacientes praticavam atividade física regular, mais freqüentemente caminhada, e 17 (33%) delas relatavam ingestão diária de dois ou mais copos de leite.

Seis pacientes (12%) apresentavam história de fraturas ósseas, sendo quatro fraturas de punho, uma vertebral e uma de quadril. A média de idade para as pacientes com história de fratura foi de 68,5 anos; três delas apresentavam osteoporose, e as outras três, osteopenia. Por outro lado, a idade média das

pacientes sem relato de fratura foi de 61 anos. História familiar para osteoporose foi positiva em sete casos (14%).

Queixas dispépticas estiveram presentes em 41 (82%) pacientes. As mais freqüentes foram dor epigástrica em queimação em 25 pacientes e empachamento pós-prandial em nove. Outras queixas compreendiam náuseas, pirose e desconforto em hipocôndrio esquerdo em duas pacientes cada, e disfagia e eructação em uma paciente cada.

Nenhuma paciente apresentou alteração nos níveis séricos de vitamina B12, anemia ou outro distúrbio hematológico. Os níveis de PTH, cálcio, fósforo e fosfatase alcalina óssea específica estavam dentro dos limites da normalidade. Os dados sumarizados referentes às características clínicas das pacientes são mostrados na TAB 1.

TABELA 1. Características clínicas de 50 pacientes do sexo feminino, no período do climatério, estudadas no presente trabalho.

Característica	Resultados (%)
Idade média (anos)	61,7 ± 7
Índice médio de massa corporal (Kg/m <sup>2</sup> )	27,3 ± 4,5
Menopausa (tempo médio/anos)	12,7 ± 8
História fratura prévia	6 (12)
História familiar para osteoporose	7 (14)
Exercício físico regular	13 (27)
Ingestão de leite (≥ 400mg Ca/dia)	17 (33)
Queixas dispépticas	41 (82)

## 6.2 Avaliação endoscópica

O exame endoscópico revelou, em 44 (88%) pacientes, sinais de pangastrite enantematosa leve predominantemente do antro. Em quatro pacientes o achado endoscópico foi compatível com gastrite enantematosa antral e em duas pacientes a mucosa gástrica apresentava aspecto normal. Em 11 pacientes estavam presentes também as seguintes alterações: cicatriz de úlcera duodenal em três casos, pólipos gástricos em dois casos, esofagite e hérnia de hiato por deslizamento em dois casos e pâncreas ectópico, erosões superficiais, atrofia mucosa e duodenite em um caso cada um deles.

## 6.3 Avaliação histológica da mucosa gástrica

O estudo histológico pelo HE, dos fragmentos das regiões antral e oxíntica da mucosa gástrica das 50 pacientes, revelou:

1. Mucosa gástrica sem alterações histopatológicas relevantes (normal), 11 pacientes (FIG.1);
2. Gastrite antral ou predominantemente antral, 7 pacientes;
3. Pangastrite crônica ativa (GC ativa do antro e do corpo) sem evidências de atrofia glandular, 12 pacientes;
4. Pangastrite crônica ativa com sinais de atrofia glandular, 20 pacientes (FIG.2). A atrofia foi classificada como discreta em 10, moderada em 3 e intensa em 7, de acordo com a avaliação da população glandular da mucosa oxíntica e antral. A atrofia da mucosa oxíntica foi o parâmetro para a classificação, considerando sempre obrigatória a presença de sinais histológicos de atrofia da mucosa oxíntica.

Esses resultados são mostrados na TAB.2.

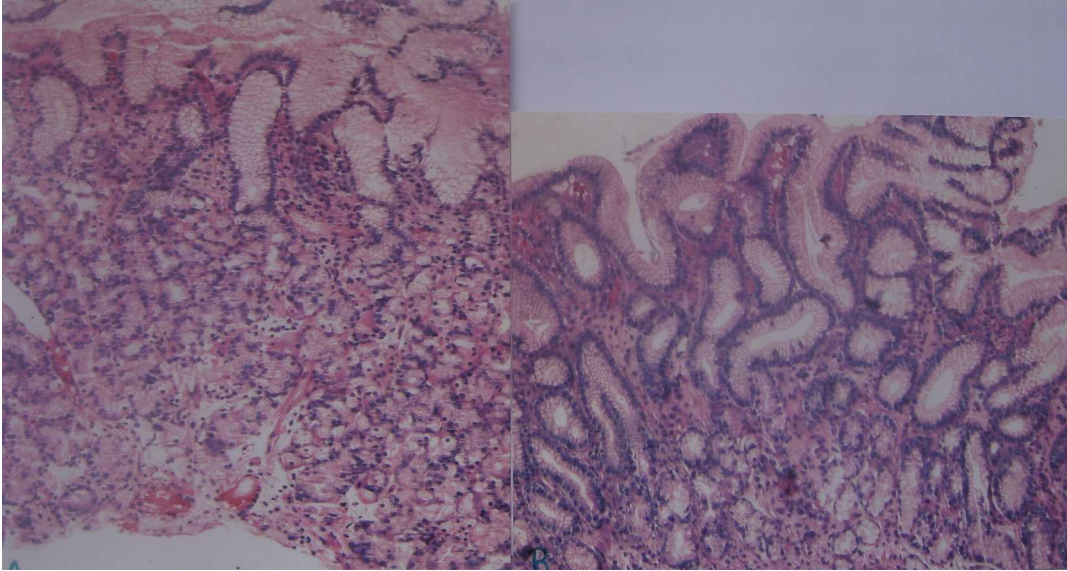


FIGURA 1. Mucosa gástrica oxíntica sem alterações histopatológicas relevantes (normal), A- corpo, B - antro, HE, 50X..



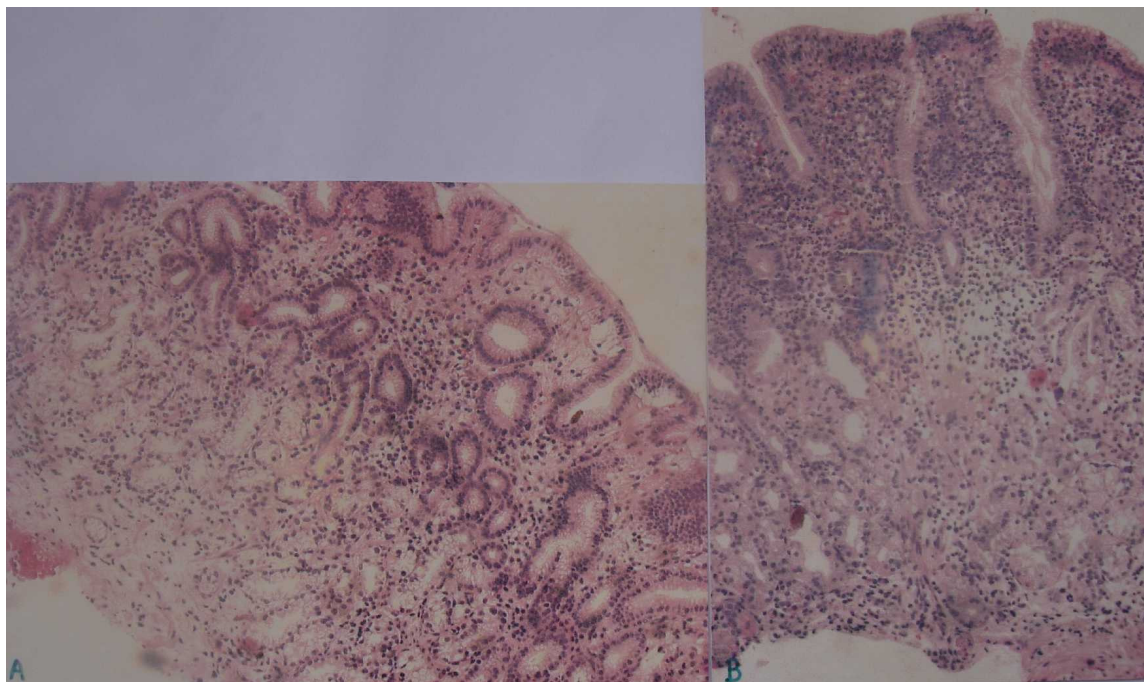


FIGURA 2. Mucosa gástrica oxíntica evidenciando gastrite crônica ativa com sinais de atrofia glandular, A- corpo, B - antro, HE, 50X.

#### 6.4 Avaliação da infecção pelo Hp

O teste respiratório, realizado por todas as pacientes, foi positivo em 34 (68%). A presença do Hp visualizado à histologia ocorreu em 34 casos (68%) e o teste da urease, realizado em 41 casos, foi positivo em 27 deles (66%). Assim, a prevalência da infecção pelo Hp foi de 68%. Nenhuma paciente com mucosa gástrica normal à avaliação histológica estava infectada pelo Hp; por outro lado, 90% daquelas com gastrite crônica ativa e sinais de atrofia eram positivas (TAB.2).

TABELA 2. Diagnóstico histológico da mucosa gástrica e prevalência da infecção pelo Hp em 50 mulheres no período do climatério.

Diagnóstico histológico (%)	Nº de pacientes	Hp positivo (%)
Normal (22)	11	0
Gastrite antral ou predominante em antro (14)	07	5 (71)
Pangastrite crônica ativa, sem atrofia (24)	12	11 (92)
Pangastrite crônica ativa, atrofia discreta (20)	10	9 (90)
Pangastrite crônica ativa, atrofia moderada/intensa (20)	10	9 (90)

### 6.5 Avaliação da população de células parietais da mucosa oxíntica

A média da densidade de CP foi de  $855 \pm 208$  CP/mm<sup>2</sup> para as pacientes em geral. As pacientes foram agrupadas de acordo com a presença ou não de atrofia glandular em três grupos: (a) sem atrofia, 30 pacientes, (b) atrofia discreta, 10 pacientes e (c) atrofia moderada/intensa, 10 pacientes (FIG.3). Em correspondência com estes grupos classificados de acordo com a presença de atrofia glandular à histologia, observou-se as seguintes populações de CP/mm<sup>2</sup>: grupo sem atrofia,  $948 \pm 152$ ; grupo com atrofia discreta,  $816 \pm 157$ , e grupo com atrofia moderada/intensa,  $618 \pm 208$  (TAB.3). A diferença da média de CP/mm<sup>2</sup> entre estes três grupos foi estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

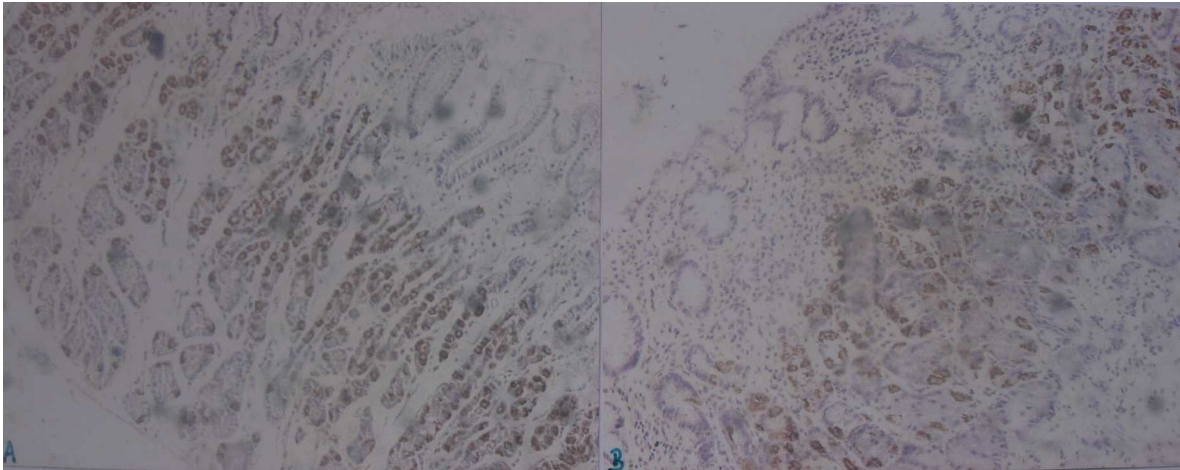


FIGURA 3. Células parietais da mucosa gástrica oxíntica, A - sem atrofia, B - com atrofia, pela imunohistoquímica, 50X.

TABELA 3. Densidade de células parietais, segundo a presença de atrofia, na mucosa gástrica de 50 mulheres no período do climatério.

Diagnóstico histológico	Nº de pacientes	Média de células parietais/mm <sup>2</sup>	
Mucosa gástrica sem sinais de atrofia	30	948 ± 152	
Pangastrite crônica ativa, atrofia discreta	10	816 ± 157	P<0,001
Pangastrite crônica ativa, atrofia moderada/intensa	10	618 ± 208	

## 6.6 Avaliação da população de células endócrinas da mucosa oxíntica

A média de CE/mm<sup>2</sup> foi de  $179 \pm 80$  CE/mm<sup>2</sup> para as pacientes em geral (FIG.4). Em relação ao grau de atrofia da mucosa gástrica, a densidade de CE/mm<sup>2</sup> foi  $183 \pm 91$  para o grupo sem atrofia,  $199 \pm 67$  CE/mm<sup>2</sup> para o grupo com atrofia discreta e  $144 \pm 43$  CE/mm<sup>2</sup>, para o grupo com atrofia moderada/intensa. Não houve diferença significativa entre esses resultados (TAB.4).

A relação entre a densidade de CP e das CE (CP/mm<sup>2</sup> / CE/mm<sup>2</sup>) foi de  $6,4 \pm 3$  no grupo sem atrofia e  $4,87 \pm 1,45$  no grupo com atrofia. A diferença entre as relações não foi estatisticamente significativa.

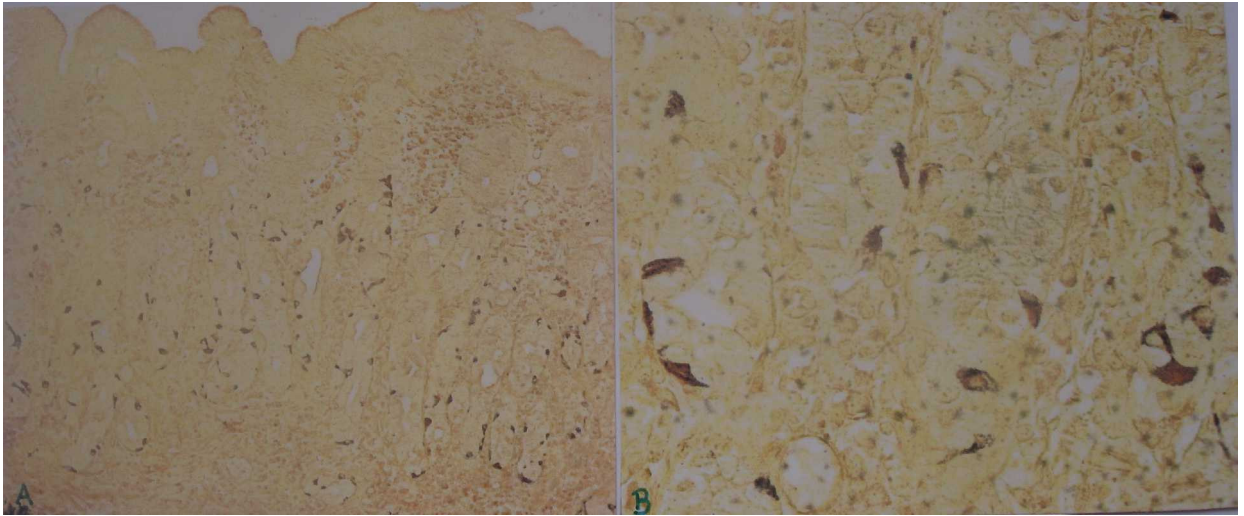


FIGURA 4. Células endócrinas da mucosa oxíntica, Grimelius, A – 50X e B - 100X

TABELA 4. Densidade de células endócrinas, segundo presença de atrofia na mucosa gástrica de 50 mulheres no período do climatério.

Diagnóstico histológico	Nº de pacientes	Média de células endócrinas/mm <sup>2</sup>
Mucosa gástrica sem sinais de atrofia	30	183 ± 91
Pangastrite crônica ativa, atrofia leve	10	199 ± 67
Pangastrite crônica ativa, atrofia moderada/intensa	10	144 ± 43

P>0,05

### 6.7 Avaliação da densidade mineral óssea da coluna lombar e fêmur

A densitometria forneceu resultados da medida óssea na coluna lombar e no fêmur proximal em números absolutos e classificados de acordo com os critérios da OMS (13), descrito como se segue:

1. Até -1,0 DP: densidade óssea normal;
2. De -1,0 a -2,5 DP: osteopenia;
3. Abaixo de -2,5: osteoporose.

Dezoito (36%) pacientes apresentavam osteoporose da coluna lombar (FIG.5), 21 (42%) osteopenia e 11 (22%) apresentaram densidade óssea normal à densitometria (FIG.6). Com relação ao fêmur, o estudo da densidade mineral óssea

mostrou osteoporose em 3 (6%) casos, osteopenia em 23 (46%) e 24 (48%) pacientes apresentaram densidade óssea normal à densitometria.

O tempo de menopausa para pacientes com densidade mineral óssea em coluna lombar normal, osteopenia e osteoporose foi de 14, 13 e 12 anos, respectivamente ( $p=0,61$ ). O IMC também não foi diferente em pacientes com e sem osteoporose na coluna lombar, 26 e 27, respectivamente ( $p=0,38$ ). Os dados referentes à densidade mineral óssea em coluna lombar e fêmur das 50 pacientes estão na TAB. 5.

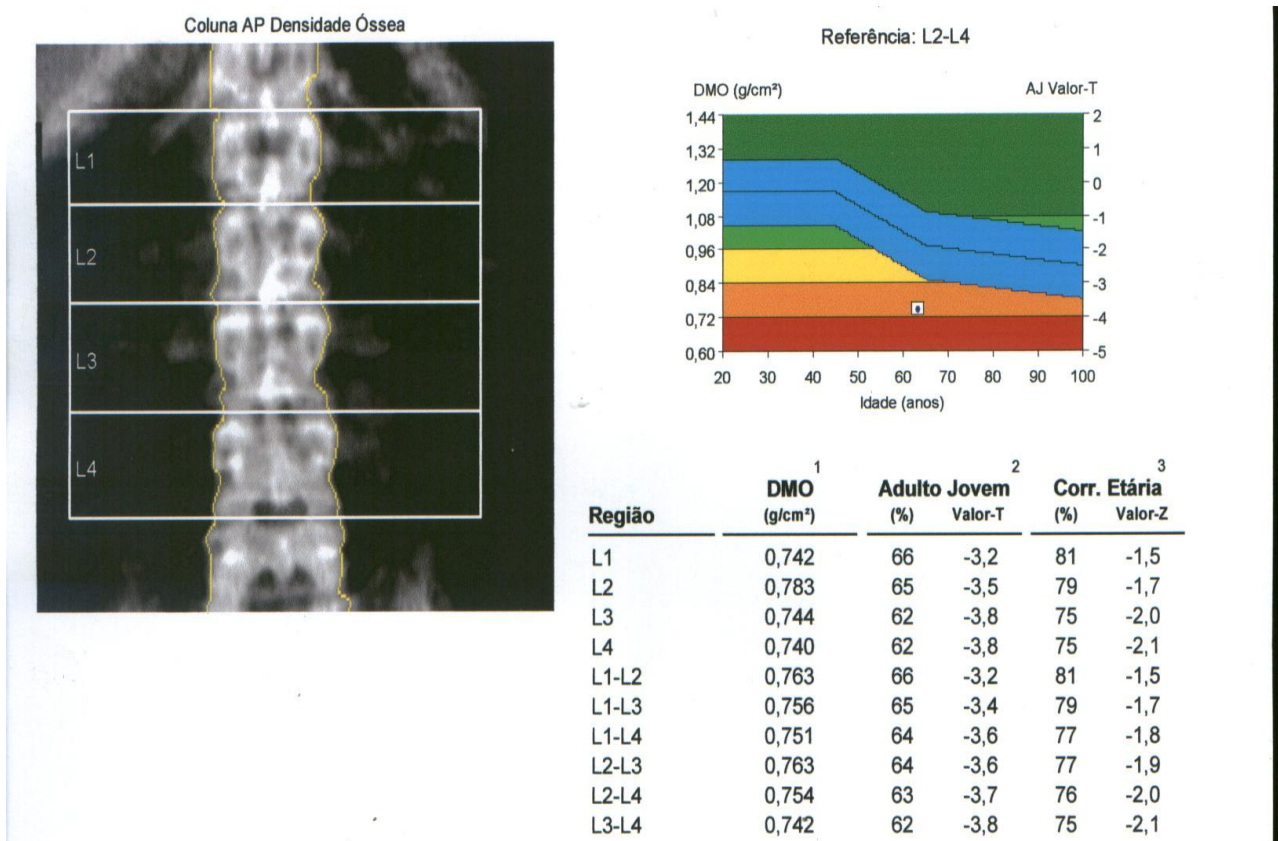


FIGURA 5. Densitometria óssea evidenciando osteoporose em coluna lombar (T-score L1-L4 = -3,6).

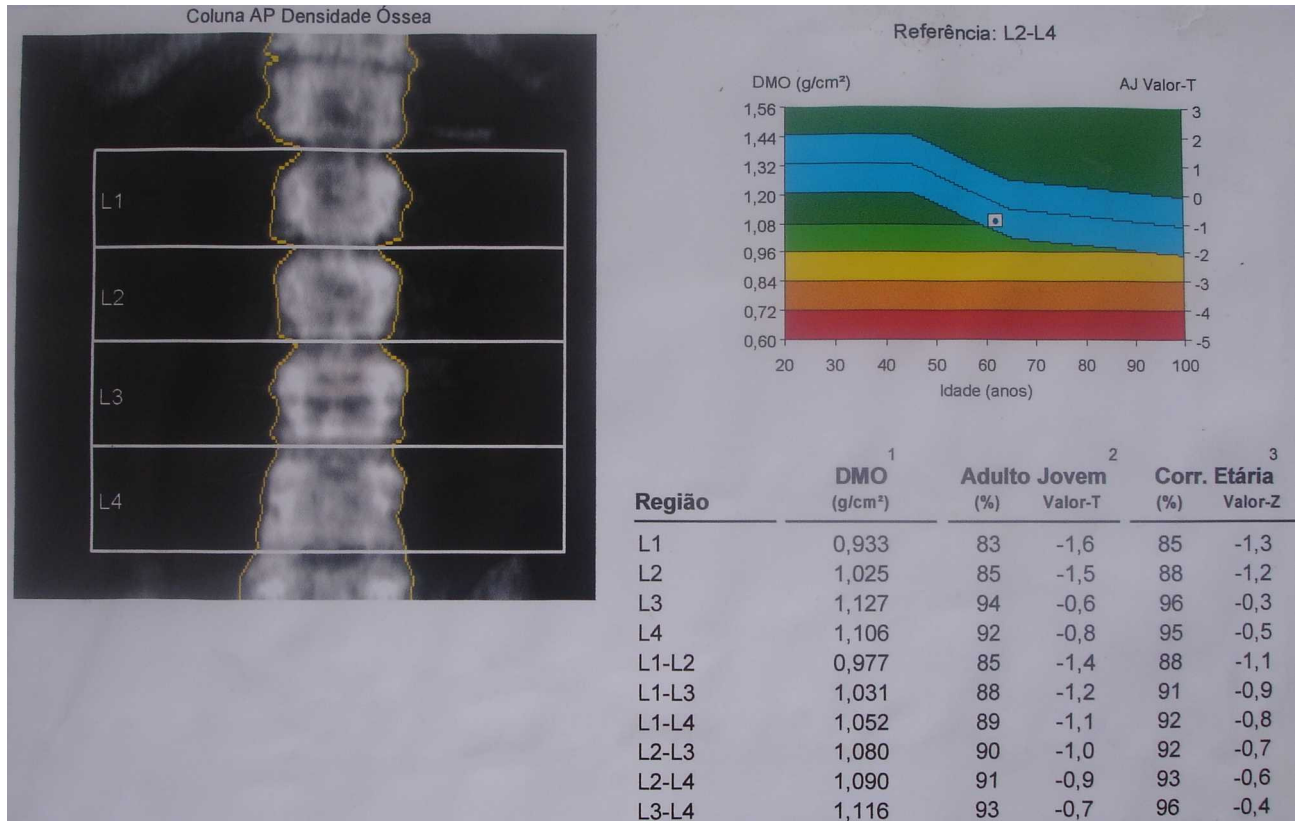


FIGURA 6. Densitometria óssea evidenciando densidade mineral óssea normal em coluna lombar (T-score L2-L4 = - 0,9).



TABELA 5. Diagnóstico densitométrico em coluna lombar e fêmur em 50 mulheres no período do climatério.

Densidade mineral óssea	Coluna lombar (%)	Fêmur (%)
Normal	11 (22)	24 (48)
Osteopenia	21 (42)	23 (46)
Osteoporose	18 (36)	3 (6)
Total	50 (100)	50 (100)

### 6.8 Correlação entre CP, CE e densidade mineral óssea

As pacientes foram divididas em dois grupos, com e sem osteoporose, este último englobando pacientes com densidade mineral óssea normal, e aquelas classificadas como osteopênicas. Isto foi feito tanto para coluna lombar como para fêmur proximal. Os dois grupos não diferiam entre si quanto à idade, IMC, idade da menarca e tempo de menopausa. (TAB.6).

A densidade média de CP na mucosa oxíntica para pacientes sem osteoporose da coluna lombar foi de  $804 \pm 203$  CP/mm<sup>2</sup> e de  $948 \pm 188$  CP/mm<sup>2</sup> para o grupo com osteoporose. A análise estatística mostrou relação significativa entre o número de CP e a presença de osteoporose da coluna lombar, sendo que pacientes com osteoporose mostraram maior densidade de CP,  $p=0,038$  (TAB.7). De fato, das 18 pacientes com osteoporose apenas cinco (28%) apresentavam sinais histológicos de atrofia glandular e baixa densidade de CP, enquanto que em 15 das 32 (47%) pacientes sem osteoporose foram encontrados sinais de atrofia da mucosa oxíntica. Procedendo-se à análise multivariada incluindo idade, IMC e prevalência de infecção pelo Hp, esta correlação continua presente.

A média da densidade de CE, corada pelo Grimelius, na mucosa oxíntica, foi  $179 \pm 80$  CE/mm<sup>2</sup> para o grupo em geral,  $190 \pm 101$  CE/mm<sup>2</sup> para o grupo com osteoporose da coluna lombar e  $173 \pm 66$  CE/mm<sup>2</sup> para o grupo sem osteoporose. A relação CP/CE para os grupos com e sem osteoporose em coluna lombar foi  $6,4 \pm 3,7$  e  $5,2 \pm 2,3$ , respectivamente. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a densidade de células endócrinas e relação CP/CE, nos grupos com e sem osteoporose em coluna lombar (TAB.8).

TABELA 6. Características clínicas das 50 pacientes segundo a presença ou ausência de osteoporose na coluna lombar.

Característica	Sem osteoporose	Com osteoporose	
Idade média (anos)	62	61	p=0,70
Índice de massa corporal (Kg/m <sup>2</sup> )	27	26	p=0,38
Menarca (média, anos)	16	13	p=0,28
Tempo de menopausa (média, anos)	13	12	p=0,43

TABELA 7. Densidade de células parietais da mucosa oxíntica, de acordo com a presença de osteoporose da coluna lombar em 50 mulheres no período do climatério.

Densidade mineral óssea	N (%)	Células parietais (CP/mm <sup>2</sup> )	
Normal/ Osteopenia	32 (64)	804 ± 203	
Osteoporose	18 (36)	948 ± 188	p=0,038

TABELA 8. Densidade de células endócrinas e relação CP/CE na mucosa oxíntica, de acordo com a presença de osteoporose em coluna lombar, em 50 mulheres no período do climatério.

Densidade mineral óssea	N (%)	Células endócrinas (CE/mm <sup>2</sup> )*	Relação CP/CE**
Normal/Osteopenia	32	173 ± 66	5,2 ± 2,3
Osteoporose	18	190 ± 101	6,4 ± 3,7

\* p=0,49

\*\* p=0,18

### 6.9 Correlação entre infecção pelo Hp e densidade mineral óssea da coluna lombar

A prevalência da infecção pelo Hp nos pacientes com densidade mineral óssea normal em coluna lombar foi 64% (sete em 11 pacientes), 81% naqueles com osteopenia (17 em 21) e 55% naqueles com osteoporose (10 em 18). Estas diferenças não foram estatisticamente significativas,  $p=0,22$  (TAB.9).

TABELA 9. Prevalência da infecção pelo Hp e correlação com a densidade mineral óssea da coluna lombar em 50 mulheres no período do climatério.

Densidade mineral óssea	n	<i>Helicobacter pylori</i> (%)	
Normal	11	7 (64%)	
Osteopenia	21	17 (81%)	$p = 0,22$
Osteoporose	18	10 (55%)	
Total	50	34 (68%)	

## 7. DISCUSSÃO

O crescente reconhecimento da importância da osteoporose, a elevada prevalência da infecção pelo Hp, bem como evidências epidemiológicas e experimentais que relacionam a mucosa gástrica a distúrbios osteometabólicos, foram os motivos que levaram à realização desta pesquisa. Entretanto, poucos dados existem na literatura que possam esclarecer o verdadeiro elo entre mucosa gástrica e doença osteometabólica. Trabalhos realizados em laboratório, utilizando-se principalmente o rato como modelo, têm demonstrado possível correlação entre estômago e tecido osso. Embora na espécie humana algumas doenças do tubo digestivo, como a doença inflamatória intestinal (DII) e a doença celíaca (36), sejam freqüentemente associadas a distúrbios osteometabólicos, poucos dados sobre mecanismos etiopatogênicos estão disponíveis na literatura sobre o estômago. Assim sendo resolveu-se proceder ao presente trabalho levando-se em consideração principalmente os trabalhos do grupo de pesquisadores da Universidade de Lund, Suécia, correlacionando conteúdo mineral ósseo com possíveis fatores osteotróficos presentes na mucosa gástrica oxíntica.

A osteoporose é definida como doença sistêmica, caracterizada por baixa massa óssea e deteriorização da microarquitetura, com conseqüente fragilidade óssea e aumento no risco de fraturas. De acordo com dados da OMS, uma em cada três mulheres brancas com idade entre 60 e 70 anos, terá osteoporose e aos 80 anos esse percentual será de 70% (81). Fratura óssea é a manifestação clínica final indesejável da osteoporose, mais freqüente em punho, fêmur e corpos vertebrais. A incidência de fraturas de quadril nos Estados Unidos, no ano de 1990, ultrapassou 200.000, com estimativa que este número seja de 450.000 no ano de 2025 e mais de 500.000 em 2050 (82). No Brasil, no ano de 1998, ocorreram 94.120 fraturas vertebrais e cerca de 70.000 de punho ou fêmur. Calcula-se que os custos financeiros tenham atingido, somente em relação às fraturas de fêmur, cerca de R\$ 27.300.000,00 (3). A fratura de fêmur apresenta mortalidade de 25% no primeiro ano, decorrente, em grande parte, de processos infecciosos e fenômenos

tromboembólicos. Mais da metade das pacientes necessitam de algum tipo de auxílio definitivo após a fratura, com prejuízo da independência para a vida diária (4).

Apesar do número de pessoas afetadas pela osteoporose poder chegar a 75.000.000 na Europa, Estados Unidos e Japão (83), com o advento de métodos complementares não invasivos capazes de mensurar a massa óssea e aumento dos custos sócio-econômicos das fraturas, é que a osteoporose tornou-se motivo de numerosos estudos, cujos resultados mudaram a visão mundial sobre a enfermidade. Com o reconhecimento de fatores de risco para osteoporose e desenvolvimento de drogas antireabsortivas eficazes, a intervenção médica pôde alterar o curso natural da doença, reduzindo a ocorrência de fraturas e suas conseqüências clínicas.

Mesmo com a evolução dos conhecimentos sobre os aspectos epidemiológicos, diagnósticos e terapêuticos da osteoporose, e com seu crescente custo sócio-econômico, este problema ainda não é abordado de maneira efetiva em programas de cuidados à saúde, principalmente considerando-se que 70% dos brasileiros utilizam o sistema público de saúde. Dados do Departamento de População e Indicadores Sociais, sobre assistência médico-sanitária do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2002, mostram que existiam apenas dois aparelhos de raio-X para densitometria óssea disponíveis ao Sistema Único de Saúde, na cidade de Belo Horizonte e Região Metropolitana.

A osteoporose é classificada em primária ou secundária, esta última ocorrendo quando estão presentes fatores ou condições clínicas e ambientais responsáveis pela perda óssea (32, 84). Embora um dos fatores mais comuns ao aparecimento da osteoporose seja a deficiência estrogênica causada pela atrofia ovariana primária da menopausa, diferentes alterações hormonais podem contribuir para baixa massa óssea. Amenorréia primária ou secundária, inclusive aquela causada pela corticoterapia, ou mesmo hipogonadismo subclínico, são capazes de impedir aquisição máxima ou diminuir a massa óssea. Além do uso de corticóide, muitos medicamentos podem interferir negativamente no tecido ósseo. A difenilhidantoína e o fenobarbital são capazes de acelerar o metabolismo da vitamina D, enquanto a heparina e vários agentes imunossupressores causam osteoporose através de mecanismos variados.

Entre tantas doenças sistêmicas contribuintes para osteoporose secundária, como hiperparatireoidismo, hipertireoidismo e mieloma múltiplo, estão as doenças do fígado e do trato gastrointestinal (35, 36, 85). Na doença celíaca, redução na densidade mineral óssea tem sido encontrada em até 47% das mulheres acometidas e os mecanismos etiopatogênicos incluem deficiência na absorção de cálcio e vitamina D, hipogonadismo e resistência periférica a testosterona em homens. Pacientes com Doença de Crohn têm até 41% de redução na massa óssea, que se relaciona ao uso de corticóide, baixo índice de massa corporal e deficiência de testosterona.

A necessidade de tratamento cirúrgico para úlcera péptica é, hoje, exceção, em grande parte pela disponibilidade de potentes drogas inibidoras da secreção ácida e do tratamento para erradicação do *H.pylori*. Apesar disso, pacientes operados anos atrás, hoje na sexta ou sétima décadas de vida, ainda representam grupo alvo para doenças osteometabólicas, pois a gastrectomia é, reconhecidamente, um fator de risco para osteoporose. Apesar de vários estudos tentarem estabelecer a etiologia da doença óssea pós-gastrectomia, não existem evidências para defini-la de modo exato; costuma-se explicá-la através da deficiência na absorção de cálcio e vitamina D, e através das alterações anatômicas e funcionais do trato digestivo (86, 87). A incidência da osteoporose pode chegar a 40% nos pacientes submetidos a este cirúrgico (44) o que também se associa ao aumento no risco de fratura. A prevalência de osteoporose pós-gastrectomia parece não diferir entre os dois procedimentos utilizados para realização da cirurgia, gastrectomia subtotal e total, e nem mesmo em relação à indicação da cirurgia, úlcera péptica ou neoplasia, parece existir diferenças. Por sua vez, o tempo decorrido da cirurgia está relacionado ao risco aumentado para osteoporose, com diminuição da massa óssea mais significativa sendo observada em pacientes mais idosos e do sexo feminino.

Após longo período de observação, em média 20 anos, de 165 homens e 62 mulheres gastrectomizados, evidenciou-se osteoporose em 22% e 86% dos pacientes, respectivamente. Os problemas desse estudo encontram-se patentes na metodologia, na medida em que o exame diagnóstico para a osteoporose foi a radiografia convencional do segundo metacarpo direito e o diagnóstico de

osteomalácia baseou-se apenas na elevação da fosfatase alcalina e seu retorno aos níveis normais após teste terapêutico com vitamina D (51).

Em 1997, Zittel e colaboradores (52) estudaram 60 pacientes de ambos os sexos, cinco a vinte anos após a gastrectomia, utilizando a radiografia convencional e tomografia computadorizada quantitativa da coluna lombar, além da dosagem sérica de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina. A diminuição do cálcio sérico em 68% dos pacientes operados, poderia explicar a prevalência de 55% de fraturas vertebrais encontrada nesses pacientes. A causa da hipocalcemia seria a diminuição da ingestão de leite e derivados para evitar a intolerância alimentar, a diminuição da liberação do cálcio ligado a proteínas pela ação ineficiente das proteases em ambiente agora alcalino, o aumento da velocidade do trânsito alimentar e a exclusão de áreas como o duodeno e jejuno proximal, impedindo a absorção do cátion.

Outro mecanismo passível de contribuição para a osteoporose pós-gastrectomia seria a diminuição da absorção da vitamina D ocasionada pela esteatorréia ou pela alteração da dieta, com menor oferta alimentar desta vitamina. Entretanto, grande parte da vitamina D utilizada no organismo humano provém da ação da luz solar sobre a pele, cuja produção pode suprir as necessidades diárias. Além disso, estudos têm demonstrado absorção normal de vitamina D, e níveis séricos de PTH dentro da normalidade em pacientes gastrectomizados. Mellstron e colaboradores (57), em 1993, estudaram 129 homens submetidos à gastrectomia parcial comparando-os a pacientes de um grupo controle. A idade média dos pacientes era de 72,1 anos e o tempo médio decorrido da cirurgia foi de 28,5 anos. Os resultados mostraram diminuição da massa óssea e maior prevalência de fraturas vertebrais (19% contra 4%) em pacientes operados em relação aos controles. Neste estudo não foram encontradas diferenças nos níveis de cálcio, PTH ou vitamina D. De interesse, a endoscopia digestiva alta realizada em 78 pacientes após a cirurgia evidenciou a presença de gastrite atrófica em 76 deles, mas não relata pesquisa para a presença do Hp. A biópsia óssea marcada com tetraciclina foi realizada em sete pacientes com fraturas vertebrais e em nenhuma das amostras havia evidência de osteomalácia.

Reconhecida há mais de 60 anos atrás, embora inúmeros estudos tenham tentado avaliar a doença óssea pós-gastrectomia, muitos de seus aspectos ainda



estão sem definição. Os diversos métodos propedêuticos empregados para medida da massa óssea, com variações de acurácia e precisão, e a realização do exame em diferentes locais do esqueleto, com composição óssea particular, não permitem avaliação conjunta dos resultados. Outro ponto importante está no fato de que os grupos de pacientes nos estudos incluíam homens e mulheres, com predominância dos primeiros e, ainda, freqüentemente, não há relato do controle ou exclusão de fatores de risco para osteoporose. Embora a gastrectomia tenha indicação cada vez menos freqüente, mais estudos são necessários para tentar esclarecer a etiopatogenia da doença óssea pós-gastrectomia, principalmente aqueles que envolvam mulheres, grupo mais predisposto à osteoporose.

A produção de ácido pelas células parietais da mucosa gástrica pode auxiliar a absorção de cálcio por torná-lo mais disponível a partir dos alimentos, e esse poderia ser um dos fatores que, perdido com a gastrectomia, poderia influenciar negativamente o metabolismo ósseo, culminando com o aparecimento da doença osteometabólica (88). Estudos da densidade mineral óssea em pacientes submetidos à vagotomia ou em uso de drogas bloqueadoras da secreção ácida, não encontraram diferenças significativas em relação aos grupos controles (54). Como parece não haver incidência aumentada de doença osteometabólica em pacientes submetidos a procedimentos que reduzem a produção ácida do estômago sem que seja efetuada a ressecção cirúrgica da mucosa gástrica, com é o caso da vagotomia, este fato mostra que a presença do ambiente ácido diminuído pelo uso de medicamentos não afeta de forma importante a absorção do cálcio necessário à manutenção do metabolismo ósseo equilibrado.

Estudos experimentais, utilizando o rato como modelo, têm mostrado, ao longo das duas últimas décadas, influência da mucosa gástrica no metabolismo do cálcio e manutenção da integridade óssea. Após reconhecimento da osteopenia que se desenvolvia em decorrência da retirada cirúrgica do estômago dos animais, utilizando elaboradas e elegantes metodologias de estudos, foi possível a um grupo de pesquisadores suecos descrever que a presença de um peptídeo, provavelmente produzido na mucosa oxíntica e então denominado gastrocalcina, poderia evitar a perda óssea quando administrado a animais gastrectomizados. Vale ressaltar que a deficiência de cálcio em animais gastrectomizados, por diminuição de absorção, foi evitada pela administração parenteral de doses fisiológicas deste íon.

Como são conhecidos efeitos ou influência de fatores hormonais, como estrógeno, cortisol e hormônio tireoidiano sobre o tecido ósseo, e tendo em vista evidências provenientes dos estudos experimentais que mostraram o efeito de um extrato protéico produzido pelas células ECL da mucosa oxíntica sobre a massa óssea, torna-se intrigante estudar possíveis inter-relações entre as células do sistema APUD e o metabolismo ósseo.

Permanecendo abertos os caminhos para melhor entendimento etiológico da doença osteometabólica pós-gastrectomia e da própria osteoporose primária, levanta-se então a questão de como a mucosa gástrica intacta poderia, ao longo do envelhecimento, participar deste contexto. Até o momento, não se conhece estudo sobre a condição histológica da mucosa gástrica em mulheres no período da menopausa, com especial atenção à descrição quantitativa do componente glandular da mucosa ou caracterização e quantificação das células endócrinas.

A mucosa gástrica sofre profundas mudanças histológicas em vigência da infecção pelo Hp, com recrutamento de células inflamatórias, alteração da arquitetura normal do epitélio glandular e hipergastrinemia, com conseqüente distúrbio endócrino, caracterizado por estímulo à hiperplasia das células ECL. Considerando-se possível a participação da mucosa gástrica, exócrina ou endócrina, no metabolismo ósseo, torna-se evidente a necessidade de incluir nessa linha de pesquisa, as conseqüências da infecção pelo Hp. Um estudo epidemiológico europeu mostrou aumento da prevalência da infecção pelo Hp em pacientes com osteoporose da coluna lombar, utilizando o método sorológico para detecção da infecção (10). Infelizmente, o estudo não descreve a condição da mucosa gástrica desses pacientes e apenas pacientes do sexo masculino foram incluídos.

Com relação ao presente estudo, ressaltam-se algumas características metodológicas importantes, que foram obedecidas com a intenção de se proceder a uma avaliação precisa de possível correlação entre mucosa gástrica e metabolismo ósseo. Foram selecionados critérios de exclusão cujo objetivo era evitar fatores de confusão, ou seja, não foram incluídas pacientes com características clínicas que pudessem ter influência sobre a massa óssea, como uso de terapia de reposição hormonal, o uso de determinadas medicações, como diurético tiazídico ou anticonvulsivantes, o tabagismo, o etilismo, a presença de distúrbio tireoidiano,

doença neoplásica ou má-absorção. Não foram incluídas pacientes que estivessem fazendo uso de antiinflamatórios não-hormonais, corticóide ou medicação bloqueadora da secreção ácida do estômago, para que nenhuma alteração decorrente do uso dessas drogas pudesse interferir com a avaliação histopatológica da mucosa gástrica. Todas as pacientes foram submetidas aos exames nos mesmos laboratórios e no caso da endoscopia digestiva alta, esta foi realizada sempre pelo mesmo pesquisador, tornando uniforme a execução dos procedimentos e obtenção dos dados.

Para a avaliação da massa óssea foi utilizada a densitometria óssea através da absorciometria de raio-X de dupla energia, considerado o padrão ouro para diagnóstico da osteoporose e avaliação de risco de fraturas (89), também realizada sempre no mesmo equipamento e avaliada pelo mesmo profissional.

A prevalência de osteoporose na coluna lombar nesta amostra foi de 36% (18 pacientes), semelhante aos dados da literatura para pacientes acima de 50 anos (2). Com relação às fraturas, encontramos quatro fraturas de antebraço, uma de quadril e uma de vértebra, resultando numa prevalência de 12%. A prevalência de fraturas vertebrais em mulheres aos 65 anos é estimada em 27% (19), e a menor prevalência de fraturas vertebrais encontrada neste estudo, pode dever-se à dificuldade do diagnóstico clínico e radiológico deste tipo de fratura. Além disso, a idade média das pacientes do estudo, de 61,7 anos, corresponde à idade em que são mais prevalentes as fraturas de antebraço. As fraturas vertebrais e do quadril constituem um problema maior para pacientes aos 70 e 80 anos de idade, respectivamente.

Os grupos com e sem osteoporose em coluna lombar não eram diferentes entre si quanto à idade, IMC, idade da menarca e tempo decorrido de menopausa. No Estudo Europeu Prospectivo para Osteoporose, que envolveu 3402 mulheres, menarca após 16 anos de idade associou-se a risco aumentado de fraturas vertebrais enquanto tabagismo, etilismo, atividade física e ingestão de leite não estiveram consistentemente relacionados a fraturas vertebrais.

Apesar de não ter sido aplicado questionário específico para avaliar o grau de conhecimento das pacientes em relação à osteoporose, pôde-se perceber pequena familiaridade com o significado da osteoporose e, até mesmo, confusão do termo

“osteoporose” com osteoartrite, por exemplo. Menos da metade das pacientes praticava atividade física regular (três vezes/semana), e apenas 33% ingeria dois ou mais copos de leite ao dia (400 mg de cálcio elemento/dia). Esta impressão é confirmada pelo estudo de Geller, que constatou pouco conhecimento sobre fatores de risco para osteoporose, e menor importância para esta doença quando comparada ao câncer de mama ou mal de Alzheimer.

Com relação à mucosa gástrica, este estudo mostrou que as pacientes do sexo feminino no período pós-menopausa apresentaram alterações caracterizadas por pangastrite crônica ativa em 32 casos (64%), gastrite antral em 7 (14%) e mucosa sem alterações histológicas relevantes em 11 (22%). Nenhuma paciente com a mucosa gástrica normal apresentava infecção pelo Hp, enquanto a bactéria esteve positiva em 34 das 39 pacientes com alterações inflamatórias à histologia (87%), confirmando a importância da relação entre a infecção pelo Hp e gastrite. O sistema de classificação histológica utilizado foi o Sistema de Sydney que avalia a presença de atrofia através de uma escala visual, em discreta, moderada e intensa. Neste estudo, além do diagnóstico histológico, procedeu-se à contagem das células parietais, especificamente marcadas por anticorpo monoclonal.

Além disso, estudou-se a densidade de CP na mucosa gástrica e sua correlação com a densidade mineral óssea. Embora não tenhamos estudado toda a superfície da mucosa oxíntica para avaliação precisa da população de células parietais, o método aqui utilizado permite descrição bastante adequada dessas células, uma vez que foram estudados fragmentos de diferentes regiões da mucosa oxíntica, padronizadas para grande curvatura e parede posterior do estômago. Além disso, o método utilizado foi específico para a coloração das células parietais, empregando anticorpos monoclonais produzidos pelo grupo vinculado ao Laboratório de Patologia Digestiva e Neuroendócrina e que, através de testes em várias espécies de animais, mostrou-se reativo apenas contra células parietais (78). Estudos ultraestruturais com este anticorpo (imunogold), mostraram que o mesmo revela um produto antigênico localizado apenas nas membranas dos canálculos secretores das células parietais (90).

O fato de encontrarmos relação entre densidade de CP e presença de osteoporose, em que pacientes com a mucosa preservada (sem atrofia)

apresentaram menor densidade mineral óssea, reforça o questionamento, agora baseado nos dados objetivos aqui descritos, da participação do meio ácido gástrico na absorção de cálcio. Pode-se admitir que esse fator não estaria envolvido na etiologia da doença osteometabólica pós-gastrectomia, e que no grupo de mulheres no período do climatério aqui estudado, a atrofia gástrica com conseqüente diminuição da produção ácida pelas CP, também não estaria relacionada à presença osteoporose. Todas pacientes, com ou sem osteoporose, apresentavam níveis sanguíneos de cálcio, fósforo, fosfatase alcalina óssea específica e PTH dentro dos limites da normalidade, indicando integridade nos mecanismos de absorção do cálcio.

De interesse, além de pacientes com osteoporose apresentarem maior densidade de CP na mucosa oxíntica, foi o fato de não ter sido encontrado relação entre os níveis de vitamina B12 e densidade mineral óssea. O fator intrínseco, necessário à absorção de vitamina B12 e produzido pelas CP, tem sua produção diminuída em pacientes com anemia perniciosa, esta caracterizada por atrofia intensa da mucosa gástrica e presença de anticorpos anticélula parietal. Em metanálise publicada em 2001, a anemia perniciosa, situação de intensa escassez de CP na mucosa do corpo gástrico, foi considerada fator de risco para osteoporose (49). Em 2003, trabalho publicado por Dhonukshe-Rutten (91) revelou que, numa amostra de 143 mulheres, os níveis de vitamina B12 estiveram inversamente relacionados à densidade mineral óssea.

Não houve diferença significativa em relação às células endócrinas e à presença de osteoporose, como ocorreu com o componente exócrino da mucosa oxíntica. Entretanto, a relação entre as células exócrinas e as células endócrinas da mucosa oxíntica (CP/CE) não foi diferente nos grupos com e sem osteoporose em coluna lombar, 6,4 e 5,2, respectivamente, o que traz o raciocínio de que as células endócrinas, possivelmente, acompanharam a variação das CP. Como as CE apresentam distribuição irregular ao longo da mucosa do estômago, ocasionando variação considerável nas contagens, e a coloração utilizada neste trabalho, o método de Grimelius, tem como característica marcar todas células endócrinas da mucosa gástrica, à exceção das células D, pode não ter sido possível observar desordens de populações celulares individuais. Deve-se ainda ponderar a possibilidade de que alterações das células endócrinas relacionadas ao metabolismo

ósseo sejam de ordem qualitativa. Ainda assim, pôde ser realizado um estudo quantitativo geral das células endócrinas da mucosa gástrica de mulheres no período do climatério, até o momento inexistente. Embora as células ECL estejam fortemente vinculadas à atividade das células parietais, dois trabalhos não evidenciaram alterações quantitativas significativas destes elementos em pacientes hipergastrinêmicos, com úlcera duodenal (92, 93) e estudo mais detalhado dessas células deverão completar a avaliação, quando os diversos tipos celulares serão identificados e quantificados, com ênfase nas células ECL, possível produtoras do peptídeo denominado gastrocalcina, implicado diretamente no metabolismo ósseo.

## 8. CONCLUSÕES

No presente trabalho foram estudadas consecutivamente 50 mulheres no período do climatério que preencheram os quesitos para inclusão na pesquisa. Estudaram-se: (a) as alterações histopatológicas da mucosa gástrica com ênfase no grau de atrofia da mucosa oxíntica, avaliada subjetivamente através do exame histológico e, objetivamente, pela avaliação da densidade de células parietais e endócrinas, (b) a presença de infecção pelo Hp e, (c) a densidade mineral óssea e a correlação entre eles. Finalmente, os resultados obtidos foram correlacionados, o que permitiu as seguintes conclusões:

1. Em 32 (64%) pacientes a mucosa gástrica revelou pangastrite crônica ativa, e em 20 (40%) delas, havia sinais de atrofia da mucosa oxíntica;
2. A prevalência de osteopenia e osteoporose da coluna lombar nesta amostra, foram de 42% (21 pacientes) e 36% (18 pacientes), respectivamente, esta última semelhante àquela encontrada na literatura para pacientes com mais de 50 anos;
3. A prevalência de osteoporose em fêmur nesta amostra de pacientes foi de 6%, menor do que a relatada na literatura;
4. A prevalência da infecção pelo Hp nas 50 pacientes foi de 68% (34 pacientes). Nenhuma paciente com mucosa gástrica normal estava infectada pelo Hp. Não houve diferença na taxa de infecção entre mulheres com e sem osteoporose;
5. A densidade de células parietais esteve inversamente relacionada à densidade mineral óssea, sendo que pacientes com a mucosa melhor preservada apresentaram densidade mineral óssea da coluna lombar menor do que aquelas com atrofia glandular. Este dado obteve significância estatística, questionando mais uma vez a necessidade do ambiente ácido para manutenção da integridade do metabolismo ósseo;

6. Não foi encontrada diferença significativa na densidade das CE entre mulheres com ou sem osteoporose como ocorreu para densidade de CP;
7. A relação CP/CE foi igual para os dois grupos, demonstrando que o número de CE acompanhou o de CP.



## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 1993;94:646-50.
2. Melton LJI. How many women have osteoporosis now? *J Bone Miner Res* 1995;10:175-7.
3. Carneiro RA. Epidemiological aspects of osteoporosis in Brazil. *Bone* 2001;29(3):298.
4. Barret-Connor E. The economics and human costs of osteoporotic fracture. *Am J Med* 1995;98:3-8.
5. Adachi Y, Shiota E, Matsumata T, Iso Y, Yoh R, Kitano S. Osteoporosis after gastrectomy: bone mineral density of lumbar spine assessed by dual-energy X-ray absorptiometry. *Calcif Tissue Int* 2000;66(2):119-22.
6. Bisballe S, Eriksen EF, Melsen F, Mosekilde L, Sorensen OH, Hessev I. Osteopenia and osteomalacia after gastrectomy: interrelations between biochemical markers of bone remodelling, vitamin D metabolites, and bone histomorphometry. *Gut* 1991;32(11):1303-7.
7. Eddy RL. Metabolic bone disease after gastrectomy. *Am J Med* 1971;50(4):442-9.
8. Heiskanen JT, Kroger H, Paakkonen M, Parviainen MT, Lamberg-Allardt C, Alhava E. Bone mineral metabolism after total gastrectomy. *Bone* 2001;28(1):123-7.
9. Persson P, Hakanson R, Axelson J, Sundler F. Gastrin releases a blood calcium-lowering peptide from the acid-producing part of the rat stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(8):2834-8.
10. Nielsen H, Langdahl BL, Hansen JM, Moller M, Ostergaard L. *Helicobacter pylori* is increased in osteoporosis. *Gut* 2000;47(suppl 1):A88.

11. Sambrook PN, Dequeker J, Rasp HH. Osteoporosis. In: Klippel JH, Dieppe PA, editors. *Rheumatology*. London: Fiona Foley; 1998. p. 36.1-36.10.
12. Wasnich RD. Epidemiology of osteoporosis. In: Favus MJ, editor. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Third ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 249-251.
13. Kanis J, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltsev N. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1994;9:1137-1141.
14. Wasnich R. Bone mass measurement: prediction of risk. *Am J Med* 1993;95:65-105.
15. Solanki T, Hyatt RH. Ethnic variation in epidemiology of hip fracture. *BMJ* 1995;310(6973):193.
16. Elffors I, Allander E, Kanis JA, Gullberg B, Johnell O, Dequeker J, et al. The variable incidence of hip fracture in southern Europe: the MEDOS Study. *Osteoporos Int* 1994;4(5):253-63.
17. Marques Neto JF, Lederman R. *Osteoporose - Ano 2000*. Ed. Limay. 1995.
18. NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. *JAMA* 2001;285:785-795.
19. Melton LJ. Epidemiology of vertebral fracture in women. *Am J Epidemiol* 1989;129:1000-1011.
20. Melton LJ, 3rd. Epidemiology of hip fractures: implications of the exponential increase with age. *Bone* 1996;18(3 Suppl):121S-125S.
21. Matkovic V, Chesnut C. Genetic factors and acquisition of bone mass. *J Bone Miner Res* 1987;2((suppl)):A329.
22. Remus LS, Whitfield GK, Jurutka PW. Functional evaluation of endogenous VDR alleles in human fibroblasts cell lines: relative contributions of F/f and L/S genotypes to 1,25(OH)<sub>2</sub>vitaminD<sub>3</sub> ELICITED vdr TRANSACTIVATION ABILITY. *Bone* 1998;23((suppl)):S198.

23. Riggs BL, Khosla S, III. MLJ. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res* 1998;13:763-773.
24. Heaney RP. Pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. In: Favus MJ, editor. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. third ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 252-254.
25. Ross PD. Predicting bone loss and fracture risk with biochemical markers. *J Clin Densitometry* 1999;2:285-294.
26. Greenspan SL, Parker RA, Ferguson Lea. Early changes in biochemical markers on bone turnover predict the long-term response to alendronate therapy in representative elderly women/; a randomized clinical trial. *J Bone Miner Res* 1998;13:1431-1438.
27. Jonhston CC. Identification of patients with low bone mass by single photon absorciometry and single energy x-ray absorciometry. *Am J Med* 1995;98 suppl 2A:37-40.
28. Jergas M, Genant HK. Current methods and recents advances in the diagnosis of osteoporosis. *Arthritis Rheum* 1993;36:1649-62.
29. Baran DT, Faulkner KG, Genant HKea. Diagnosis and management os osteoporosis: guidelines for the utilization of bone densitometry. *Calcif Tissue Int* 1997;61:433-40.
30. Johnston CC, Epstein S. Clinical, biochemical, radiogrphic, epidemiologic, and economic features of osteoporosis. *Orthopedic Clin North Am* 1981;12:559-569.
31. Baillie SP, Davison CE, Johnson FJ, al. e. Pathogenesis of vertebral crush fractures in men. *Age Ageing*. 1992;21(2):139-41.
32. Gennari C, Martini G, Nuti R. Secondary osteoporosis. *Aging (Milano)* 1998;10(3):214-24.
33. Diamond T, Vine J, Smart R, Butler P. Thyrotoxic bone disease in women: a potentially reversible disorder. *Ann Intern Med* 1994;120:811.

34. Richens A, Rowe DJF. Disturbance of calcium metabolism by anticonvulsant drugs. *Br Med J* 1970;4:73-76.
35. Sylvester FA. Bone abnormalities in gastrointestinal and hepatic disease. *Curr Opin Pediatr* 1999;11(5):402-7.
36. Scott EM, Gaywood I, Scott BB. Guidelines for osteoporosis in coeliac disease and inflammatory bowel disease. *Gut* 2000;46(Suppl I):i1-i8.
37. Lacey DL, Timms E, Tan HL, al. e. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-76.
38. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, al. e. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(7):3540-5.
39. Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, al. e. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol* 1999;145(3):527-38.
40. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, al. e. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997;390(6656):175-9.
41. Rejman F. Postgastrectomy syndrome. A clinical study based upon 100 patients. *Ann Chir Gynaecol Fenn Suppl* 1970;170:1-63.
42. Southerland JC, Valentine JF. Osteopenia and osteoporosis in gastrointestinal diseases: diagnosis and treatment. *Curr Gastroenterol Rep* 2001;3(5):399-407.
43. Włodarczyk A, Bielecki K, Talalaj M, Marcinowska-Suchowierska E, Zawadzki J, Ciok M, et al. Long-term consequences of surgical treatment of peptic ulcer. *Mater Med Pol* 1994;26(1):13-6.
44. Bernstein CN, Leslie WD, Leboff MS. AGA technical review on osteoporosis in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology* 2003;124(3):795-841.
45. Orwoll ES, Bevan L, Phipps KR. Determinants of bone mineral density in older men. *Osteoporos Int* 2000;11(10):815-21.

46. Bauer DC, Browner WS, Cauley JA, Orwoll ES, Scott JC, Black DM, et al. Factors associated with appendicular bone mass in older women. The study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Ann Intern Med* 1993;118:657-665.
47. Melton LJI, Crowson CS, Khosla S, O'Fallon WM. Fracture risk after surgery for peptic ulcer disease: a population-based cohort study. *Bone* 1999;25(1):61-7.
48. Kanis J, Johnell O, Gullberg B, Allander E, Elffors L, Ranstam J, et al. Risk factors for hip fracture in men from southern Europe: the MEDOS study. Mediterranean Osteoporosis Study. *Osteoporos Int* 1999;9(1):45-54.
49. Espallargues M, Sampietro-Colom L, Estrada MD, Sola M, del Rio L, Setoain J, et al. Identifying bone-mass-related risk factors for fracture to guide bone densitometry measurements: a systematic review of the literature. *Osteoporos Int* 2001;12(10):811-22.
50. Liedman B, Bosaeus I, Mellstrom D, Lundell L. Osteoporosis after total gastrectomy. Results of a prospective, clinical study. *Scand J Gastroenterol* 1997;32(11):1090-5.
51. Tovey FI, Godfrey JE, Lewin MR. A gastrectomy population: 25-30 years on. *Postgrad Med J* 1990;66(776):450-6.
52. Zittel TT, Zeeb B, Maier GW, Kaiser GW, Zwirner M, Liebich H, et al. High prevalence of bone disorders after gastrectomy. *Am J Surg* 1997;174(4):431-8.
53. Maier GW, Kreis ME, Zittel TT, Becker HD. Calcium regulation and bone mass loss after total gastrectomy in pigs. *Ann Surg* 1997;225(2):181-92.
54. Adachi Y, Shiota E, Matsumata T, Iso Y, Yoh R, Kitano S. Bone mineral density in patients taking H<sub>2</sub>-receptor antagonist. *Calcif Tissue Int* 1998;62(4):283-5.
55. Marciniowska-Suchowierska EB, Talalaj MJ, Włodarczyk AW, Bielecki K, Zawadzki JJ, Brzozowski R. Calcium/phosphate/vitamin D homeostasis and bone mass in patients after gastrectomy, vagotomy, and cholecystectomy. *World J Surg* 1995;19(4):597-601.

56. Blichert-Toft M, Beck A, Christiansen C, Transbol I. Effects of gastric resection and vagotomy on blood and mineral content. *World J Surg* 1979;3:99-105.
57. Mellstrom D, Johansson C, Johnell O, Lindstedt G, Lundberg PA, Obrant K, et al. Osteoporosis, metabolic aberrations, and increased risk for vertebral fractures after partial gastrectomy. *Calcif Tissue Int* 1993;53(6):370-7.
58. Lamarque D, Tran Van Nhieu J, Breban M. What are the gastric modifications induced by acute and chronic *Helicobacter pylori* infection? *Gastroenterol Clin Biol*. 2003;27:391-400.
59. Pearse AGA. Common cytochemical properties of the cells producing polypeptide hormones, with particular reference to calcitonin and thyroid C cells. *Vet Rec* 1966;79:587-590.
60. Voutilainen M, Juhola M, Pitkanen R, Farkkila M, Sipponen P. Immunohistochemical study of neuroendocrine cells at the gastric cardia mucosa. *J Clin Pathol* 2002;55:767-769.
61. Hakanson R. New aspects of the formation and function of histamin, 5-hydroxytryptamine and dopamine in gastric mucosa. *Acta Physiol Scand* 1970;340(suppl.):7-134.
62. Schubert ML, G. EN, Makhlouf GM. Regulation of gastric somatostatin secretion in the mouse by luminal acidity: a local feedback mechanism. *Gastroenterol* 1988;94:317-322.
63. Cooper CW, Schwesinger WH, Mahgoub AM, Ontjes DA. Thyrocalcitonin - stimulation of secretion by penta-gastrin. *Science* 1971;172:1238.
64. Cooper CW, Biggerstaff CR, Wiseman CW, Carlone MF. Hypocalcemic effect of penta-gastrin and related gastrointestinal hormonal peptides in the rat. *Endocrinology* 1972;91:1455.
65. Schulak JA, Kaplan EL. *Metabolism* 1974;23:1103.
66. Schulak JA, Kaplan EL. The importance of the stomach in gastrin-induced hypocalcemia in the rat. *Endocrinology* 1975;96(5):1217-20.

67. Fahrenkrug J, Schaffalitzky OB, Rehfeld JF. Serum calcitonin in hypergastrinaemia due to achlorhydria. *Acta Endocrinol* 1977;86:140-145.
68. Brandsborg M, Nielsen HE, Brandsborg O, Olsen KJ, Lovgreen NA. The role of serum gastrin in the secretion of calcitonin: studies in patients with pernicious anaemia and in healthy subjects. *Scand J Gastroenterol* 1980;15:23-28.
69. Kaplan EL, North PT, Norberg HP, Schulak JA, Hill BJ. Evidence for a role of the stomach in serum calcium regulation. *J Surg Res* 1976;22:237-241.
70. Persson P, Grunditz T, Axelson J, Sundler F, Hakanson R. Cholecystokinins but not gastrin-17 release calcitonin from thyroid C- cells in the rat. *Regul Pept* 1988;21(1-2):45-56.
71. Limlomwongse L, Krishnamra N. The mechanism of action and target organ of gastrin-induced hypocalcemia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1981;168(1):72-6.
72. Persson P, Gagnemo-Persson R, Chen D, Axelson J, Nylander A-G, Johnell O, et al. Gastrectomy causes bone loss in the rat: is lack of gastric acid responsible? *Scand J Gastroenterol* 1993;28:301-306.
73. Klinge B, Lehto-Axtelius D, Akerman M, Hakanson R. Structure of calvaria after gastrectomy. *Scand J Gastroenterol* 1995;30:952-957.
74. Hakanson R, Chen D, Tielemans Y, Andersson K, Ryberg B, Sundler F, et al. ECL cells: biology and pathobiology. *Digestion* 1994;55:38-45.
75. Larsson B, Gritli-Linde A, Norlen P, Lindstrom E, Hakanson R, Linde A. Extracts of ECL-cell granules/vesicles and of isolated ECL cells from rat oxyntic mucosa evoke a Ca<sup>2+</sup> second messenger response in osteoblastic cells. *Regul Pept* 2001;97:153-161.
76. Andersson N, Surve VV, Lehto-Axtelius D, Ohlsson C, Hakanson R, Andersson K, et al. Drug-induced prevention of gastrectomy- and ovariectomy-induced osteopaenia in the young female rat. *J Endocrinol* 2002;175(3):695-703.

77. Zellin G, Hakanson R, Linde A. Gastrectomy has no effect on bone regeneration in rats despite a decrease in bone mass. *Scand J Gastroenterol* 2002;37(10):1149-55.
78. Ferreira R, Barbosa A, Gonçalves V, Martins M, Rodrigues C, Sato P, et al. Parietal cell/endocrine cell ratio in the oxyntic mucosa of some species of mammals. *Acta Microsc* 1999;8:169.
79. Grimelius L. The argyrophil reaction in islet of adult human pancreas studies with a new silver nitrate procedure. *Acta Soc Med Ups* 1968;73:271-294.
80. Dixon M GR, Yardley JH, Correa P, et al. International workshop on the histopathology of gastritis. *Am J Surg Path* 1996;20:1161-1181.
81. Ross PD. Osteoporosis: frequency, consequences, and risk factors. *Arch Intern Med* 1996;156:1399-1441.
82. Cooper C, Campion G, Melton LJ. Hip fractures in the elderly: a worldwide projection. *Osteoporosis Int* 1992;2:285-289.
83. Eastell R. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Eng J Med* 1998;338:736-745.
84. Compston J. Secondary causes of osteoporosis in men. *Calcif Tissue Int* 2001;69(4):193-5.
85. Honasoge M, Rao DS. Metabolic bone disease in gastrointestinal, hepatobiliary, and pancreatic disorders and total parenteral nutrition. *Curr Opin Rheumatol* 1995;7(3):249-54.
86. Toffolon EP, Goldfinger SE. Malabsorption following gastrectomy and ileal resection. *Surg Clin North Am* 1974;54(3):647-53.
87. Taitz LS, Wales JK, Spitz L. Hypocalcaemic seizures following gastrectomy. *Eur J Pediatr* 1983;141(1):36-8.
88. Recker RR. Calcium absorption and achlorhydria. *N Engl J Med* 1985;313:70-73.



89. Kanis J, Gluer C. An update on the diagnosis and assessment of osteoporosis with densitometry. *Osteoporos Int* 2000;11:192-202.
90. Sato P, Barbosa A, Benchimol M, al. e. Identificação imunocitoquímica dos canalículos secretores das células parietais (CP) e sua aplicação no estudo da mucosa gástrica de pacientes com úlcera duodenal (UD) antes e após tratamento. I Semana do Conhecimento da UFMG. IX Semana de Iniciação Científica. 2000:170.
91. Dhonukshe-Rutten RA, Lips M, de Jong N, al. e. Vitamin B-12 status is associated with bone mineral content and bone mineral density in frail elderly women but not in men. *J Nutr.* 2003;133:801-807.
92. Annibale B, Aprile MR, Ferraro G, al. e. Relationship between fundic endocrine cells and gastric acid secretion in hypersecretory duodenal ulcer diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 1998;12:779-788.
93. Couple M, Rees H, Springer CJ, Bishop AE, Morris JA, Polak JM, et al. Gastric enterochromaffin-like (ECL) cells in hypergastrinemic duodenal ulcer disease. *Gut* 1990;31:144-147.

ANEXO 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP