

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA
DOUTORADO

AVALIAÇÃO DA ABSORÇÃO INTESTINAL DE CÁLCIO EM
MULHERES PERIMENOPÁUSICAS NORMAIS :
SUA IMPORTÂNCIA NA MASSA ÓSSEA
E A
COMPARAÇÃO DE TESTES DE ABSORÇÃO DE CÁLCIO PARA USO
AMBULATORIAL

JOSÉ AUGUSTO SISSON DE CASTRO

Orientador: Jorge Luiz Gross

Co-Orientador: Munro Peacock

Porto Alegre, 1996.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

C355a Castro, José Augusto Sisson de

Avaliação da absorção intestinal de cálcio em mulheres perimenopáusicas normais: sua importância na massa óssea e a comparação de testes de absorção de cálcio para uso ambulatorial / José Augusto Sisson de Castro ; orient. Jorge Luiz Gross ; co-orient. Munro Peacock.- Porto Alegre : UFRGS, 1996.

115 f.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Curso de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica.

1. Absorção intestinal. 2. Cálcio. 3. Mulheres perimenopáusicas. 4. Massa óssea. I. Gross, Jorge Luiz. II. Peacock, Munro. III. Título.

Dedicatória:

este trabalho é dedicado à Marta, companheira disposta a interromper sua trajetória científica e segura para me acompanhar numa jornada incerta, como na vida ... , e, aos meus filhos, Júlio, Simone e Miguel, que inocentemente tiveram de suportar meu distanciamento, enquanto tentava encontrar um modelo para deixar-lhes, para, só então, descobrir que na verdadeira proximidade está o maior dos legados.

“...uma grande montanha, vista de muito longe, tem uma certa forma irregular de montanha. Se te aproximares e examinares um pequeno pico da grande montanha, ele terá a mesma forma de montanha. Na verdade, tu podes percorrer a escala abaixo até ao mínimo pedaço de rocha, vê-la no microscópio - esta terá a mesma forma fractal básica da grande montanha.”

Dr. Michael Chrichton

AGRADECIMENTOS

Quando se avalia o trabalho de alguém estamos de certa forma avaliando todas as condições em que o mesmo foi desenvolvido. Com isto quero antecipadamente esclarecer que as imperfeições desta tese são de única responsabilidade do autor posto que as condições que dispuz para a mesma foram as melhores possíveis, graças à generosidade, à tolerância e à amizade de todos os envolvidos.

Em primeiro lugar, sou, igual e diferentemente, grato ao meu co-orientador, Dr. Munro Peacock, e ao Dr. C. Conrad Johnston Jr., chefe do Serviço de Endocrinologia da Indiana University School of Medicine. Ao Dr. Peacock, eminente e proficiente pesquisador do metabolismo ósseo, devo a essência desta tese e ao Dr. Johnston devo a generosa oportunidade de trabalhar num serviço de renomada qualidade científica.

Agradeço ao “staff” do Centro de Pesquisas Clínicas Gerais (GCRC), ao da Unidade de Estudos Ósseos (Bone Studies Unit), pelo carinho com que me receberam e pela inestimável ajuda e paciência que tiveram comigo, e, em especial, o casal amigo, Ron e Cindy McClintock, que muito me ajudaram nos seus respectivos laboratórios.

Agradeço também aos Drs. Siu L.Hui e Charles W. Slemenda pela ajuda, sugestões e comentários críticos que fizeram no decorrer do projeto.

Um agradecimento muito especial devo aos meus colegas do Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) por dividirem as tarefas, possibilitando meu afastamento, e pelo muito que me incentivaram para concluir este trabalho.

Ao Jorge Gross agradeço também pelas sugestões, pela liberdade que me permitiu aprender as dificuldades deste empreendimento e, principalmente, pela tolerância da espera da conclusão do mesmo.

Ao Arhon Hutz, à Tânia Furlanetto, à Helena Schmid agradeço também pelo coleguismo e amizade destes anos todos.

Ao Mauro Czepielewski agradeço pela ajuda nas tarefas diárias que muito facilitaram o término deste trabalho.

À Polimara Spritzer sou muito grato por ter acreditado neste projeto desde que tomou conhecimento do mesmo, ainda na sua forma parcial, e pelos comentários importantes que fez para sua finalização.

Agradeço também à Lídia do Carmo do Nascimento, estatística do Grupo de Pesquisa de HCPA, pela dedicação e ajuda na análise deste material e, ainda aos Drs. Sandra Fuchs e Rogério Friedman pela prontidão com que me auxiliaram na análise final deste material.

Meu agradecimento final, e muito especial, é para a Professora Solange Ketzer que gentilmente aceitou a tarefa de tornar possível a leitura desta tese no idioma pátrio.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	03
LISTA DAS ABREVIATURAS MAIS UTILIZADAS	07
RESUMO	08
SUMMARY	10
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 A relação cálcio e osso	13
1.2 Os mecanismos da absorção intestinal da cálcio	15
1.3 Efeito dos estrógenos e do envelhecimento na absorção intestinal do cálcio ..	21
1.4 Efeito de outros hormônios, condições e substâncias na absorção intestinal do cálcio	24
1.5 Técnicas utilizadas para medir absorção intestinal de cálcio em humanos	25
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	32

4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Indivíduos	33
4.2 Métodos	35
5. RESULTADOS	45
5.1 Avaliação da absorção intestinal de cálcio e a sua importância na massa óssea de mulheres perimenopáusicas normais	45
5.2 Comparações dos testes de absorção de cálcio para uso ambulatorial	56
DISCUSSÃO	77
CONCLUSÕES	93
BIBLIOGRAFIA	95

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs.Ca - Absorção intestinal de cálcio (Ca).

Abs.Frac.- absorção fracionária de cálcio ou fração absorvida da dose de Ca administrada.

Alfa- absorção fracionária de cálcio, medida em 1 hora, com carreador de Ca na dose de 20 mg.

CMO - concentração mineral óssea.

DMO - densidade mineral óssea.

DMO mR - densidade mineral óssea no terço médio do rádio.

DMO dR- densidade mineral óssea na porção distal do rádio.

EE - estrógenos.

MENO- mulheres pós-menopáusicas deste estudo.

PREM- mulheres pré-menopáusicas deste estudo.

PTH - paratormônio.

OC - osteocalcina

1,25(OH)₂D₃ - calcitriol ou 1,25 dihidroxicolecalciferol.

25OHD₃ - calcidiol ou 25 hidroxicolecalciferol.

⁴⁵Ca - radioisótopo de cálcio empregado nos testes de absorção intestinal.

RESUMO

A redução da absorção intestinal de cálcio (Ca) é tida como uma importante alteração patofisiológica para justificar a perda de massa óssea e a osteoporose pós-menopáusicas. Porém, a existência desta deficiência, bem como suas causas, ainda não foram esclarecidas. Em 89 mulheres brancas normais, 37 pré-menopáusicas e 52 pós-menopáusicas, determinou-se a absorção intestinal de Ca pelo método com um radioisotopo, ^{45}Ca , em 1 hora, ALFA, e sua relação com vários parâmetros do metabolismo do Ca e com as medidas da massa óssea no rádio. ALFA e as medidas da massa óssea foram significativamente mais baixas nas mulheres pós-menopáusicas. ALFA se correlacionou inversa e significativamente apenas com a idade. Por análise de regressão multivariada passo-a-passo, controlando para a condição menopausa, o efeito da idade em ALFA desaparece sem modificar muito o coeficiente de regressão ajustado da menopausa. ALFA, ou absorção fracionária de Ca com carreador na dose de 20 mg, foi comparada com o teste de absorção fracionária (Abs. Frac.) de Ca com carreador na dose de 250 mg medido em 3 e 5 horas. As Abs.Frac com dose de 250 mg foram mais precisas que ALFA e se correlacionaram com os níveis de calcitriol, ao contrário de ALFA. Ambos os testes, com carreador em dose baixa e com carreador

em dose alta, correlacionaram-se significativamente entre si. ALFA parece carecer de precisão para avaliar as possíveis alterações na absorção intestinal de Ca decorrentes da presença ou não de esteróides sexuais. Entre os testes de absorção de Ca com carreador em dose alta a Abs.Frac. medida após 3 horas foi tão precisa como após 5 horas, mas parece ser mais prática para o uso ambulatorial.

SUMMARY

Intestinal calcium malabsorption is considered an important pathophysiological process to justify postmenopausal bone loss as well as osteoporosis however its presence and the mechanism of this disturbance remains unknown. In 89 normal white females, 37 premenopausal and 52 postmenopausal, intestinal calcium absorption was measured by a single radioisotopic, ^{45}Ca , method in 1 hour, ALPHA, as well as its relationship to several parameters of the mineral metabolism and to the bone mass absorptiometry of the radius. ALPHA and bone mass were significantly lower in the postmenopausal women than in the premenopausal ones. ALPHA correlated negatively and significantly only with age. By stepwise multiple regression analysis, controlling for the menopausal status the effect of age in ALPHA, log transformed, disappeared with little change in the menopausal standardized coefficient of regression. ALPHA, 20 mg Ca carrier 1 hour fractional absorption test, was compared against 250 mg Ca carrier fractional absorption test measured after 3 and 5 hours. The high dose carrier intestinal absorption test was more precise than ALPHA and correlated with fasting serum calcitriol levels. Both intestinal Ca absorption test, with low and high carrier dose, significantly correlated to each other. ALPHA does not appear to have enough

precision to assess the possible metabolic effects of the sexual steroids in the intestinal Ca absorption. The 3 hour fractional absorption test appears to be as precise and more practical than the 5 hour test to be used in an ambulatorial setting.

1. INTRODUÇÃO

A osteoporose é um importante problema de saúde que afeta principalmente as mulheres brancas e as asiáticas após a menopausa. As previsões indicam que este problema tende a crescer com a maior sobrevivência da população e que será mais freqüente na Ásia e na América do Sul ao redor do ano 2050 ⁽¹⁾. A Organização Mundial da Saúde (O.M.S.) descreve a osteoporose como uma doença caracterizada por baixa massa óssea e por deterioração da microarquitetura, o que leva a um aumento da fragilidade óssea e, conseqüentemente, a um aumento do risco de fraturas. Nesta recente publicação oficial, redigida com a participação de eminentes pesquisadores do metabolismo ósseo, a O.M.S. considera que a massa óssea seja um dos principais determinantes da resistência óssea e que a osteoporose esteja causalmente relacionada com a menopausa, mas pouco opina sobre os mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento desta condição, certamente por que ainda resta muito a ser esclarecido. Entre as possíveis alterações metabólicas responsáveis por esta condição, a redução da absorção intestinal de cálcio tem sido relacionada como um mecanismo importante para explicar a perda de massa óssea pós-menopáusicas e a do envelhecimento ⁽²⁾.

1.1 A relação cálcio e osso

Cálcio (Ca) é um dos principais elementos inorgânicos dos ossos dos mamíferos tanto quantitativa quanto qualitativamente. Noventa e nove por cento (99%) do Ca do organismo está em forma sólida no esqueleto como um sal semelhante à hidroxiapatita ^(3 - 6). No esqueleto adulto, o Ca se distribui nas duas principais formas estruturais ósseas, a cortical e a trabecular, que compreendem, respectivamente, cerca de 80% e 20% da massa óssea total. Estas duas formas estruturais são constituídas pelas mesmas células ósseas, osteoclastos, osteoblastos e osteócitos, pelo mesmo tipo de matriz orgânica, mas apresentam características arquitetônicas e funcionais diferentes. O osso tipo cortical, característico das diáfises dos ossos longos, tem cerca de 80 a 90% do seu volume calcificado mas apenas 20% deste é disponível para trocas metabólicas. Já o osso trabecular, típico das epífises dos ossos longos e das vértebras, apresenta apenas 15 a 25% do seu volume calcificado, mas 80% deste pode ser utilizado nos processos metabólicos. O restante do volume ósseo, não calcificado, é ocupado por medula óssea, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo. Portanto, admite-se que o osso cortical tenha funções, principalmente, mecânica e protetora e que o osso trabecular tenha uma função metabólica ⁽⁷⁾. Convém salientar que apenas 1% do conteúdo de Ca do esqueleto pode ser trocado livremente com os líquidos extracelulares ⁽⁵⁾.

A quantidade do Ca corporal total humano, essencialmente esquelética, aumenta progressivamente nos diferentes períodos de desenvolvimento (ao nascer existe cerca de 25 a 30 g de Ca esquelético) até estabilizar ao redor da terceira década de vida, com 20-25 g de Ca / kg de peso corporal magro ^(4, 6, 8). Depois de atingir o pico, geralmente

antes dos 20 anos, e estabilizar por alguns anos, a quantidade de Ca esquelética começa a diminuir progressivamente, provavelmente, relacionada às mudanças hormonais da menopausa e ao envelhecimento ^(3, 4, 9). A diminuição do Ca ósseo está associada à redução da massa óssea (matriz orgânica e conteúdo mineral), o que está, também, relacionada com diminuição da resistência física dos ossos ^(1, 10, 11). Sabe-se que outros aspectos estruturais ósseos, como a forma do osso ou a qualidade da matriz orgânica, e as condições que predispõem ao trauma, são também importantes determinantes das fraturas ^(12,13). Entretanto, a redução da massa óssea, ou de sua medida, a densidade mineral óssea, relaciona-se fortemente com as fraturas ósseas, especialmente, as causadas por traumatismos leves ^(11,14) e pode ser medida com precisão.

Sabe-se também que a redução do Ca ósseo, mesmo sem uma diminuição da massa óssea, resultante de defeitos da mineralização, está associado a deformidades e a doenças esqueléticas graves como o raquitismo e a osteomalacia ⁽¹⁵⁾. Vários outros minerais estão presentes no tecido ósseo, especialmente, o fósforo e o magnésio. Estes elementos também são importantes, mas, por serem abundantes na alimentação ou por estarem regulados pelo mesmo sistema que controla preferencialmente o Ca sérico, têm um papel secundário nos distúrbios da integridade óssea. O magnésio, por exemplo, apesar de importante co-fator enzimático, não faz parte da estrutura da matriz óssea nem da hidroxiapatita; é regulado apenas pela ingestão alimentar e pela reabsorção tubular renal. A sua relação com a integridade óssea permanece incerta ⁽⁵⁾. Portanto, pelo anteriormente exposto, pode-se admitir que o conteúdo de Ca

esquelético é um determinante essencial da integridade óssea em todas suas funções.

1.2 Os mecanismos da absorção intestinal de cálcio

A única maneira natural pela qual o Ca entra no organismo humano, após o nascimento, ocorre pelo trato digestivo. Nos mamíferos em desenvolvimento e, em especial, na espécie humana, a absorção intestinal de Ca (AbsCa) é bastante eficiente^(3, 16). Entretanto, esta função tende a diminuir com o envelhecimento dos indivíduos adultos^(3, 8, 17 - 21). Nas mulheres pós-menopausadas, a capacidade de absorção intestinal de Ca também parece diminuir^(18, 22 - 24), embora alguns autores tenham relatado dados discordantes^(19, 25).

A AbsCa, no adulto, depende de dois fatores principais: a eficiência dos mecanismos de absorção intestinal e a quantidade de Ca ingerida que for liberada na luz intestinal^(3, 4, 8, 16, 26 - 28). Desta forma, quanto maior for a quantidade de Ca na dieta, menor será a porcentagem absorvida. Como existe uma variabilidade muito grande na quantidade de Ca ingerida por diferentes pessoas^(4, 29, 30), assim como grandes mudanças das necessidades de Ca nas várias etapas da vida de uma pessoa, (crescimento, puberdade, gravidez, lactação, menopausa e envelhecimento) é necessário que o processo de absorção de Ca responda e se adapte a estas mudanças. Por estes mesmos motivos, alguns autores consideram irrelevante a quantidade de Ca ingerida para a manutenção da massa óssea, posto que o organismo humano possuiria grande capacidade de adaptar-se à variabilidade da disponibilidade de Ca alimentar^(31 - 33). Entretanto, verifica-se que no envelhecimento, além da diminuição da capacidade

de absorção, ocorre uma tendência para a diminuição da ingestão alimentar de Ca^(3, 4, 30) e da eficiência da AbsCa para se adaptar a esta ingestão baixa de Ca^(17, 27). Sabe-se também que, em outras situações fisiológicas, como na gravidez e lactação, a eficiência da AbsCa pode estar aumentada^(3, 4, 6) e que existem várias condições patológicas que podem aumentar ou diminuir a AbsCa, tais como, hiper e hipoparatiroidismo, sarcoidose, hipercalciúria idiopática, raquitismos, doença renal crônica, etc⁽³⁴⁾.

Os mecanismos básicos da AbsCa têm sido detalhadamente estudados por vários investigadores, empregando diferentes técnicas, em diversos modelos animais, tanto *in vitro* como *in vivo*, e, em seres humanos^(4, 8). Apesar dos avanços no entendimento dos mecanismos da AbsCa, mesmo ao nível molecular, muitos aspectos fisiológicos e patológicos ainda não foram completamente esclarecidos^(4, 6, 8, 26, 27, 35, 36).

O Ca é absorvido em todo o intestino, porém, a velocidade de absorção por unidade de comprimento da mucosa é mais eficiente no duodeno e jejuno proximal^(4, 26, 27, 37). Estas regiões possuem maiores quantidades de proteínas ligadoras de Ca, dependentes de vitamina D, e a presença do pH luminal mais baixo (entre 5 e 6)⁽²⁷⁾ facilita a dissociação do Ca de nutrientes e de sais^(4, 6, 16, 26). Por outro lado, os segmentos mais distais do intestino são mais longos, retêm por mais tempo os nutrientes, permitindo uma absorção quantitativamente maior de Ca^(26, 38). O Ca é também secretado na luz intestinal e, em determinadas condições, pode até ocorrer um

predomínio da secreção de Ca sobre a absorção no jejuno, íleo e cólon distal. ^(35, 38)

O processo dinâmico da absorção intestinal de Ca resulta da soma de dois componentes; um saturável, ativo, transcelular, dependente da vitamina D, e outro insaturável, passivo, paracelular que podem ser descritos pela fórmula:

$$J_{ms} = (J_{max} [Ca] / K_t + [Ca]) + D [Ca]$$

Na fórmula, J_{ms} indica o fluxo de absorção mucosa-serosa, J_{max} indica a velocidade máxima do componente saturável de transporte, $[Ca]$ é a concentração de Ca intraluminal, K_t é $[Ca]$ onde a velocidade de transporte é a metade da máxima, e D é a constante de difusão do mecanismo insaturável ^(4, 26, 35, 39).

As medidas do K_t duodenal e jejunal, em humanos e em outros animais, estão entre 1 e 4 mmol ^(4, 17, 26, 27, 35). O aspecto essencial deste processo é que o J_{max} é regulado pelos níveis da vitamina D, em resposta à ingestão de Ca, e é responsável pela maior parte da absorção de Ca quando a concentração do lúmen intestinal é baixa, ou seja, menor que 3 mmol. O componente de difusão passiva predomina quando a ingestão de Ca é alta e está presente em todo intestino. A quantidade de Ca no lúmen do intestino proximal de humanos, após uma refeição pobre em Ca, está na ordem de 0,3 a 2 mmol, ou 12 a 80 mg, mas aumenta para 3 a 9 mmol (120 a 360 mg) após a ingestão de um copo de leite ^(26, 40).

Os mecanismos celulares correspondentes a estes transportes de Ca ainda não estão totalmente esclarecidos. O processo ativo, saturável, parece refletir o transporte

intracelular de Ca, enquanto que o processo passivo parece resultar da difusão paracelular dependente do gradiente de voltagem ^(4, 26, 41, 42). Sabe-se que existem vários tipos de transporte de Ca transcelular. O Ca atravessa o bordo viloso apical da membrana do enterócito por um gradiente eletro-químico altamente favorável, cruza a célula na sua extensão e é expelido da mesma pela membrana baso-lateral por um ou mais mecanismos dependentes de energia, misturando-se, após, com Ca extracelular. Também parece estar claro que o Ca intracelular não pode ficar livremente miscível no citoplasma do enterócito, posto que seria letal à célula. Conhecem-se dois possíveis mecanismos que seqüestram o Ca transportado pelo enterócito e que operam fisiologicamente. O primeiro é o fluxo vesicular onde o Ca na membrana apical é endocitado em vesículas que mais tarde fusionam-se com lisossomas, atravessam o citosol e liberam o Ca por exocitose pela membrana basolateral ⁽⁸⁾. O outro representa um modelo difusional tamponado, no qual o Ca que entra na célula pelos canais da membrana apical liga-se a uma proteína, dependente de vitamina D, a “calbindin” ^(4, 36, 41, 42). O complexo “calbindin”-Ca atravessa o citosol até a membrana basolateral onde libera o Ca para fora da célula por enzimas Ca,Mg -ATPases da membrana. A alta afinidade por Ca destas ATP-ases mantém a concentração citosólica de Ca baixa na região imediatamente subjacente à membrana basolateral para liberar o Ca da “calbindin”. Este modelo tem demonstrado, teoricamente, que é compatível com as concentrações de Ca medidas no citosol e que também pode antecipar qual a quantidade de “calbidin” no enterócito que seria determinante da velocidade de transporte do Ca nesta rota transcelular saturável ^(4, 36, 41, 42). Este modelo também

admite que a entrada do Ca apical se daria por “canais”, que esta entrada de Ca tenha uma capacidade finita e que a mesma possa ser inibida por altas concentrações locais de Ca citosólico. Tais “canais” de Ca ainda não foram identificados, mas parecem ser ativados pela vitamina D e inibidos por verapamil ^(4, 6, 42). O acúmulo excessivo de Ca na região imediatamente subjacente à membrana apical já foi visualizado por microscopia iônica no duodeno de galinha deficiente em vitamina D ⁽⁴³⁾. As enzimas Ca, Mg-ATPases foram localizadas nas membranas basolaterais dos enterócitos ^(4, 42). O componente passivo, difusional, da absorção de Ca, é dependente da voltagem, comum a todos os segmentos do intestino e resulta na difusão paracelular a favor de um gradiente de Ca eletroquímico através junções apertadas (“tight”) entre os enterócitos ^(4, 42). Esta mesma rota também pode permitir que, em algumas circunstâncias, a secreção de Ca seja o mecanismo predominante no jejuno, íleo ou cólon distal ⁽³⁵⁾.

Vários outros fatores afetam a absorção de Ca como, por exemplo, sua solubilidade, biodisponibilidade e os níveis de vitamina D ⁽⁴⁴⁾. O Ca, para ser absorvido, deve ser liberado como íon livre dos complexos alimentares. A acidez gástrica é importante, porém não essencial ⁽⁴⁵⁾, para promover tal dissociação pois, mesmo a leve acidez intestinal, pH 4-6, após uma refeição típica, parece ser mais que suficiente. A bile é a principal fonte do Ca endógeno fecal, mas os sais biliares também aumentam a solubilidade que favorece a absorção de Ca da dieta ⁽⁴⁶⁾. Certos componentes da dieta, especialmente as fibras, podem limitar a absorção de Ca. O oxalato presente em vegetais e no chá pode seqüestrar o Ca formando um complexo

não absorvível. Ácidos graxos saturados de cadeia longa liberados na digestão dos lipídios, se não forem absorvidos, também podem afetar absorção de Ca. A lactose do leite parece favorecer a absorção de Ca, via difusão paracelular, mas a lactose pode causar problemas de absorção nos indivíduos deficientes de lactase ⁽⁴⁷⁾.

A vitamina D, através do seu principal metabólito ativo, o 1,25, dihidroxicolecalciferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), ou calcitriol, é o principal regulador fisiológico do transporte intestinal de Ca ^(4, 8, 42, 48). O duodeno é o segmento do intestino que apresenta a maior responsividade ao $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, mas o resto do intestino também responde ^(35, 36). No duodeno, o $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aumenta o J_{max} do processo transcelular saturável da absorção de Ca ⁽⁴⁹⁾. Este metabólito também aumenta o fluxo de Ca no bordo viloso de membrana apical isolada, os níveis da “calbindin” e do seu mRNA, e a atividade da Ca,Mg ATP-ase basolateral ^(4, 6, 42). Alguns destes efeitos podem refletir a regulação da transcrição genética pelo complexo $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ /receptor, enquanto outros efeitos ocorrem muito rapidamente e, provavelmente, envolvam mecanismos não-genômicos, como as alterações da composição fosfolipídica da membrana do enterócito, o aumento do Ca citosólico livre e outras propriedades biomecânicas da membrana ^(4, 6, 42). De todos os efeitos, o aumento da concentração da “calbindin” é quantitativamente a ação mais importante da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. As concentrações citosólicas de “calbindin” se correlacionam com a absorção intestinal de Ca e são consideradas como o passo limitante da velocidade do transporte ativo de Ca no enterócito ^(4, 41, 42). No jejuno, no íleo e no duodeno a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aumenta o

processo paracelular passivo ⁽⁵⁰⁾. O mecanismo pelo qual isto ocorre não é conhecido, mas parece decorrer de alteração na fluidez da membrana.

Um rápido aumento, em minutos, da absorção duodenal de Ca chama-se transcaltaquia e foi demonstrado em duodeno de galinha perfundido com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ⁽⁵¹⁾. Tal efeito ocorre na membrana basolateral, no lado vascular, mas não na superfície da mucosa. Este fenômeno pode ser inibido por concentrações muito elevadas de Ca extracelular na região basolateral e ser mimetizado por análogos da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ que ligam-se poucos aos receptores clássicos da vitamina D, mas que ativam os “canais” de Ca.

1.3 Efeito dos estrógenos e do envelhecimento na absorção intestinal do Cálcio

Além do paratormônio (PTH) que é o principal hormônio controlador da produção renal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ⁽⁴⁸⁾, também os estrógenos (EE) parecem apresentar um efeito positivo na absorção intestinal de Ca. O mecanismo deste efeito ainda não está bem esclarecido ^(52, 53). Nas aves ovulantes os EE e os progestágenos estimulam a 1 alfa-hidroxilase renal aumentando os níveis séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ^(54, 55). Em ratas ooforectomizadas parece haver uma redução do número de receptores de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ no jejuno ⁽⁵⁶⁾ ou ainda, um defeito da ligação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aos seus receptores no enterócito. Recentemente foram identificados receptores específicos estrogênicos nas células duodenais de ratos ⁽⁵⁷⁾, bem como um efeito direto de estrógeno na absorção

intestinal de Ca ⁽⁵⁸⁾. O efeito dos EE na absorção intestinal de Ca já foi demonstrado em mulheres após a menopausa natural ⁽²²⁾, em mulheres pós-ooforectomia ⁽⁵⁹⁾ e em mulheres com osteoporose ^(23, 60). Nestas últimas, o aumento da absorção intestinal de Ca ocorreria por um aumento dos níveis circulantes de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ^(23, 60). Gallagher et al, em 1979 ⁽²¹⁾, sugeriram que a deficiência de estrógenos resultaria numa maior reabsorção óssea com conseqüente aumento do Ca sérico o que, mesmo dentro dos limites normais, reduziria os níveis de PTH e a produção de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e, portanto, a absorção intestinal de Ca. Tal seqüência de eventos foi proposta por Riggs e Melton, em 1983, ⁽²⁾ como a base fisiopatológica de um dos principais tipos de osteoporose involucional, a osteoporose pós-menopáusicas. Entretanto, alguns autores discordam que exista uma diminuição do $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e da absorção intestinal de Ca causados pela deficiência estrogênica ⁽⁶¹⁾. Também ainda não há consenso sobre o mecanismo responsável pela maior reabsorção óssea na deficiência estrogênica. Heaney, já em 1965 ⁽⁶²⁾, sugeriu que isto seria devido a um aumento da sensibilidade óssea ao PTH circulante, o tem sido reforçado pelos trabalhos do grupo da Mayo Clinic ^(21, 63). Entretanto, com a identificação de receptores estrogênicos nos osteoblastos ^(64, 65) uma ação direta óssea dos EE também pode ser considerada.

Por outro lado, o aumento dos níveis de estrógenos pode estar relacionado ao aumento dos níveis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e da absorção intestinal de Ca, da gravidez e da lactação. Nestas situações, os aumentos do PTH, da prolactina, de fatores placentários e da síntese de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pela própria placenta também podem contribuir para tais

efeitos ⁽⁶⁾. Nos mamíferos, durante a gravidez e a lactação, a absorção intestinal de Ca pode ser estimulada independentemente dos metabólitos da vitamina D, pois ocorreria uma hipertrofia das vilosidades intestinais que aumenta especificamente a absorção de Ca e P, mas que não tem efeito na absorção de Mg ⁽⁶⁾. Recentemente, Specker et al ⁽⁶⁶⁾ não encontraram um aumento da absorção de Ca, em mulheres lactantes, colocando em dúvida o papel estimulante da amamentação na absorção intestinal deste cation.

Sabe-se que, com o envelhecimento, ocorre uma redução da absorção intestinal de Ca, tanto em animais como em seres humanos ^(4, 19 - 21, 26), por perda da adaptação da absorção intestinal a ingestão baixa de Ca ⁽¹⁷⁾. Esta situação pode decorrer de uma diminuição da capacidade do PTH em estimular a produção de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ^(67, 68) ou ainda uma resistência à ação do $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ao nível da mucosa intestinal ^(25, 69, 70). Neste sentido, um estudo recente mostrou que o envelhecimento pode levar a uma redução da concentração de receptores da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ intestinais de cerca de 30% e um aumento dos níveis séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ⁽⁷¹⁾. Outra recente e importante observação ⁽⁷²⁾, mas ainda controvertida ^(73, 74), foi a verificação que variantes alélicas comuns do gen que codifica o receptor da vitamina D, identificado pela enzima de restrição *BsmI* e denominadas B e b, podem predizer até 75% do efeito genético na massa óssea de adultos normais ⁽⁷²⁾. Os autores demonstraram que a densidade mineral óssea seria menor no genótipo BB, que teria menor expressão do receptor da vitamina D. Com relação à absorção intestinal de Ca, alguns autores observaram que o genótipo BB tem menor eficiência na absorção de Ca em mulheres pós-menopáusicas quando

em dieta pobre em Ca ⁽⁷⁵⁾. Outros autores não encontraram qualquer relação dos genótipos do locus B e b com as medidas da absorção de Ca, com as concentrações de receptores intestinal de vitamina D, nem com níveis circulantes de 1,25 (OH)₂ D₃ em mulheres normais jovens ou idosas ⁽⁷⁶⁾.

1.4 Efeito de outros hormônios, condições e substâncias na absorção intestinal do Cálcio

Vários outros hormônios, condições e drogas podem afetar a AbsCa. A calcitonina não parece ter um efeito consistente na absorção intestinal de Ca quando estudada em diferentes modelos animais, ou quando administrada a pacientes com osteoporose. Também nos pacientes com carcinoma medular de tireóide não foi encontrada alteração na absorção de Ca ⁽²⁶⁾. Os andrógenos parecem estimular a absorção intestinal de Ca, pois esta é mais eficiente nos homens do que nas mulheres e, quando são administrados a mulheres, também estimulam a absorção de Ca ⁽³⁾. Na tirotoxicose ocorre uma má-absorção de Ca, que pode ser devida aos níveis séricos baixos de 1,25(OH)₂D₃ desta doença. Em galinhas, os hormônios da tireóide potencializam a resposta absorptiva da 1,25(OH)₂D₃, sendo que o hipotireoidismo produz efeito oposto. O hormônio do crescimento (GH) pode aumentar a absorção intestinal de Ca em cães e porcos ⁽⁵⁸⁾. Em acromegálicos, a absorção intestinal de Ca está aumentada o que também ocorre com a administração de GH a pacientes ⁽²⁶⁾. A somatostatina aumenta a secreção de Ca na parte distal do intestino delgado e no cólon de ratos, o que pode explicar a redução da absorção de Ca em indivíduos que recebem

somatostatina. Doses farmacológicas de glicocorticóides deprimem a absorção intestinal de Ca sem diminuir a produção ou a localização intestinal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Os glicocorticóides diminuem o aumento do transporte ativo em resposta a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Em ratos, os glicocorticóides reduzem a resistência normal da difusão paracelular aumentando, tanto o fluxo retrógrado de Ca, quanto a absorção passiva. O exercício aumenta a absorção de Ca e a acidose metabólica diminui, provavelmente através de alterações dos níveis séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. O etanol reduz a absorção de Ca possivelmente por efeito tóxico direto nos enterócitos, mas isto ainda não foi esclarecido. A fenitoina e o verapamil também reduzem a absorção de Ca por mecanismo ainda não esclarecido. Os anti-ácidos em doses altas aumentam a absorção de Ca talvez por depleção de fósforo (P), mas nas doses de até 90 ml por dia, parecem não ter efeito significativo ⁽⁶⁾.

1.5 Técnicas utilizadas para medir absorção intestinal de cálcio em humanos

Várias técnicas para estimar a absorção intestinal de Ca já foram desenvolvidas e utilizadas em seres humanos, principalmente, em pesquisas clínicas. Entretanto, devido às suas diferenças metodológicas, praticidade e significado teórico, elas ainda dividem a opinião dos investigadores e nenhuma tem sido utilizada na prática médica rotineira. ^(34, 77). Algumas das mais importantes são as seguintes:

1.5.1 Técnica de balanço metabólico do Ca (BMCa) - é considerada o padrão-ouro para medir a absorção intestinal de Ca, mas não por todos investigadores ^(27, 33).

Nesta técnica, a absorção de Ca, também denominada **Absorção efetiva de Ca**, é calculada a partir da diferença do **Ca ingerido** menos o **Ca fecal** excretado. Este procedimento necessita que o indivíduo seja internado em uma unidade metabólica, que seja mantido numa mesma dieta por vários dias e que ingira a dieta com a quantidade de Ca conhecida. É necessário ainda que todas as fezes e urina sejam coletadas precisamente para determinar a quantidade absorvida. A medida da absorção intestinal de Ca por balanço metabólico não é uma técnica prática, é cara e requer cuidados extremados para garantir precisão dos resultados ^(16, 34, 37, 44).

1.5.2 Técnicas com isótopos de Ca - o desenvolvimento dos métodos de aferição de radioisótopos trouxeram uma simplificação para a medida da AbsCa e, principalmente, pela sua menor complexidade, foram rapidamente empregados e modificados por vários investigadores. Estas técnicas utilizam um ou dois radioisótopos, um por via oral, o outro endovenoso, e medem o aparecimento dos mesmos no sangue, na urina, no antebraço ou no corpo total ^(77 - 83). Quando dois radioisótopos são empregados, compara-se a atividade do isótopo dado oralmente com o injetado endovenoso por análise deconvolucional após múltiplas coletas de amostras de sangue, urina e fezes ^(38, 39). Uma variante destes testes que utiliza isótopos estáveis de Ca foi recentemente descrita ⁽⁸⁴⁾. Estas técnicas, entretanto, requerem, além das múltiplas coletas de sangue, aparelhos sofisticados e o custo do isótopo estável é bastante elevado. Uma diferença importante entre as técnicas de balanço de Ca e as com isótopos de Ca é que, nas primeiras, a quantidade de Ca absorvida é medida e, nas outras, a absorção de Ca representa uma estimativa da capacidade de absorção de Ca,

uma fração da dose administrada, ou absorção fracionária de Ca (Abs. Frac.) ⁽⁷⁷⁾. Algumas modificações das técnicas radioisotópicas resultaram em propostas simplificadas para avaliar a absorção intestinal de Ca na prática médica rotineira ^(85, 86).

1.5.3 Técnica de balanço metabólico combinada com uso simultâneo de Ca radioativo - nesta técnica, durante estudos de BMCa, um ou mais isótopos de Ca são administrados, oral e endovenosamente, sendo feita posteriormente uma análise dos isótopos no sangue, urina e fezes, o que permite o cálculo da **absorção “verdadeira” de Ca** que seria a diferença do **Ca da dieta** menos o **Ca fecal**, menos uma quantidade de Ca que é absorvida e, posteriormente, secretada no intestino, denominada de **Ca fecal endógeno**. ^(87, 88). Esta modificação técnica melhora a precisão da informação, mas é tão trabalhosa quanto a técnica padrão de balanço metabólico.

1.5.4 Técnica da medida fecal do Ca radioativo - após ser administrado via oral, o radioisótopo de Ca medido nas fezes avalia todo o Ca que não foi absorvido mais o que foi absorvido e depois secretado, o Ca fecal endógeno. Este método requer uma coleta precisa de fezes que são marcadas com corantes para corrigir para variações na motilidade intestinal e necessita de um aparelho capaz de contar grandes volumes de material ^(16, 37, 44).

1.5.5 Técnica da lavagem intestinal - este procedimento necessita que as soluções de limpeza intestinal e a substância cuja absorção será medida sejam administradas pela boca e coletadas após eliminação fecal. Além de demorada e dos grandes volumes administrados, esta técnica não expressa o modo usual da absorção de

Ca de alimentos que estão geralmente misturados. Esta técnica mede a capacidade de absorção em todo intestino, inclusive no cólon, sem considerar as diferenças de eficiência dos diferentes segmentos intestinais ^(37, 44).

1.5.6 Técnica da perfusão de segmento intestinal - nesta, emprega-se um endoscópio com três tubos que é colocado na porção intestinal desejada. Após uma lavagem intestinal, administra-se uma quantidade de Ca conhecida e coleta-se o material que restou pelos outros dois tubos que estão separados por uma distância definida. A diferença da concentração de Ca entre estas porções representa o que foi absorvido. É um dos métodos mais importantes para avaliar o transporte fisiológico de Ca em humanos, mas é bastante laborioso e desconfortável, só podendo ser usado em condições especiais para a avaliação de pacientes ^(16, 17, 26).

1.5.7 Técnica da resposta calciúrica à dose oral de Ca - este método representa uma medida indireta da absorção intestinal de Ca. Existem várias possibilidades de confusão nos resultados tais como o jejum limitado, a administração de carboidratos, sais quelantes de Ca, outras drogas e condições que afetem a função tubular renal ou o metabolismo ósseo. A principal limitação deste teste é a pouca reprodutibilidade ou precisão ^(37, 44, 89).

1.5.8 Técnicas da absorção intestinal de Ca com estrôncio (Sr) - estes testes utilizam o Sr estável, valendo-se da semelhança entre estes metais alcalinos terrosos. O Sr é absorvido no intestino similarmente ao Ca, e sabe-se que a sua absorção correlaciona-se bem com as técnicas de balanço de Ca. Entretanto, diferentemente do Ca, o Sr não é controlado pelo PTH e é excretado na urina mais rapidamente. Vários

protocolos destes testes já foram utilizados, mas ainda não foram suficientemente padronizados^(90, 91).

2. JUSTIFICATIVA

Sendo o Ca um elemento fundamental para a integridade óssea e sendo este absorvido apenas pelo trato digestivo, a avaliação desta função do organismo é essencial para o entendimento dos processos que resultam na perda de massa óssea e na fragilidade esquelética. A perda de massa óssea, após a menopausa, é um fenômeno comum e é também considerada como um fator importante no desenvolvimento da osteoporose. Desde 1983, aceita-se a proposta de Riggs e Melton ⁽²⁾ da existência de dois tipos principais de osteoporose involucional onde a diminuição da absorção intestinal de Ca contribuiria como uma alteração fisiopatológica importante para justificar a perda de massa óssea. Portanto, para entender os mecanismos da perda óssea da menopausa e a sua reversão pela administração de estrógenos, é essencial medir a absorção intestinal de Ca, seus principais hormônios controladores, assim como sua relação com as flutuações da massa óssea deste período evolutivo da vida das mulheres. Tais avaliações justificam a primeira parte deste estudo, pois todos estes aspectos permanecem não resolvidos.

Apesar de nenhum teste estar suficientemente padronizado para o emprego na prática clínica, os mais avaliados foram os derivados dos testes com radioisótopos que

já foram comparados com as medidas da absorção de Ca por técnicas de balanço metabólico e mostraram boas correlações^(81, 82, 85). Marshall e Nordin, em 1981⁽⁸⁵⁾, compararam as técnicas isotópicas com as de balanço metabólico de Ca de 100 estudos consecutivos, feitos em 71 pacientes, encontrando uma forte correlação entre a absorção efetiva de Ca e a absorção fracionária de Ca uma hora após a ingestão de uma solução de Ca em baixa concentração como carreador. Esta medida da absorção fracionária de Ca foi por eles denominada ALFA. Para avaliar a possível variação da absorção intestinal de Ca na menopausa, foi escolhido este teste por também já ter mostrado uma boa correlação com os níveis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ séricos, por separar condições com sabida alteração na absorção intestinal de Ca^(92, 93) e por ser de fácil utilização ambulatorial. Em 1985, Heaney e Recker⁽⁸⁶⁾ sugeriram que a absorção de ^{45}Ca , medida pela atividade específica sérica 5 horas após uma refeição com aproximadamente 200 mg Ca, seria uma medida da absorção “verdadeira” de Ca por eles comparada com vários estudos de balanço metabólico ou duplo radioisotópicos. Em virtude das possíveis vantagens destas duas propostas, o teste sugerido por Marshall & Nordin foi comparado com o sugerido por Heaney & Recker, na segunda parte deste estudo, com a finalidade de verificar a relação dos mesmos entre si e com os níveis séricos de calcitriol, bem como suas vantagens e limitações para aplicar na prática médica rotineira.

3. OBJETIVOS

3.1 determinar a absorção intestinal de cálcio, com baixa concentração do carreador, em mulheres normais, perimenopáusicas, ambulatoriais e na dieta usual;

3.2 verificar se a absorção intestinal de cálcio, com carreador em dose baixa, tem influência na massa óssea e nos marcadores da atividade óssea destas mulheres.

3.3 comparar a variação e a reprodutibilidade dos testes da absorção intestinal de Cálcio com o Ca carreador em dose baixa (20 mg) e em dose alta (250 mg), no intervalo de 7 dias, em mulheres normais, na dieta usual;

3.4 comparar estes testes de absorção de Ca em suas relações com os níveis séricos de Calcitriol.

3.5 avaliar a variação da repetição da determinação dos níveis séricos de Calcitriol, no intervalo de 7 dias, nas mesmas mulheres.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Indivíduos

Na primeira parte do estudo, feita para avaliar as relações da absorção intestinal de Ca com a massa óssea, foram avaliadas mulheres pré (PREM) e pós-menopáusicas (MENO) que participavam de outros projetos da Unidade de Estudos Ósseos do Serviço de Endocrinologia da Indiana University School of Medicine. Somente as mulheres brancas que não apresentassem doenças e que não usassem medicamentos, suplementos minerais ou vitamínicos que sabidamente interferem no metabolismo do cálcio, foram incluídas. Muitas das mulheres convidadas a participar deste estudo também faziam parte de outros projetos da Unidade de Estudos Ósseos :

4.1.1 - 36 mulheres que participavam de um acompanhamento longitudinal para avaliar a variação da massa óssea com a idade⁽⁹⁴⁾ 7 foram excluídas, 4 por uso de estrógenos, 1 por ter sido diagnosticado doença celíaca, 1 por hiperparatireoidismo e 1 outra por não ter feito densitometria óssea dentro do prazo estipulado, restando 29 mulheres sendo 11 pré-menopáusicas;

4.1.2 - 57 mulheres gêmeas (27 pares, mais 3 sem o respectivo par) que

estavam sendo avaliadas para verificar a importância da hereditariedade na massa óssea ⁽⁹⁵⁾, foram excluídas 30, 27 pelo sorteio de uma de cada par e 3 por usarem estrógenos, restando 27 mulheres, sendo 17 pré-menopáusicas.

4.1.3 - 60 mulheres, foram recrutadas para testar a reprodutibilidade dos métodos de absorção de Ca, para a segunda parte deste estudo. 33 destas, sendo 9 pré-menopáusicas, foram também incluídas na primeira parte deste estudo. As exclusões para o estudo clínico foram: 8 por usarem estrógenos, 9 por não terem completado o protocolo, e outras 10 por apresentarem doenças comuns como hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus ou hipotireoidismo, ainda que estáveis em uso dos respectivos medicamentos. Estas últimas foram excluídas pela incerteza do impacto de tais alterações nas eventuais conclusões.

Todas as mulheres pós-menopáusicas não menstruavam há mais de um ano, ou possuíam determinações hormonais compatíveis com menopausa feitas em outros projetos. As mulheres pós-menopáusicas precoces, antes dos 40 anos de idade, cirúrgica ou não, tiveram seu estado hormonal caracterizado por medida de FSH maior que 40 mUI/ml ⁽⁹⁶⁾. 36 mulheres pré-menopáusicas menstruavam normalmente sem uso de anticoncepcionais ou outros esteróides sexuais. Uma mulher histerectomizada, não ooforectomizada, com nível sérico de estradiol normal foi incluída neste grupo.

Portanto, após estas exclusões, restaram 89 mulheres, 52 pós-menopáusicas (MENO) e 37 pré-menopáusicas (PREM), para o estudo dos efeitos da menopausa na absorção intestinal de Ca.

A segunda parte do presente estudo foi feita para avaliar a reprodutibilidade dos testes da absorção intestinal de Ca e da dosagem sérica de calcitriol, repetindo-os em um intervalo de 7 dias. Foram recrutadas 60 mulheres, cuja idade variou entre 30 e 70 anos, sendo 12 pré-menopáusicas. Estas mulheres foram divididas aleatoriamente em 3 grupos: 1) 20 mulheres para avaliar a variação da repetição do teste de absorção com carreador em dose baixa; 2) 20 mulheres para avaliar a variação da repetição dos testes com carreador em dose alta, porém duas não completaram as determinações; 3) 20 mulheres para comparar a relação entre os testes de absorção com o carreador em dose baixa e com carreador em dose alta. Em 28 destas mulheres foi repetida a determinação da dosagem sérica em jejum de calcitriol após uma semana. Desta segunda parte do trabalho, não foram excluídas as mulheres que usavam estrógenos ou outro medicamento de forma regular. Todas estavam em bom estado geral, fazendo suas tarefas rotineiras e foram orientadas a não modificar seus medicamentos nem seus hábitos alimentares.

Todas as participantes foram instruídas sobre os possíveis efeitos da irradiação e assinaram o termo de consentimento que havia sido previamente aprovado pela Comissão de Ética da Indiana University School of Medicine.

4.2 Métodos

Todas as mulheres incluídas na análise tiveram hemograma, exame qualitativo de urina e um painel de testes bioquímicos normais. Todas fizeram as coletas de sangue e da segunda micção de urina, em jejum de pelo menos 10 horas, no mesmo dia dos testes de absorção intestinal de Ca. Após separar as amostras de soro e urina, estas

foram mantidas congeladas até a análise. As densitometrias ósseas foram feitas dentro da mesma semana destes testes.

A maioria das análises bioquímicas foram feitas em aparelhos “Autoanalyzer”, de acordo com técnicas rotineiras no laboratório central do Hospital Universitário da Indiana University School of Medicine. No laboratório do Centro de Pesquisa Clínica Geral (GCRC), foram feitas as seguintes determinações, todas em duplicata:

4.2.1 - Cálcio (Ca) total, sérico e urinário - medidos por espectrofotometria de absorção atômica, em aparelho da marca Perkin-Elmer 2380 ⁽⁹⁷⁾, com coeficientes de variação (CV) entre-ensaios de 6,6% e 7,6%, respectivamente, no soro e na urina.

4.2.2 - Fosfato (P), sérico - medido pelo método de Fiske e Subbarow ⁽⁹⁸⁾ com CV entre-ensaios de 8,8%.

4.2.3 - Creatinina (Cr) urinária - determinada pelo método de Jaffe, em autoanalisador marca Beckman, com CV entre-ensaios de 7% ⁽⁹⁹⁾.

4.2.4 - Hidroxiprolina (OHP_r.) urinária - medida de acordo com método de Kivirikko et al. ⁽¹⁰⁰⁾, com CV entre-ensaios de 14%.

4.2.5 - Fosfatase ácida tartarato-resistente (Fosf.Ac.TR) - determinada pelo método descrito por Lau et al. ⁽¹⁰¹⁾, modificada por Sisson de Castro et al. ⁽¹⁰²⁾ cujos valores para mulheres pré-menopáusicas variam de 4,0 a 11,6 U/L e para as mulheres pós-menopáusicas variam de 6,0 a 14,0 U/L, com CV de 3,7% intra-ensaio e 8,7%

entre-ensaios.

Os valores normais das razões Ca/Cr urinários (mg/mg) para mulheres pré-menopáusicas variam de 0,027 a 0,285 e para pós-menopáusicas de 0,011 a 0,451. Os valores normais das razões OHP_r/Cr urinárias (mg/mg) nas mulheres pré-menopáusicas variam de 0,010 a 0,034 e nas pós-menopáusicas de 0,011 a 0,067.

4.2.6 - Osteocalcina (OC) sérica - medida por radioimunoensaio (RIE), usando antissoro de coelho contra osteocalcina bovina, conforme a modificação do método de Price e Nishimoto ⁽¹⁰³⁾, descrita por Epstein et al. ⁽¹⁰⁴⁾, com CV intra-ensaio menor que 7,0% e CV entre-ensaios menor que 10%, cujos valores normais para mulheres pré-menopáusicas vão de 1,2 a 19,6 e para as pós-menopáusicas de 3,5 a 24,6 ng/ml;

4.2.7 - Paratormônio sérico (PTH) - medido por RIE, que reconhece o hormônio intacto e fragmentos carboxi-terminal, descrito por Wiske et al. ⁽¹⁰⁵⁾, com CV intra-ensaio de 12% e CV entre-ensaios de 16,7%, e cujos valores normais para mulheres pré-menopáusicas variam de 132 a 519 e para mulheres pós-menopáusicas de 135 a 728 pg/ml.;

4.2.8 - 25-hidroxicolecalciferol sérico (25-OHD₃ ou calcidiol) - determinado por ensaio de ligação proteica, empregando soro de ratos deficientes em vitamina D, segundo a técnica descrita por Shepard et al. ⁽¹⁰⁶⁾, cujo CV intra-ensaio = 9,9 % e entre-ensaios = 10,1%, e, os valores normais variam de 5 - 92 ng/ml;

4.2.9 - 1,25 dihidroxicolecalciferol sérico (1,25-OH₂D₃ ou calcitriol) - medido

por ensaio de ligação proteica, utilizando receptor citossólico de timo de bezerro após purificação em coluna Bond Elut E180H (Analytichem International), segundo Reinhardt et al. ⁽¹⁰⁷⁾, cujos CV intra-ensaio = 11,0% e entre-ensaios = 12,3%, e, os valores normais variam de 8-73 pg/ml;

Descrições das técnicas de absorção intestinal de Ca empregadas:

Duas técnicas de absorção intestinal de Ca foram empregadas. Na primeira parte deste estudo, usou-se a técnica, com carreador de Ca, em dose baixa, 20 mg, conforme o protocolo desenvolvido na Unidade de Metabolismo Mineral (MRC) de Leeds, Inglaterra, e descrita por Marshall e Nordin ⁽⁸⁵⁾. Na segunda parte, comparou-se esta técnica com a descrita por Heaney e Recker ⁽⁸⁶⁾ que emprega o carreador de Ca em dose alta, 250 mg. Ambos os testes foram repetidos, após uma semana, nas mesmas mulheres.

4.2.10 - Absorção intestinal Ca com dose baixa do carreador- 20 mg de Ca elemento, marcados com 5 μ Ci de ⁴⁵Ca:

4.2.10.1 - Preparação da solução estoque de Ca radioativo:

- a solução de ⁴⁵CaCl₂ chega com uma atividade de 1 mCi /100 μ l e é diluída com H₂O desionizada, de forma estéril, na capela de fluxo laminar, usando todo material descartável, até uma atividade de 1 μ Ci/100 μ l. Esta solução é datada e mantida refrigerada até ser utilizada;

4.2.10.2 - Preparação da dose de Ca radioativo administrada:

- 2 ml de uma solução 250 mM de CaCl_2 é pipetada em frasco plástico tipo “beaker”;
- 500 μl de uma solução estoque de ^{45}Ca (1 μCi /100 μl) + \underline{x} μl para ajustar para o decaimento do ^{45}Ca , cuja meia-vida = 162 dias, e manter os 5 μCi , e, aproximadamente, 40.000 cpm ;
- adiciona-se H_2O destilada, transferindo para um cilindro volumétrico, até completar 250 ml e daí para um copo descartável;
- 1 ml desta solução é guardada refrigerada para as contagens do padrão; o restante é ingerido completamente pelo paciente.

4.2.10.3 - Coleta das amostras de sangue:

- após jejum noturno de 12 horas, coleta-se sangue para todas as determinações laboratoriais, sendo 10 ml para as contagens basais (*background*) e do padrão administrado (B-0). Exatamente 60 minutos após a ingestão da bebida com o isótopo de Ca , nova amostra de 10 ml de sangue é colhida para avaliar a contagem da dose absorvida (B-60).

4.2.10.4 - Preparação das amostras para a contagem:

- 2 ml de soro das amostras são transferidos aos frascos de contagem,

contendo 17 ml de líquido de cintilação. À amostra B-0 adiciona-se 0,1 ml da solução de ^{45}Ca administrada a cada paciente;

- após misturar vigorosamente e deixar as amostras em repouso, fechadas dentro do contador beta por 30 min, iniciam-se as contagens, 20 minutos para o basal (*background*) do instrumento e dos indivíduos e, por 200 minutos ou até 1% de erro de contagem, para as amostras B-0 e B-60, com toda a janela de energia da escala do trício aberta, de 0 a 270 keV.

4.2.10.5. Cálculo da absorção de Ca conforme a fórmula:

- atividade da dose radioativa absorvida por litro de plasma (AD/L) = (contagem B-60 - contagem basal) x 500 ;
- porcentagem absorvida da dose administrada por litro de plasma, %

$$\text{AD/L} = [(\text{contagem B-60} - \text{contagem basal}) \times 500 / (\text{contagem B-0} - \text{contagem basal}) \times 2490] \times 100;$$
- % AD/L corrigida para o volume da distribuição do Ca extracelular ou Fc = % AD/L x 0,15 x peso corporal (em kg);
- ALFA ou velocidade de absorção = $2,54 \text{ Fc}^2 + 1,17 \text{ Fc} + 0,05$
 (calculada pelo programa fornecido pelo Dr. David H. Marshall).

4.2.11 - A absorção intestinal Ca com dose alta do carreador- 250 mg de Ca

elemento, marcados com 5 μCi de ^{45}Ca

4.2.11.1 - Preparação da dose de Ca radioativo administrada:

- ao carreador de Ca, administrado como suco de laranja fortificado com citrato-malato de Ca, Citrus Hill, marca registrada da Procter & Gamble Co. (cuja concentração de Ca foi confirmada em cada frasco), adiciona-se uma quantidade da solução de ^{45}Ca calculada da mesma forma que em 4.2.10.2. no teste anterior, dilui-se esta solução com H_2O destilada até 250 ml para conter 1 mg de Ca/ml;
- 1 ml desta solução é separada para a contagem do padrão;
- os indivíduos também ingeriram 1 fatia torrada de pão feito com farinha de trigo sem Ca e 5 ml de geléia de uva ou de damasco;

4.2.11.2 - Coleta das amostras de sangue:

- sangue é coletado e processado da mesma forma que no teste anterior, porém, nos tempos zero, após 3 e 5 horas da administração da solução radioisotópica, sendo permitido um almoço leve antes da medida das 5 horas;

4.2.11.3 - Preparação das amostras para a contagem:

- B-0, B-3 e B-5 são processadas igualmente ao teste anterior;

4.2.11.4 - Cálculo da absorção de Ca:

- % AD/L calculada, conforme em 4.2.10.5., para as amostras B-3 e B-5;

- absorção fracionária (Abs.Frac.) ou fração da dose absorvida, em 3 e 5 horas, calculada conforme algoritmos fornecidos pelo Dr. Robert P. Heaney para 3 h (comunicação pessoal) e para 5 h ⁽¹⁰⁸⁾:

Abs.frac. 3 h = (1,895 x %AD/L 3h / g Ca) + (0,1256 x superfície corporal) - 0,1775,

Abs.frac. 5 h = (0,3924 x %AD/L 5h / g Ca) x peso ^{0,4} x altura ^{0,46}.

4.2.12 - Reagentes e Equipamento utilizados para os testes de absorção intestinal de Ca

4.2.12.1 - CaCl₂.2H₂O, grau analítico, peso molecular 147,02, Sigma, # C4901.

4.2.12.2 - Líquido de cintilação Packard Instagel XF, # 601339.

4.2.12.3 - ⁴⁵Ca radioativo, 1 mCi /100 µl, New England Nuclear, # NEZ 013.

4.2.12.4 - Pipetas tipo Oxford, vários tamanhos, com ponteiros descartáveis, marca Rainman.

4.2.12.5 - Contador Beta , Beckman, modelo LS 3133, Beckman Instruments, Inc.

4.2.13.- Determinações das densitometrias ósseas(DO)

As DO foram feitas na Unidade de Estudos Ósseos, do Serviço de Endocrinologia da Indiana University School of Medicine, no antebraço não dominante na altura do terço médio (mR) e na porção mais distal (dR) do rádio, de acordo com a técnica anteriormente descrita pelo mesmo serviço e amplamente validada ⁽⁹⁶⁾. As DO foram expressas como conteúdo mineral ósseo (CMO), em g/cm, ou como densidade mineral óssea (DMO), CMO/largura, em cm, do rádio na região da medida, em g/cm²; Foram utilizados densitômetros por absormetria fotônica simples, Norland modelos 178 e 278 (Norland Instruments, Fort Atkinson, Wisconsin) e Lunar SP2 (Lunar Radiation Corporation, Madison, Wisconsin), cuja reprodutibilidade a longo prazo, na mesma instituição, é aproximadamente 2% na região média do rádio e 4% na região distal ⁽⁹⁴⁾. Os valores das medidas nos dois aparelhos foram corrigidos de acordo com as fórmulas:

Conteúdo Mineral Ósseo - medial no Rádio Lunar = $0,0169 + (0,998 \times \text{Norland})$,

Conteúdo Mineral Ósseo - distal no Rádio Lunar = $0,0232 + (0,962 \times \text{Norland})$.

4.2.14 - Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando o programa SPSS/PC. Feita a análise descritiva e os testes de normalidade do programa, aplicou-se o teste t de Student para comparar as mulheres PREM com as MENO. O teste U de Mann-Whitney foi empregado para as variáveis sem distribuição normal. Para analisar a correlação do teste da absorção intestinal de cálcio com os demais parâmetros, utilizou-se o teste de Spearman. A análise de regressão linear múltipla passo-a-passo foi utilizada para

verificar se a absorção intestinal de cálcio das mulheres pré e pós-menopáusicas estaria influenciada pela idade. Utilizou-se análise de regressão linear simples para verificar a relação dos testes de absorção entre si ou com as dosagens do calcitriol e, a análise de variância para estimar a reprodutibilidade dos diferentes testes de Absorção de Ca e das determinações de Calcitriol. Para estimar o coeficiente de variação da repetição dos testes, nos mesmos indivíduos, utilizou-se a fórmula: raiz quadrada da variância intra-pares dividida pela média das determinações, expressos em porcentagem. Considerou-se significativo apenas os resultados com $p < 0,05$ (bicaudal).

5. RESULTADOS

5.1 - Avaliação da Absorção Intestinal de Cálcio e a sua Importância na Massa Óssea de Mulheres Perimenopáusicas Normais

5.1.1 - Características clínicas, laboratoriais e densitométricas das mulheres PREM e MENO

As principais características clínicas e laboratoriais das mulheres estudadas estão relacionada nas tabelas I e II. Os parâmetros bioquímicos em geral estão dentro da normalidade ou apresentam poucas alterações. Todas a mulheres que apresentaram um aumento da fosfatase alcalina (Fosf.Alc.) tiveram as transaminases e bilirrubinas dentro da normalidade. Nenhuma mulher com aumento nos níveis de PTH apresentou níveis anormais de creatinina ou Ca séricos, nem as com níveis pouco elevados dos metabólitos da vitamina D estavam usando suplementação vitamínica, outra que a existente nos alimentos consumidos na dieta habitual.

TABELA I. PARÂMETROS DAS MULHERES PRÉ-MENOPÁUSICAS

Parâmetro	(n)	Mediana	Valor Mínimo	Valor Máximo	Valores	Normais	Unidade
Idade	(37)	43	30	54	-	-	anos
Altura	(37)	1,64	1,52	1,78	-	-	metros
Peso	(37)	70,6	48,2	126,5	-	-	kg
Cálcio	(32)	9,1	8,3	9,8	8,4	- 10,8	mg/dl
Fósforo	(32)	3,6	2,7	4,4	2,5	- 4,8	mg/dl
Magnésio	(10)	1,8	1,5	2,1	1,5	- 2,7	mg/dl
Creatinina	(32)	0,80	0,6	1,1	0,8	- 1,4	mg/dl
Albumina	(32)	4,0	3,7	4,5	3,5	- 5,0	g/dl
Fosf. Alc.	(32)	67,5	40,0	157,0	25,0	- 125,0	U.I./l
Fosf. Ác. TR	(10)	8,2	5,4	12,2	4,0	- 11,6	U.I./l
Osteocalcina	(18)	7,0	2,3	22,6	3,5	- 24, 6	ng/ml
PTH	(19)	453,3	298,0	828,8	135,0	- 726,0	pg/ml
Calcidiol	(19)	30,1	9,2	65,4	5,0	- 92,0	ng/ml
Calcitriol	(20)	41,5	24,6	67,1	8,0	- 73,0	pg/ml
Ca/Cr.u	(26)	0,076	0,005	0,388	0,011	- 0,451	mg/mg
OHPr/Cr.u	(27)	0,021	0,006	0,037	0,011	- 0,067	mg/mg
ALFA	(37)	0,850	0,39	1,76	-	-	
CMO-mR	(37)	0,852	0,608	1,203	0,688	- 1,140	g/cm
DMO-mR	(37)	0,686	0,532	0,852	-	-	g/cm ²
CMO-dR	(37)	0,937	0,613	1,252	0,658	1,238	g/cm
DMO-dR	(37)	0,392	0,282	0,510	-	-	g/cm ²

n - número de indivíduos com a medida.

TABELA II. PARÂMETROS DAS MULHERES PÓS-MENOPÁUSICAS

Parâmetro	(n)	Mediana	Valor Mínimo	Valor Máximo	Valores	Normais	Unidade
Idade	(52)	59	40	76			anos
Tempo Menop.(52)	(52)	99,5	3,0	505	-	-	meses
Altura	(52)	1,61	1,46	1,75	-	-	metros
Peso	(52)	66,8	45,9	115,7	-	-	kg
Cálcio	(48)	9,2	8,6	9,8	8,4	- 10,8	mg/dl
Fósforo	(47)	3,8	3,1	5,0	2,5	- 4,8	mg/dl
Magnésio	(34)	1,8	1,2	2,1	1,5	- 2,7	mg/dl
Creatinina	(48)	0,9	0,6	1,1	0,8	- 1,4	mg/dl
Albumina	(48)	4,0	3,4	4,4	3,5	- 5,0	g/dl
Fosf.Alc.	(48)	80,5	44,0	153,0	25,0	- 125,0	U.I./l
Fosf.Ác.TR	(24)	10,2	6,9	13,6	6,0	- 14,0	U.I./l
Osteocalcina	(44)	12,1	2,1	39,0	3,5	- 24,6	ng/ml
PTH	(43)	421,0	40,6	931,0	135,0	- 726,0	pg/ml
Calcidiol	(31)	24,4	10,1	121,1	5,0	- 92,0	ng/ml
Calcitriol	(32)	36,6	18,6	79,4	8,0	- 73,0	pg/ml
Ca/Cr.u	(48)	0,111	0,007	0,287	0,011	- 0,451	mg/mg
OHPr/Cr.u	(48)	0,028	0,001	0,088	0,011	- 0,067	mg/mg
ALFA	(52)	0,75	0,29	1,34	-	-	
CMO-mR	(52)	0,809	0,448	1,033	0,503	- 1,067	g/cm
DMO-mR	(52)	0,641	0,333	0,769	-	-	g/cm ²
CMO-dR	(52)	0,827	0,471	1,266	0,464	- 1,140	g/cm
DMO-dR	(52)	0,348	0,210	0,510	-	-	g/cm ²

(n) = número de indivíduos com a medida.

Tempo Menop.= número de meses desde a menopausa.

A distribuição dos valores individuais de ALFA das mulheres PREM e MENO estão representados na figura 1 onde pode-se observar sua dispersão nos dois grupos de mulheres estudados.

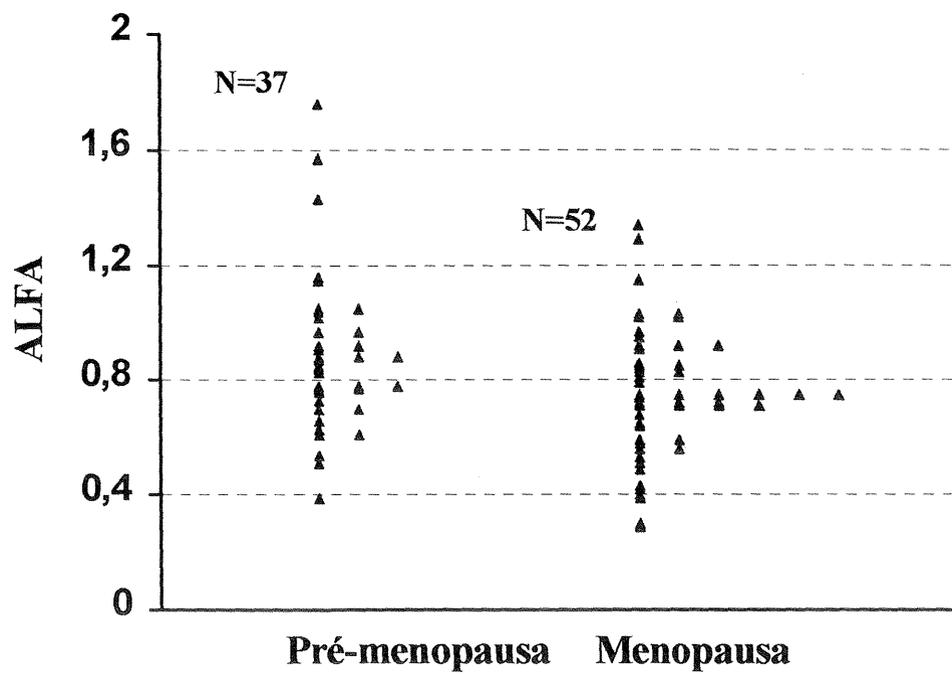


FIGURA 1. VALORES INDIVIDUAIS DA ABSORÇÃO INTESTINAL DE CA, ALFA NAS MULHERES PRÉ-MENOPÁUSICAS E PÓS-MENOPÁUSICAS

Na tabela III, estão descritas as comparações entre as mulheres PREM e MENO.

Como esperado, as mulheres MENO eram mais velhas e mais baixas que as PREM. Além disso, as MENO apresentaram os níveis séricos de Ca, P, Fosf.Alc., Fosf.Ac.TR, razão OHP_r/Cr urinárias mais elevados que as mulheres PREM. Por outro lado, as medidas da massa óssea, CMO-mR, DMO-mR, CMO-dR e DMO-dR foram significativamente inferiores nas mulheres MENO. A medida da absorção intestinal de Ca, ALFA, assim como sua transformação logarítmica, logALFA, foram significativamente mais baixas nas mulheres MENO do que nas PREM. Os demais parâmetros analisados não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos de mulheres.

TABELA III. COMPARAÇÕES ENTRE MULHERES PRÉ E PÓS-MENOPÁUSICAS.

	Mulheres PREM*	Mulheres MENO*	P
Idade	42,38 ± 5,95	58,83 ± 7,26	< 0,001**
Tempo Menop.	--	128,06 ± 104,50	N/A
Altura	1,65 ± 0,06	1,61 ± 0,06	0,009**
Peso	71,80 ± 16,63	67,95 ± 13,47	0,231
Cálcio	9,06 ± 0,33	9,26 ± 0,31	0,009**
Fósforo	3,60 ± 0,42	3,82 ± 0,39	0,024**
Magnésio	1,79 ± 0,20	1,80 ± 0,19	0,9
Creatinina	0,84 ± 0,12	0,86 ± 0,12	0,5
Albumina	4,07 ± 0,21	4,01 ± 0,22	0,26
Fosf.Alcalina	71,06 ± 24,68	85,10 ± 25,17	0,016**
Fosf.Ácida TR	8,11 ± 2,08	10,36 ± 1,99	0,006**
Osteocalcina	9,67 ± 6,37	12,52 ± 8,02	0,18
PTH	477,18 ± 144,68	434,58 ± 173,76	0,35
Calcidiol	32,02 ± 15,45	30,96 ± 20,43	0,85
Calcitriol	44,40 ± 12,28	39,83 ± 14,45	0,25
Ca/Cr u.	0,10 ± 0,08	0,11 ± 0,07	0,44
OHPr/Cr u.	0,022 ± 0,008	0,028 ± 0,015	0,048**#
ALFA	0,88 ± 0,28	0,75 ± 0,23	0,027**#
logALFA	-0,168 ± 0,298	-0,334 ± 0,332	0,018**
CMO-mR	0,864 ± 0,115	0,804 ± 0,127	0,025**
DMO-mR	0,695 ± 0,068	0,629 ± 0,088	<0,001**
CMO-dR	0,948 ± 0,147	0,835 ± 0,157	0,001**
DMO-dR	0,392 ± 0,053	0,352 ± 0,061	0,001**

* Média ± 1 desvio-padrão. Os valores de P assinalados com ** são os considerados com significância estatística; os assinalados com # foram comparados pelo teste U.

5.1.2 -Correlações da Absorção Intestinal de Cálcio, ALFA, com parâmetros clínicos, laboratoriais e densitométricos

Foram realizados testes de correlação da absorção intestinal de Ca, ALFA, e os diversos parâmetros na tentativa de verificar as possíveis associações. Empregou-se o teste de Spearman pois ALFA, tem, sabidamente, distribuição não normal. Nesta análise foram incluídas todas as mulheres (PREM + MENO) para se ter suficiente poder estatístico. Os resultados estão apresentados na tabela IV, dispostos na seguinte seqüência: parâmetros clínicos, bioquímicos séricos, marcadores do metabolismo ósseo, hormônios controladores da absorção de Ca e medidas densitométricas.

A absorção intestinal de Ca, ALFA, apenas se correlacionou fraca e inversamente com a IDADE, $r = - 0,223$, porém, significativamente, $p = 0,036$. Correlações similares foram observadas após a transformação logarítmica de ALFA. Com as demais variáveis clínicas, bioquímicas, hormonais e densitométricas não se verificou correlação significativa.

**TABELA IV. CORRELAÇÕES DA ABSORÇÃO DE CÁLCIO COM OS
PARÂMETROS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E
DENSITOMÉTRICOS**

	ALFA Rs
Peso	0,119
Altura	0,123
Idade	- 0,223**
Tempo Menop	0,049
Cálcio sérico	- 0,030
Fósforo sérico	- 0,100
Creatinina sérica	- 0,136
Albumina sérico	0,071
Cálcio/Cr. u.	0,132
Hidroxirolina/Cr. u.	0,101
Fosf.Ácida TR.	- 0,066
Fosf.Alcalina	- 0,032
Osteocalcina	- 0,118
Calcidiol	- 0,236
Calcitriol	0,151
Paratormônio	- 0,131
CMO-mR	0,045
DMO-mR	0,072
CMO-dR	0,092
DMO-dR	0,120

** p= 0,036

5.1.3 -Regressão Linear Múltipla das variáveis relacionadas com ALFA, após transformação logarítmica

Com o objetivo de analisar se a menor absorção intestinal de Ca das mulheres MENO estava relacionada com a idade, realizou-se a análise de regressão linear múltipla passo-a-passo, utilizando-se, logALFA, para normalizar a distribuição, como a variável dependente, e idade e menopausa como variáveis independentes. Os resultados estão na tabela V.

Verifica-se, nesta tabela, que o efeito da idade sobre ALFA, após sua transformação logarítmica, tem uma relação inversa e com significância limítrofe. A variável menopausa, isoladamente, relaciona-se significativamente com logALFA ($r = -0,25$ $p = 0,018$). Entretanto, quando estas duas variáveis são incluídas no modelo de regressão múltipla, o coeficiente de regressão ajustado, da variável idade, se reduz marcadamente porém, o coeficiente de regressão ajustado da menopausa pouco se altera, de $r = -0,2503$ para $r = -0,2465$, mas a significância diminui.

TABELA V. REGRESSÃO LINEAR MÚLTIPLA DA INFLUÊNCIA DA IDADE E DA MENOPAUSA NA ABSORÇÃO INTESTINAL DE CÁLCIO

Variável	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	Coefficiente de Regressão Ajustado	P
Idade	-0,0060	0,0033	-0,1952	0,0668
Constante	0,0494	0,1727		0,7755

R Múltiplo = 0,1952 p = 0,0668

Variável	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	Coefficiente de Regressão Ajustado	P
Menopausa	-0,1652	0,0685	-0,2503	0,0180
Constante	-0,0032	0,1136		0,9776

R Múltiplo = 0,2503 p = 0,0180

Variável	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	Coefficiente de Regressão Ajustado	P
Idade	$-1,52 \times 10^{-4}$	0,0051	-0,0049	0,9762
Menopausa	-0,1626	0,1084	-0,2465	0,1370
Constante	$7,41 \times 10^{-4}$	0,1745		0,9966

R Múltiplo = 0,2503 p = 0,0619

5.2 - Comparações dos Testes de Absorção de Cálcio para Uso Ambulatorial

5.2.1 - Reprodutibilidade dos Testes de Absorção Intestinal de Cálcio

A reprodutibilidade dos testes de absorção de Ca foi avaliada de duas formas. A primeira, comparando a repetição dos testes, no intervalo de 1 semana, em grupo, por análise de variância e a segunda, comparando a variação individual na repetição de cada teste por regressão linear simples. A comparação das repetições dos testes de absorção de Ca, em grupo, com as duas doses do carreador de Ca está ilustrada na Tabela VI.

**TABELA VI. VARIAÇÃO DOS TESTES DA ABSORÇÃO DE CÁLCIO,
COM DOSES DIFERENTES DO CARREADOR,
REPETIDOS NO INTERVALO DE 7 DIAS**

	n	Média(DP)	Coefficiente de variação	Variância Intra Pares	Variância Entre Pares	F
<u>20 mg Ca</u>						
%AD/L 1 h	20	3,310(0,803)	17,4	0,334	0,919	2,75
ALFA	20	0,758(0,212)	24,0	0,033	0,059	1,79
<u>250 mg Ca</u>						
%AD/L 3 h	18	1,537(0,509)	14,2	0,048	0,294	6,16
%AD/L 5 h	18	1,261(0,326)	14,4	0,033	0,185	5,63
Abs.Frac.3 h	18	0,355(0,078)	12,6	0,002	0,010	4,45
Abs.Frac.5 h	18	0,354(0,085)	15,5	0,003	0,012	4,64

n = número de indivíduos que repetiram cada teste

DP = desvio-padrão da média de todos os testes do mesmo tipo

Coefficiente de variação - em porcentagem

Pela análise de variância, as medidas do teste de absorção com carreador alto (250 mg de Ca) foram mais reprodutíveis que a do com carreador baixo (20 mg Ca), expresso tanto como porcentagem da atividade da dose administrada por litro, %AD/L, ou como absorção fracionária (fração absorvida), em 5 ou 3 horas. As medidas da atividade em 3 horas foram um pouco mais reprodutíveis que as medidas em 5 horas.

5.2.2 - Precisão das diferentes medidas de Absorção Intestinal de Cálcio nos testes

A precisão das medidas dos testes foi avaliada repetindo cada tipo de teste de AbsCa nos mesmos indivíduos, após uma semana e verificando a relação entre as mesmas.

5.2.2.1 - Precisão das medidas dos Testes com Carreador de Ca em Dose Baixa

Para o teste com carreador de 20 mg, os cálculos das correlações estão mostradas na Tabela VII e os valores individuais e a equação da regressão linear na figura 2.

Verifica-se que as repetições das medidas da absorção de Ca, expressa como porcentagem de AD/L, foram mais precisas e se relacionaram significativamente, o que não ocorreu com ALFA

**TABELA VII. RELAÇÃO DA REPETIÇÃO DOS TESTES COM
CARREADOR EM DOSE BAIXA**

	n	r	F	P
%AD/L 1h teste 1 x 2	20	0,48	5,39	0,032
ALFA teste 1 x 2	20	0,268	1,388	0,25

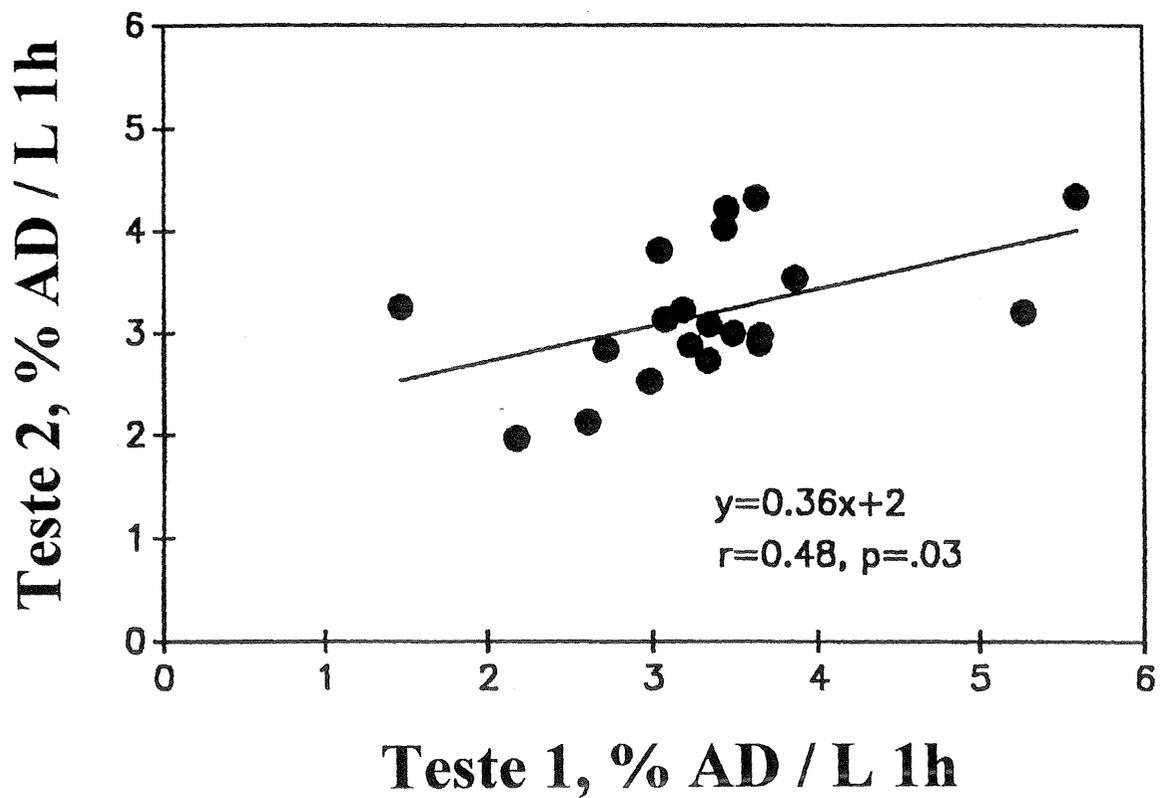


FIGURA 2. RELAÇÃO DA REPETIÇÃO DOS TESTES DE ABSORÇÃO DE Ca COM CARREADOR EM DOSE BAIXA EXPRESSAS COMO %AD/L

5.2.2.2 - Precisão das medidas de absorção de Ca nos Testes com Carreador de Ca com Dose Alta

Para comparar os testes com carreador de Ca de 250 mg, a repetição dos testes foi feita nas mesmas mulheres e as determinações em 3 e 5 horas após a ingestão da solução com o radioisótopo. Comparou-se %AD/L, 3 h ou 5 h, do primeiro teste com a segundo teste, %AD/L do primeiro teste com a Abs.Frac.do segundo tanto em 3 como em 5 h e a Abs.Frac. do primeiro com a do segundo teste em 3 e 5 h.

Os resultados estão ilustrados na Tabela VIII e na figura 3, para o teste com carreador de 250 mg medido em 3 horas e nas Tabela IX e figura 4, para o teste medido em 5 horas.

Verifica-se que, também neste teste de absorção de Ca, com carreador em dose alta, a medida da atividade da dose radioativa foi mais precisa que a medida da absorção calculada pelo algoritmo e que, na repetição do teste, estas medidas se correlacionaram significativamente.

Também na medida da absorção após 5 horas, as medidas da atividade da dose radioativa administrada, %AD/L 5h, foram mais reprodutíveis que os respectivos cálculos da absorção fracionária de Ca 5h.

**TABELA VIII. RELAÇÃO DA REPETIÇÃO DOS TESTES COM
CARREADOR EM DOSE ALTA, MEDIDO APÓS 3 HORAS**

	n	r	F	P
%AD/L 3h teste 1 x 2	18	0,72	17,68	0,0007
%AD/L 3h x Abs.Frac.3h teste 1 x 2	18	0,66	12,04	0,003
Abs.Frac.3h teste 1 x 2	18	0,64	11,38	0,004

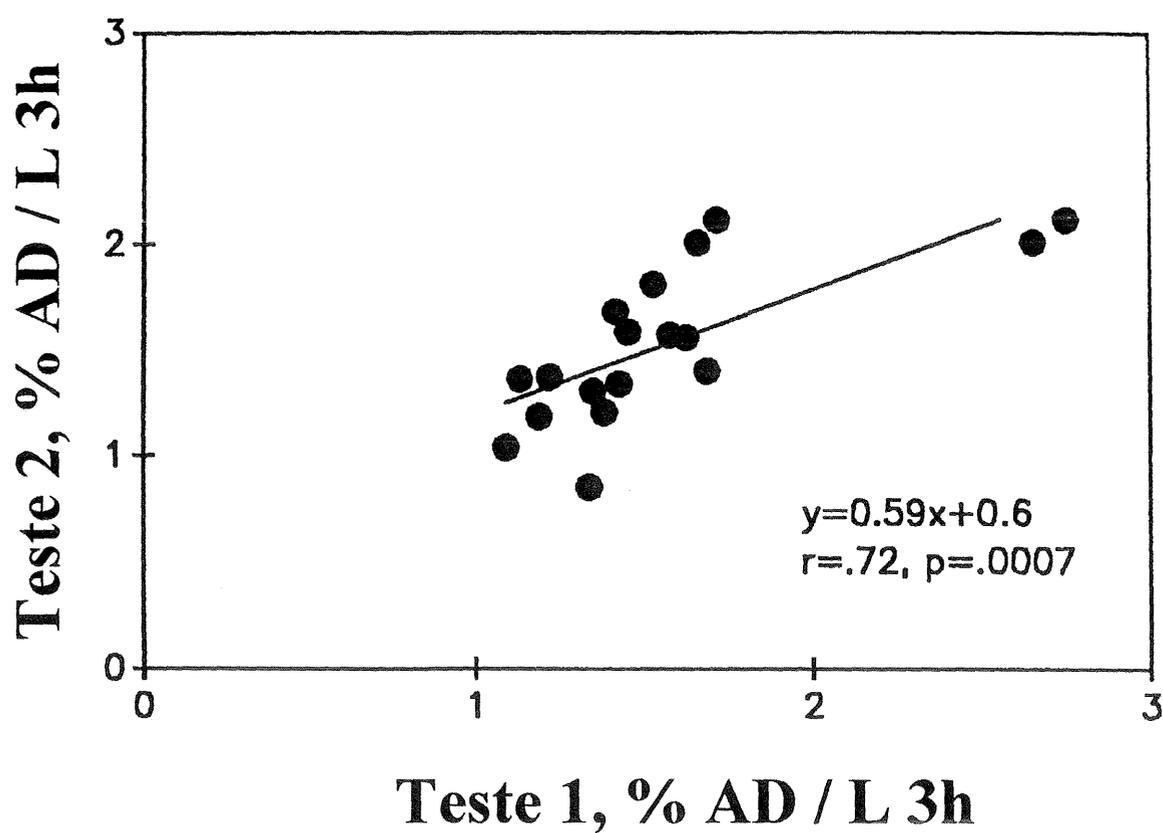


FIGURA 3. RELAÇÃO DA REPETIÇÃO DOS TESTES DE ABSORÇÃO DE Ca COM CARREADOR EM DOSE ALTA MEDIDO EM 3 HORAS, EXPRESSO COMO % AD/L

**TABELA IX. RELAÇÃO DA REPETIÇÃO DOS TESTES COM
CARREADOR EM DOSE ALTA MEDIDO APÓS 5 HORAS**

	n	r	F	P
%AD/L 5h teste 1 x 2	18	0,725	17,74	0,00066
%AD/L 5h vs Abs.Frac. 5h teste 1 x 2	18	0,677	13,55	0,002
Abs.Frac. 5h teste 1 x 2	18	0,66	12,5	0,0027

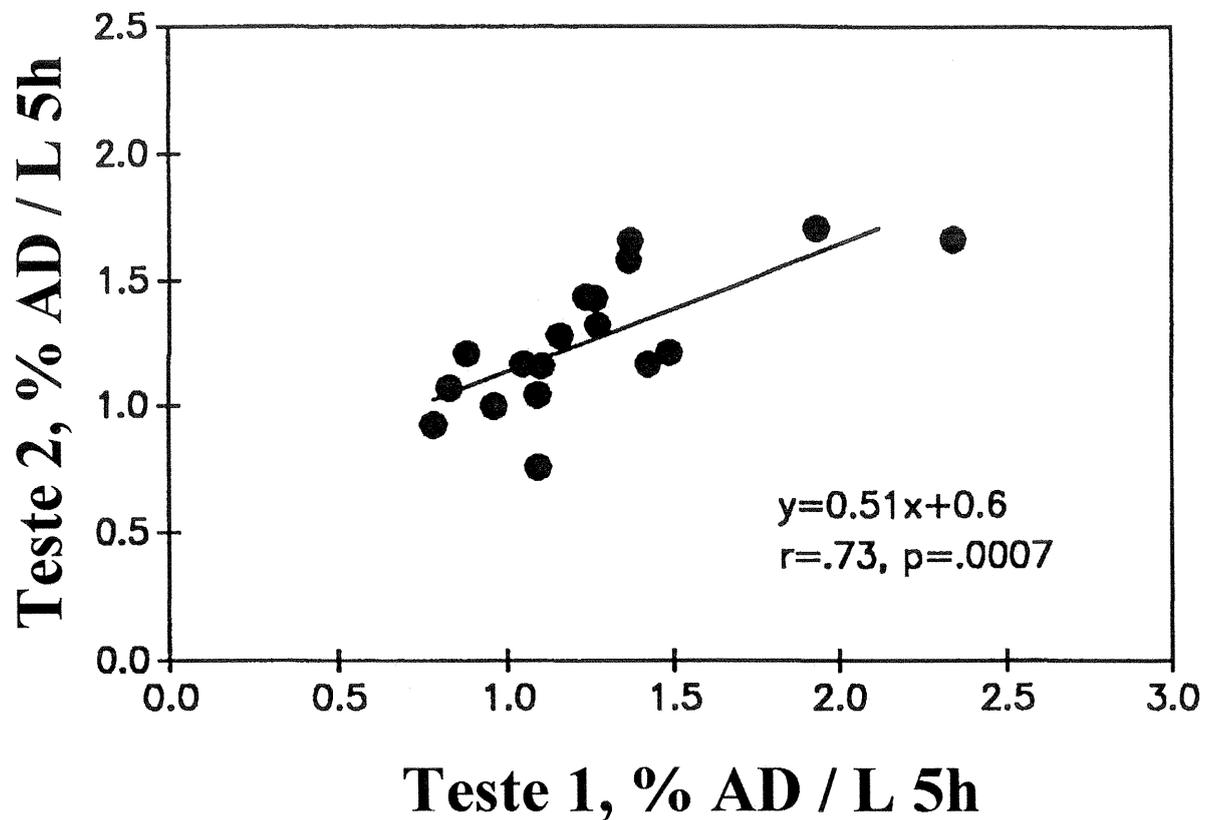


FIGURA 4. RELAÇÃO DA REPETIÇÃO DOS TESTES DE ABSORÇÃO DE Ca COM CARREADOR EM DOSE ALTA MEDIDO EM 5 HORAS EXPRESSOS COMO %AD/L

5.2.2.3 - Relação do Teste de Absorção de Ca com Carreador em Dose Baixa com o Teste com Carreador em Dose Alta

A comparação dos testes de absorção com carreador em dose alta com o teste carreador em dose baixa foi feita medindo ambos os testes como % AD/L, nas mesmas mulheres. A metade delas recebeu o teste com baixa dose do carreador, como primeiro teste, e a outra metade, recebeu o teste com carreador com dose alta, trocando-se o tipo de teste na repetição, 1 semana após. Os resultados, a relação e valor da significância estatística estão expostos na figura 5.

Verificamos que os testes com carreador em doses diferentes estão significativamente relacionados quando medidos nos mesmos indivíduos, no intervalo de uma semana, porém, não fortemente, $r= 0,63$.

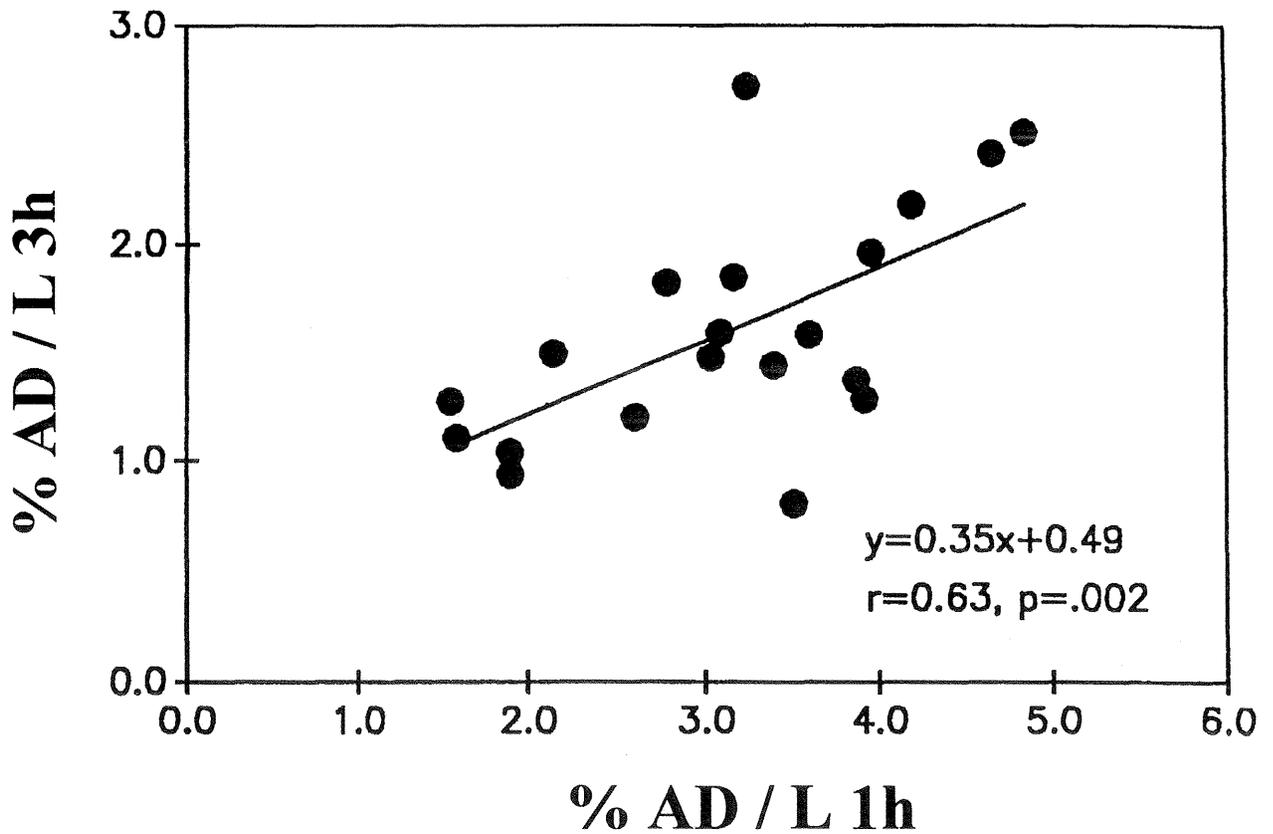


FIGURA 5. RELAÇÃO ENTRE OS TESTES DE ABSORÇÃO DE Ca COM CARREADOR EM DOSE ALTA, MEDIDO EM 3 HORAS, E O TESTE COM O CARREADOR EM DOSE BAIXA, MEDIDO EM 1 HORA, REPETIDOS COM INTERVALO DE 1 SEMANA

5.2.2.4 - Reprodutibilidade das Dosagens de Calcitriol séricos em Jejum

A avaliação da reprodutibilidade das dosagens de Calcitriol, repetidas no intervalo de 1 semana, foi feita em 28 mulheres que também repetiram o mesmo teste de absorção de Ca. A análise de variância encontra-se explicitada na Tabela X, o coeficiente de regressão e a significância estatística estão ilustrados na figura 6.

A repetição dos níveis séricos de calcitriol, medido após o jejum noturno, no intervalo de 1 semana, variaram pouco e estão significativamente relacionadas nas mulheres mantidas nas suas dietas habituais.

**TABELA X. VARIAÇÃO INTRA E ENTRE PARES DA REPETIÇÃO
DO CALCITRIOL EM JEJUM, APÓS 1 SEMANA**

n	Média ± DP	CV %	Variância Intra Pares	Variância Entre Pares	F
28	39,09± 13,80	3,29	1,28	7,8	6,1

Calcitriol em pg/ml

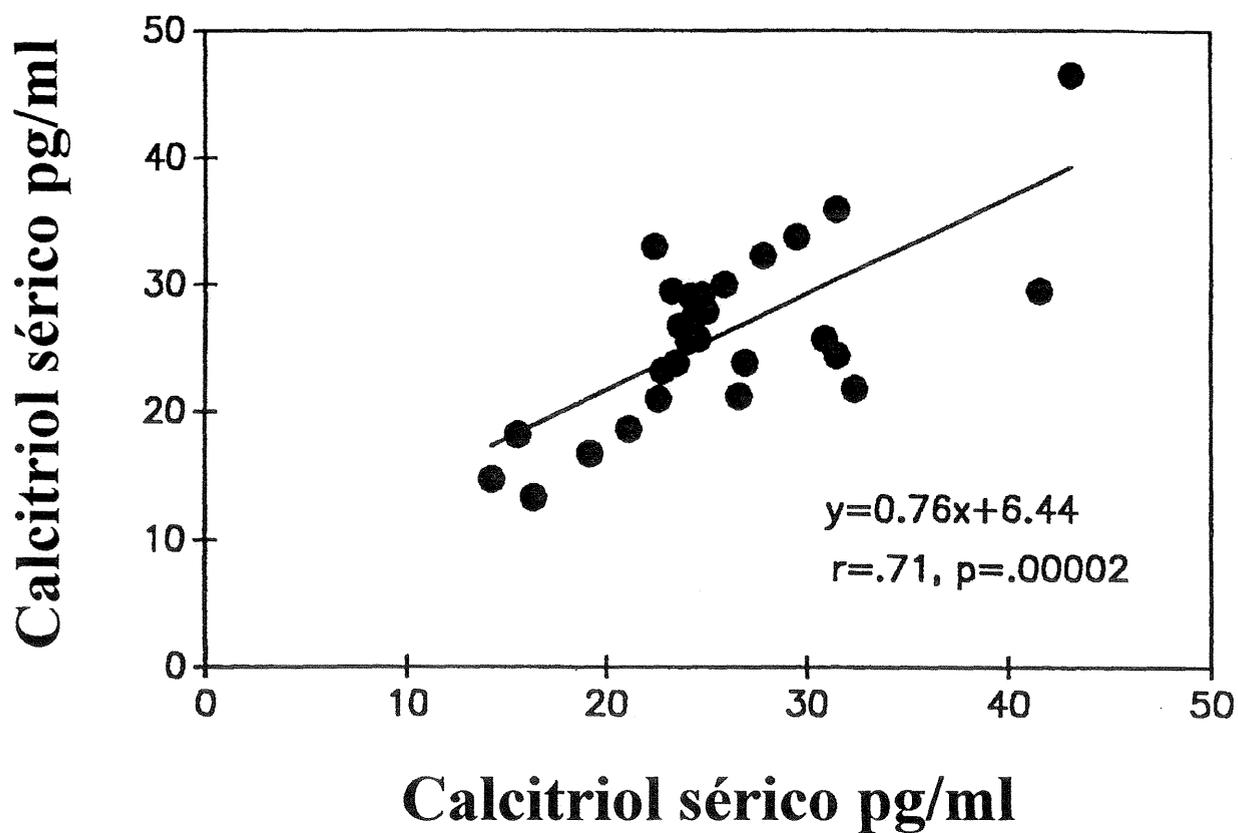


FIGURA 6. RELAÇÃO ENTRE AS MEDIDAS DE CALCITRIOL SÉRICO REPETIDAS APÓS UMA SEMANA

5.2.2.5 - Correlações dos Testes de Absorção de Ca com as Dosagens de Calcitriol sérico, em jejum

As correlações, entre os diferentes testes de Abs.Ca e os níveis séricos de Calcitriol, foram feitas em 27 mulheres. As correlações das medidas de absorção de cálcio com os níveis séricos de calcitriol estão indicadas na Tabela XI em ordem de significância decrescente, e as relações dos testes medidos como %AD/L estão ilustradas nas figuras 7, 8 e 9.

As concentrações de calcitriol séricos correlacionaram-se significativamente com as medidas dos testes com carreador de Ca em dose alta, mas não com as da absorção com carreador em dose baixa. Estas correlações estão ilustradas nas figuras 7, 8 e 9.

**TABELA XI. RELAÇÕES ENTRE A ABSORÇÃO DE CÁLCIO COM
CARREADOR ALTO OU BAIXO E OS NÍVEIS DE
CALCITRIOL**

	n	r	F	P
%AD/L 3h x calcitriol	27	0,492	8,3	0,008
Abs.Frac.3h x calcitriol	27	0,488	8,1	0,008
%AD/L 5h x calcitriol	27	0,486	8,0	0,009
Abs.Frac.5h x calcitriol	27	0,488	8,1	0,008
%AD/L 1h x calcitriol	27	0,15	0,82	0,37
ALFA x calcitriol	27	0,1	0,039	0,53

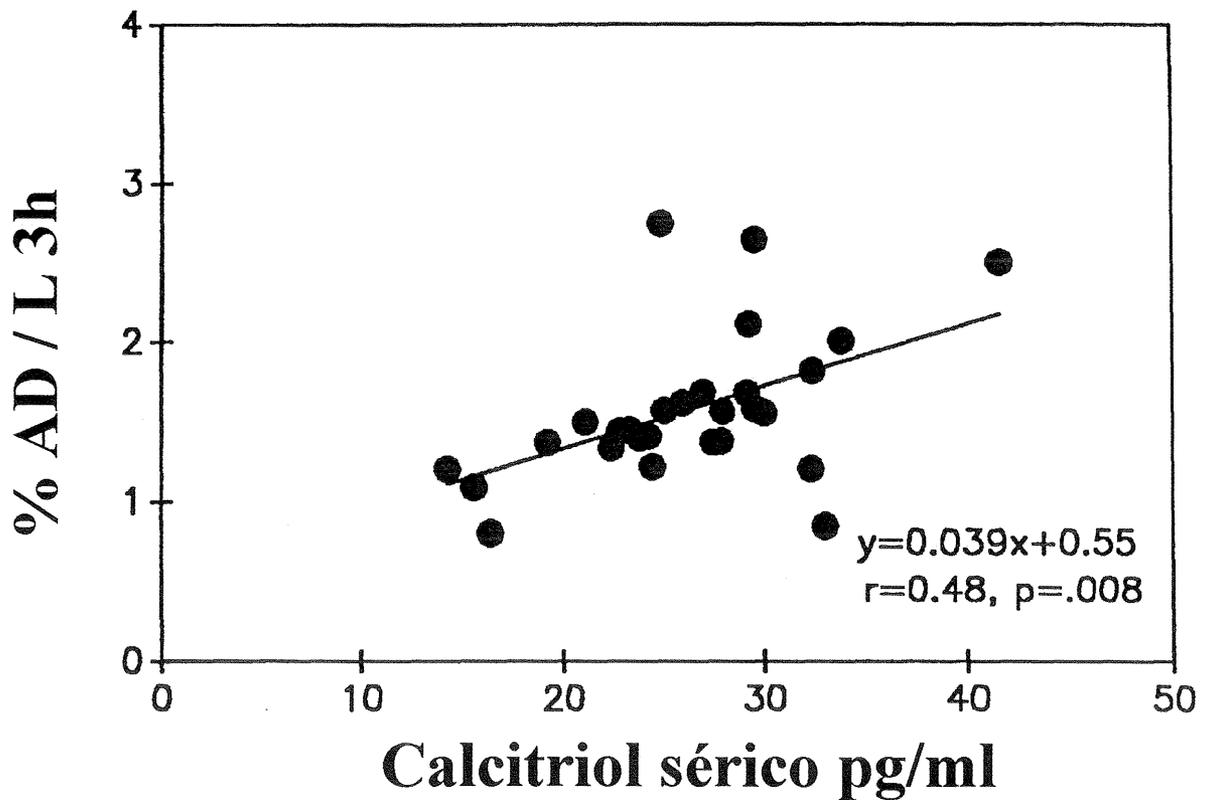


FIGURA 7. RELAÇÃO ENTRE AS MEDIDAS DA ABSORÇÃO INTESTINAL DE CA, COM CARREADOR EM DOSE ALTA, MEDIDA EM 3 HORAS E A DO CALCITRIOL SÉRICO

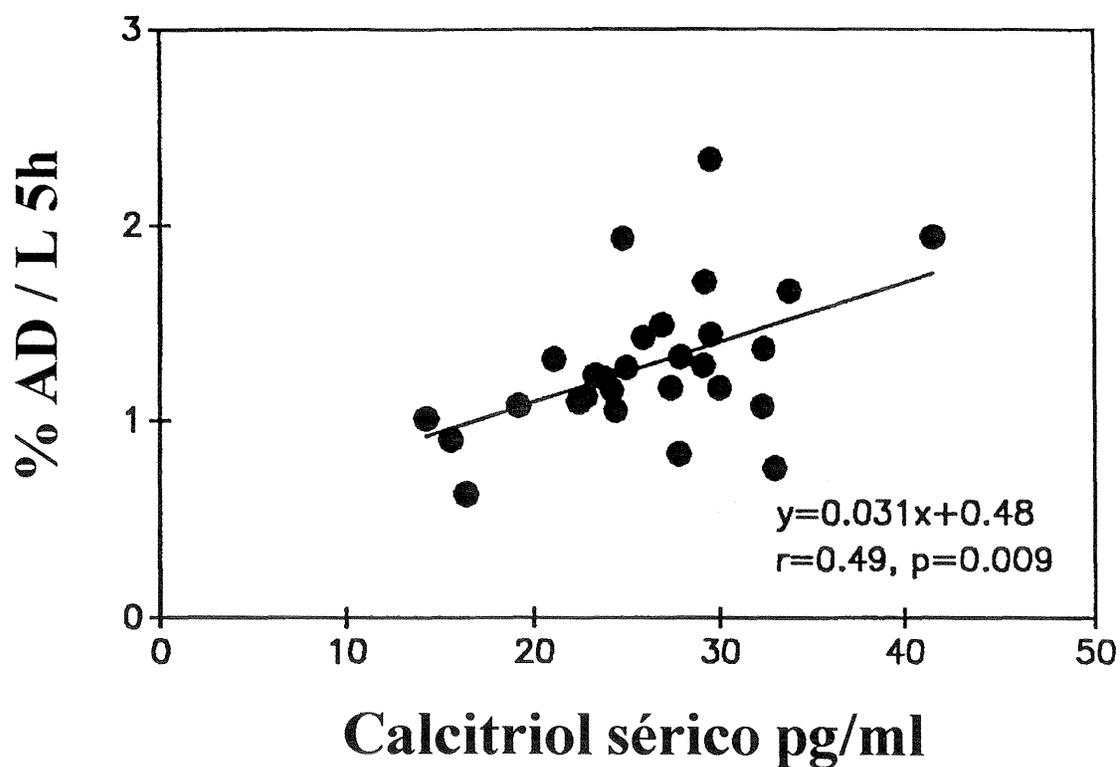


FIGURA 8. RELAÇÃO ENTRE AS MEDIDAS DA ABSORÇÃO INTESTINAL DE CA, COM CARREADOR EM DOSE ALTA, MEDIDA EM 5 HORAS E A DO CALCITRIOL SÉRICO

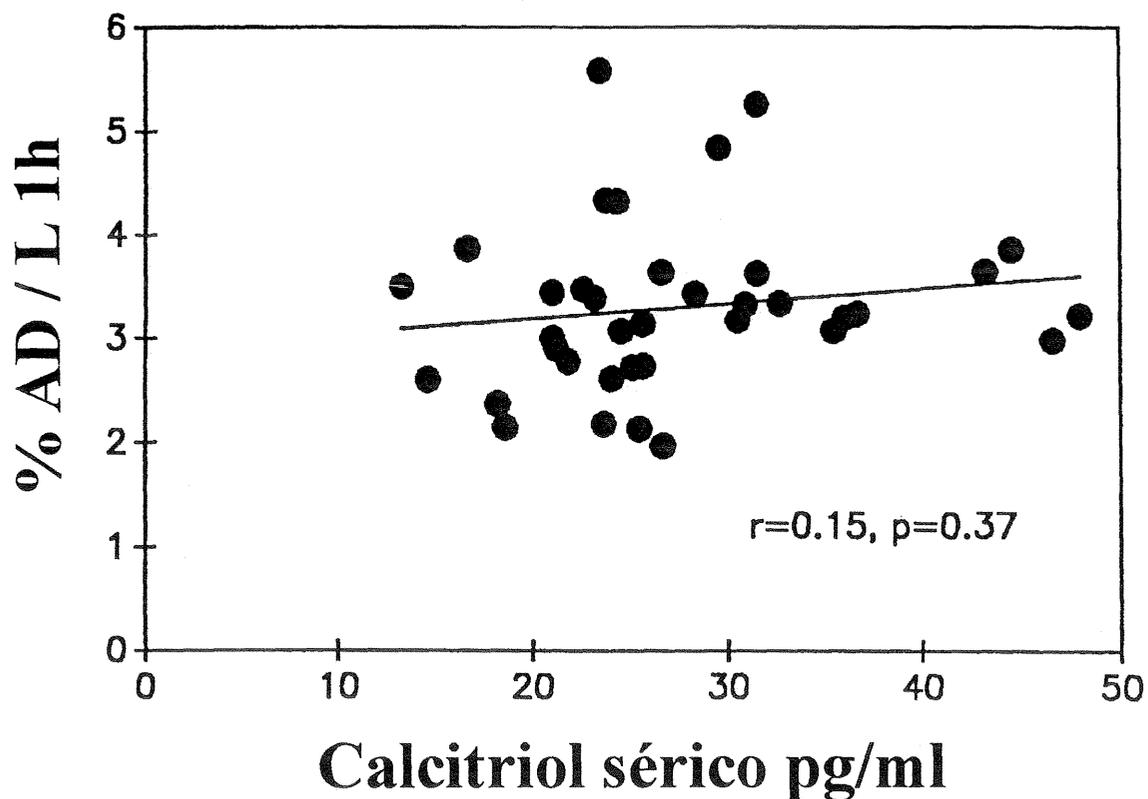


FIGURA 9. RELAÇÃO ENTRE AS MEDIDAS DA ABSORÇÃO INTESTINAL DE CA, COM CARREADOR EM DOSE BAIXA, MEDIDA EM 1 HORA E A DO CALCITRIOL SÉRICO

Verifica-se, portanto, que os testes de absorção de Ca com carreador com 250 mg de Ca são, não apenas mais reprodutíveis que o teste com carreador com 20 mg, mas também se correlacionam significativamente com os níveis de calcitriol sérico, em jejum, o que não ocorreu com o teste com carreador de 20 mg. A medida da absorção de Ca em 3 horas, no teste com carreador de 250 mg, foi um pouco mais precisa que a medida em 5 horas.

DISCUSSÃO

Os valores dos parâmetros do metabolismo do Ca encontrados neste grupo de mulheres normais, tanto PREM como MENO, estavam dentro da normalidade. Estes resultados são similares aos já relatados na literatura, tanto em estudos transversais como longitudinais ^(109, 110, 111, 112). As mulheres MENO apresentaram níveis séricos de Ca, P e Fosf. Alc. mais elevados que os das PREM. Também verificou-se um aumento da excreção urinária OHP_r/Cr, e dos níveis da Fosf.Ác.TR, nas mulheres MENO, confirmando observações anteriores ^(102, 111, 113, 114). Estas medidas e a da excreção de Ca/Cr urinários, em jejum, são consideradas expressão da maior resorção óssea que ocorre pela deficiência estrogênica da menopausa ^(52, 110). No entanto, não se observou diferença nas medidas de Ca/Cr urinários entre PREM e MENO, o que pode decorrer da pouca sensibilidade desta determinação, da interferência de múltiplos fatores nesta excreção ⁽¹¹⁵⁾ e, inclusive, do elevado peso corporal de algumas mulheres ⁽¹¹⁶⁾. Os valores de OC sérica também tenderam a ser mais altos nas mulheres MENO do que no grupo de mulheres PREM, mas a diferença não foi estatisticamente significativa no presente estudo. Os níveis séricos de OC são também considerados como indicadores da maior atividade do metabolismo ósseo, especialmente do processo de formação óssea, como a Fosf.Alc. ⁽¹¹⁵⁾. Apesar da OC tender a aumentar, tanto na menopausa

como no envelhecimento ^(104,117), muitos ensaios carecem de sensibilidade para separar as alterações peri-menopáusicas ⁽¹⁰⁹⁾, além de poderem apresentar outros problemas metodológicos, tais como, fornecer resultados discrepantes para as mesmas amostras em diferentes laboratórios ⁽¹¹⁸⁾. No presente trabalho, os níveis de calcidiol, de calcitriol, o principal hormônio controlador da absorção intestinal de Ca, e do PTH, não apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos de mulheres, e também não se observou correlação significativa destas determinações com a idade. Os resultados de calcidiol e calcitriol, encontrados nas mulheres PREM e nas MENO, estão de acordo com os observados por Hartwell et al. ⁽¹¹⁹⁾ e por Falch et al. ⁽¹²⁰⁾, sendo este último um estudo prolongado de 19 mulheres através da menopausa. Os valores do calcitriol sérico, encontrados na literatura, para mulheres pós-menopáusicas têm sido bastante variáveis. Gallagher et al. ⁽²¹⁾ mostraram uma diminuição dos níveis de calcitriol com o aumento da idade, especialmente após 65 anos. Epstein et al ⁽¹²¹⁾ encontraram uma tendência para a elevação dos níveis de calcitriol nas mulheres até os 65 anos de idade e, somente a partir daí, os níveis de calcitriol passam a decair. No presente trabalho, não se observou correlação significativa dos níveis séricos de calcitriol com a idade no grupo todo, nem nas mulheres MENO. Os estudos publicados sobre os níveis de PTH, na perimenopausa, também têm mostrado grande variabilidade. Alguns autores encontraram aumentos nas mulheres pós-menopáusicas mais idosas e nas mulheres com osteoporose ⁽⁶⁸⁾, outros observaram uma elevação atribuída ao envelhecimento ⁽⁷¹⁾ e, ainda outros, empregando ensaios especialmente sensíveis, encontraram uma diminuição dos níveis de PTH nas mulheres pós-

menopáusicas osteoporóticas em relação às pós-menopáusicas normais ^(21, 63). No presente trabalho, não se observou variação significativa dos níveis de PTH, nas PREM comparadas com as MENO nem o efeito da idade. A discrepância entre estes dados pode depender de vários fatores como, por exemplo, a idade das mulheres MENO não ser muito alta, porém, mais provavelmente, dependa das técnicas de dosagem do PTH empregadas. Epstein et al ⁽¹²¹⁾ estudaram, utilizando o mesmo radioimunoensaio empregado no presente trabalho, as alterações do PTH com a idade. Estes autores observaram um aumento dos níveis de PTH nas mulheres pós-menopáusicas somente após os 65 anos. Estes dados estão de acordo com os encontrados no presente estudo, o que também pode explicar a observada ausência de correlação dos níveis de PTH com a idade.

As mulheres MENO também diferiram significativamente das mulheres PREM, por apresentarem menores medidas da altura e dos valores da massa óssea. Estas observações também estão de acordo com o que tem sido encontrado na literatura ^(111, 112).

Portanto, considerou-se que o grupo de mulheres estudado não difere de outros anteriormente relatados, e que também não apresenta características especiais que possam afetar a interpretação dos resultados.

A medida da absorção intestinal de Ca, ALFA, foi significativamente mais baixa nas mulheres MENO do que nas PREM. Esta diferença persistiu, mesmo após a transformação logarítmica de ALFA, como sugerido por Marshall ⁽³⁹⁾. ALFA e alguns

outros parâmetros, como a razão OHP_r/Cr, apresentaram uma distribuição não normal, possivelmente por expressarem modificações decorrentes tanto da menopausa como do envelhecimento nestas mesmas variáveis. Por este motivo, foram utilizados, quando pertinente, os testes não-paramétricos para as comparações e para as correlações de ALFA. Esta abordagem estatística também tem sido adotada por outros investigadores para analisar as alterações metabólicas da perimenopausa ⁽⁷¹⁾. No presente estudo, a interpretação dos resultados não se modificaria se o mesmo fosse analisado estatisticamente de maneira mais convencional. Em geral, os valores publicados para ALFA os fornecem com média \pm DP, por exemplo, $0,74 \pm 0,24$ foi relatado por Need et al. ⁽¹²²⁾ e $0,70 \pm 0,28$ foi encontrado por Morris et al. ⁽¹²³⁾, em mulheres pós-menopáusicas, ambos estudos feitos na Austrália. O valor médio de ALFA encontrado nas mulheres MENO foi 0,75 com o desvio-padrão $\pm 0,23$, o que é muito similar aos valores indicados na literatura recente. No trabalho de Morris et al ⁽¹²³⁾, foi observado uma correlação significativa de ALFA com os níveis de calcitriol sérico o que não foi verificado nesta pesquisa. Como estes autores utilizaram o mesmo teste de absorção de Ca do presente estudo, os motivos para esta diferença não são muito aparentes. Os valores do calcitriol sérico das mulheres pós-menopáusicas, nos dois estudos, foram similares. Nas mulheres australianas foi $38,3 \pm 14,8$ pg/ml e nas MENO, do presente trabalho, foi $39,8 \pm 14,4$ pg/ml. Entre as possíveis explicações para esta discrepância podem estar, o maior número de mulheres estudadas na Austrália, n=152, a média etária mais alta 62,7 anos nas australianas, contra 58,8 anos, no presente estudo, e, no tempo pós-menopausa maior no trabalho australiano, média de 16,0 anos contra 10,6 anos das MENO. Também no trabalho australiano, assim como neste trabalho, não foi

encontrada nenhuma relação de ALFA com as medidas da massa óssea do rádio por absormetria fotônica simples. Hartwell et al. ⁽¹¹⁹⁾ estudando 123 mulheres dinamarquesas logo após a menopausa, entre 0,5 a 3 anos, também encontraram uma correlação significativa entre os níveis séricos de calcitriol e a absorção intestinal de Ca, medida por absorção fracionária, mas por uma técnica pouco diferente da empregada no presente estudo. Neste estudo dinamarquês, os níveis séricos de calcitriol foram, em média, 37,5 pg/ml e o coeficiente de correlação com a absorção de Ca foi 0,18. Na presente tese os níveis médios de calcitriol do grupo de mulheres MENO foi similar, anteriormente referido, e o coeficiente de correlação do calcitriol com ALFA nas mulheres MENO foi 0,16. Em virtude destes dados, deve-se admitir a possibilidade de que o presente estudo não apresente o poder estatístico para detectar uma correlação significativa entre estes parâmetros, pois o número de indivíduos necessários para encontrar uma correlação desta magnitude como significativa, considerando $\alpha = 0,05$ (unicaudal) e um poder de 80%, estaria entre 153 e 274, portanto mais próximo do número de mulheres estudadas nos trabalhos já mencionados.

Verificou-se, também, que ALFA se correlacionou negativa e significativamente apenas com a idade quando todo o grupo de mulheres, PREM e MENO, foi avaliado. Não se observou tal correlação quando estes grupos foram analisados separadamente. Também não se observou relação de absorção intestinal de Ca com o tempo pós-menopausa como encontraram Devine et al ⁽¹²⁴⁾, recentemente. Estes autores analisaram um número maior de mulheres pós-menopáusicas, $n = 196$, porém mediram

a absorção intestinal de Ca empregando uma técnica com estrôncio. No caso, o maior número de indivíduos estudados e as diferenças metodológicas das duas técnicas de absorção de Ca ⁽⁹¹⁾ poderiam explicar os achados divergentes. Estes autores também não encontraram relação da medida da absorção de Ca com os níveis de calcitriol, também similares aos do presente estudo, nem com a medida da massa óssea na coluna vertebral medida por absormetria com raio-X duoenergético.

Como ALFA foi diferente nos dois grupos de mulheres, PREM e MENO, e correlacionou-se significativamente com a idade, procedeu-se a análise de regressão múltipla passo-a-passo após a transformação logarítmica de ALFA. Constatou-se que, as variáveis idade e menopausa, isoladamente, se relacionaram com a medida da absorção intestinal de Ca. Controlando para a menopausa, a influência da idade em ALFA (ou logALFA) desaparece, mas também a relação significativa da menopausa com logALPHA. Exposto de outra forma, a redução significativa da absorção intestinal de Ca das mulheres MENO também é modificada, mesmo que pouco, e não pode ser separada completamente dos efeitos do envelhecimento. Selby et al ⁽⁶¹⁾ haviam sugerido que os efeitos do envelhecimento na absorção intestinal de Ca poderiam ser mais importantes que os da deficiência gonadal da menopausa, pois a administração de etinil-estradiol não modificou significativamente os níveis de calcitriol livre, nem da absorção intestinal de Ca nas mulheres por eles estudadas.

ALFA, ou a fração do Ca administrado, medida em 1 hora, com concentração do carreador em dose baixa, é considerada uma medida da absorção intestinal relacionada ao mecanismo ativo, saturado, dependente de vitamina D ⁽³⁹⁾. Vários

estudos prévios já haviam demonstrado uma boa correlação deste teste com a absorção efetiva de Ca, medida por técnicas de balanço metabólico, $r = 0,76$ ou por análise cinética de Ca, $r = 0,85$ a $0,96$ ^(85, 93) e, também, com níveis de calcitriol de pacientes com alterações na absorção de Ca ⁽⁹²⁾. Também, em outros trabalhos, com variantes desta técnica de medida de absorção de Ca, foi possível se identificar modificações da absorção de Ca por doenças ^(69, 80, 125), pela administração de Ca, calcidiol ou calcitriol, em humanos e em ratos ^(69, 90, 122, 126) e mesmo medir o efeito da ação de diferentes carboidratos ⁽⁹³⁾. Portanto, a validade deste teste de absorção intestinal havia sido bem avaliada. Por outro lado, alguns estudos não têm demonstrado alterações significantes na absorção intestinal de Ca, medida como ALFA, quando da administração de etinil-estradiol ou noretindrona, por 3 a 6 meses, a mulheres pós-menopáusicas ⁽⁶¹⁾, ou a pacientes com hiperparatireoidismo ⁽¹²⁷⁾. O efeito da administração de EE na absorção intestinal de Ca foi verificado por Heaney et al, já em 1978 ⁽²²⁾, utilizando uma modificação da técnica do balanço metabólico ou administrando dois isótopos de Ca, com o carreador em concentrações entre 150 e 300 mg de Ca, em mulheres sadias, equilibradas na dieta usual. Estes autores demonstraram que a administração de etinil-estradiol corrigia o balanço negativo das mulheres pós-menopáusicas, aumentando a absorção intestinal e diminuindo a perda renal de Ca. Caniggia et al., em 1970 ⁽¹²⁸⁾ e Gallagher et al., em 1980 ⁽²³⁾ e, também, outros investigadores demonstraram que em mulheres normais, após a menopausa natural, após ooforectomia ⁽⁵⁹⁾ e, mesmo em mulheres osteoporóticas ^(23, 60), a administração de estrógenos conjugados, de 0,625 a 1,25 mg por dia, por 6 a 12 meses,

aumenta a absorção intestinal de Ca. Gallagher et al ⁽²³⁾, para medir a absorção intestinal de Ca, empregaram o carreador Ca na dose de 100 mg e utilizaram uma técnica com dois radioisótopos. Nos demais trabalhos referidos, as medidas da absorção intestinal de Ca foi feita por absorção fracionária com um radioisótopo, ⁴⁵Ca ou ⁴⁷Ca, e com as doses do carreador entre 70 e 88 mg de Ca. Genari et al ⁽⁵⁹⁾ verificaram que a administração de estrógenos conjugados, por 6 meses, melhorou a resposta da absorção intestinal de Ca a uma dose de calcitriol. Estes autores sugeriram a existência de um sinergismo entre estrógenos e calcitriol para explicar a melhora da absorção intestinal de Ca. Recentemente, Arjmandi et al. ^(57,58) demonstraram a presença de receptores estrogênicos específicos no intestino de ratos que respondem à administração de estradiol, aumentando a absorção intestinal de Ca de forma dose-dependente, mas independentemente de um aumento dos níveis séricos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, de PTH ou de IGF-I. Estes autores sugeriram que os EE têm um efeito fisiológico regulador da absorção intestinal de Ca, pelo menos nestes roedores.

Apesar de não se ter podido demonstrar indubitavelmente o efeito da deficiência estrogênica na diminuição da absorção intestinal de Ca, medida como ALFA, na presente tese, as evidências da literatura sugerem que exista uma ação dos estrógenos na absorção intestinal de Ca nas mulheres. Os possíveis mecanismos de ação dos estrógenos na absorção de Ca se dariam através de efeito direto nos seus próprios receptores nos enterócitos ^(57,58), ou por um efeito regulador, direto ou indireto, da função dos receptores intestinais de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ^(55, 56), ou ainda regulando a produção enzimática renal de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ⁽⁵⁴⁾. Entretanto, os dados do presente

trabalho não podem refutar completamente os de Selby et al. ⁽⁶¹⁾ que não encontraram variação de ALFA com administração de etinil-estradiol em mulheres pós-menopáusicas. Também não se constatou diferença significativa nos valores de ALFA, quando se comparou 15 mulheres pós-menopáusicas usuárias de estrógenos, mediana = 0,79 variação de 0,56 a 2,15, com outras 15 mulheres pós-menopáusicas sem reposição hormonal, emparelhadas para idade e para tempo de menopausa, mediana = 0,75 variação de 0,39 a 1,26 (dados individuais não apresentados). Estas informações, juntamente com os dados da comparação entre os testes de AbsCa, sugerem que ALFA, como medida da absorção intestinal de Ca, não tem sensibilidade suficiente para identificar o efeito da deficiência estrogênica da menopausa natural, ou da administração de EE, na absorção intestinal de Ca. Vários motivos podem ter contribuído para tal resultado. O primeiro, e talvez o mais importante, seria de ordem técnica, evidenciado pela comparação das duas técnicas simplificadas de absorção de Ca e de suas diferentes formas de medidas. Comparando o teste de absorção com carreador em dose baixa, medido como %AD/L ou ALFA, com o outro que utiliza carreador em dose mais alta, o teste com carreador em dose baixa demonstrou uma maior variação quando repetido nas mesmas mulheres sendo, portanto, menos preciso. Também não se encontrou uma correlação significativa de %AD/L, ou ALFA, com os níveis séricos de calcitriol quando medidos nestas mesmas mulheres, na dieta habitual. Nestes dois aspectos, precisão e correlação com os níveis de calcitriol sérico, o teste proposto por Heaney e Recker ⁽⁸⁶⁾ mostrou-se superior. Estes autores propuseram o teste simplificado para a medida da absorção intestinal de Ca que se correlacionava fortemente com a medida da absorção “verdadeira” de Ca. A absorção “verdadeira” de

Ca representa a correção da absorção efetiva de Ca para o Ca fecal endógeno. No presente trabalho, o teste com carreador em dose alta foi mais reprodutível que o com carreador em dose baixa e se correlacionou significativamente com os níveis séricos de calcitriol, tanto medido em 3 horas, como em 5 horas, após a administração da dose de ^{45}Ca . A determinação da absorção em 3 horas foi um pouco mais precisa e se relacionou, similarmente à medida em 5 horas, com os níveis séricos de calcitriol, $r = 0,49$. Os valores encontrados para Abs.Frac., nestas medidas, em 3 e 5 horas, foram semelhantes aos anteriormente relatados por Heaney et al ⁽¹²⁹⁾ e também apresentaram coeficientes de variação similares aos obtidos pela técnica de balanço metabólico. Os valores de Abs.Frac., do presente trabalho, foram mais baixos que os encontrados em mulheres pré-menopáusicas estudadas pelo mesmo grupo de investigadores ⁽¹³⁰⁾. Porém, no grupo de mulheres estudadas, nesta parte da tese, apenas 3 eram pré-menopáusicas, sendo que duas destas já apresentavam irregularidades menstruais. A diferença dos valores da Abs.Frac. das mulheres pré-menopáusicas estudadas pelo grupo de Omaha ⁽¹³⁰⁾ para os desta tese pode ser outra evidência do efeito da menopausa, e da deficiência dos esteróides gonadais, na redução da absorção intestinal de Ca. As medidas da absorção intestinal de Ca em 3 horas, como Abs.Frac., pelo algoritmo gentilmente fornecido pelo Dr. Robert Heaney, foram as que apresentaram o menor coeficiente de variação, melhorando, inclusive, a precisão em relação às medidas da absorção como %AD/L. Convém, aqui, ressaltar que, quando se comparou a absorção de Ca medida como %AD/L 1h com a medida como %AD/L 3h, repetidas nos mesmos indivíduos, observou-se uma boa correlação, $r = 0,63$, entre estas duas medidas, mas esta discordância também pode contribuir para explicar a imprecisão

verificada no estudo. Outro fator de imprecisão da medida de absorção com dose do carreador de 20 mg, mas também observado na comparações das duas técnicas, pode decorrer das correções feitas para estimar a distribuição do Ca radioativo no espaço extracelular a partir do peso. As mulheres PREM e MENO apresentaram uma grande variação no peso, sendo muitas delas obesas. Nas mulheres avaliadas para a reprodutibilidade dos testes de AbsCa, estes pioram quando foram expressos como ALFA, ou como Abs.Frac.5h, em vez de %AD/L, de onde derivam. No caso de ALFA, a fórmula usada para corrigir para a distribuição extracelular, ou seja, 15 % do peso corporal, pode ser inadequada para as mulheres muito obesas ⁽¹⁰⁸⁾. Entretanto, neste aspecto, excluindo os indivíduos com índice de massa corporal maior que 30 kg/m² da análise, não alterou fundamentalmente as comparações nem as correlações observadas para todas as mulheres (dados não apresentados). Outros possíveis motivos para confundir o efeito da menopausa na absorção intestinal de Ca, medida como ALFA, podem resultar da variabilidade da absorção intestinal de Ca ⁽¹³¹⁾, ou das do calcitriol, pelas variações sazonais ⁽¹¹⁹⁾ que não foram controladas neste estudo transversal. Também pode haver diminuição da motilidade gástrica, que é mais importante nos indivíduos idosos ⁽⁵³⁾, variabilidade na velocidade do trânsito intestinal e mesmo alterações intestinais subclínicas que não podem ser completamente descartadas ⁽¹³⁰⁾. Finalmente, é possível que a deficiência estrogênica da menopausa não modifique a absorção intestinal de Ca em mulheres normais, mas que, na realidade, ocorra uma resistência à ação do calcitriol na absorção de Ca, decorrente do envelhecimento, o que não pode ser completamente separado do estado de menopausa nas mulheres, como foi

recentemente sugerido pelo trabalhos de Eastell et al ⁽²⁵⁾ e Ebeling et al. ⁽⁷¹⁾. Eastell et al ⁽²⁵⁾ mediram a absorção de Ca, utilizando isótopos estáveis de Ca administrado à dieta usual das 51 mulheres normais, sendo 32 pós-menopáusicas. Ebeling et al. ⁽⁷¹⁾ mediram a absorção fracionária com carreador de Ca na dose de 20 mg, em 44 mulheres saudáveis, sendo 24 pós-menopáusicas. Estes autores não encontraram redução da absorção de Ca com a idade, mas um aumento na concentração de calcitriol e uma redução da concentração dos receptores intestinais de vitamina D. Entretanto, mais recentemente, Kinyamu et al ⁽⁷⁶⁾, empregando o mesmo teste de absorção de Ca com careador de 20mg , utilizado nesta pesquisa, e outro com carreador de Ca na dose de 100 mg, em 77 mulheres jovens e em 44 idosas, encontraram uma redução da absorção de Ca com a idade e também uma correlação significativa entre a absorção intestinal e os níveis séricos de calcitriol. Estes autores não encontraram uma redução na concentração de receptores intestinais da vitamina D, não encontraram qualquer relação entre os tipos dos alelos do receptor da vitamina D com a absorção de Ca, nem destes mesmos alelos com os níveis de calcitriol ou ainda, com a concentração intestinal dos receptores da vitamina D. Um outro aspecto interessante é que os valores da absorção intestinal de Ca, com carreador em dose baixa, no trabalho de Kinyamu et al ⁽⁷⁶⁾, foram similares aos encontrados no presente estudo. A correlação negativa e significativa de ALFA com a idade também já havia sido encontrada por outros investigadores, utilizando medidas da absorção fracionária Ca com carredor na dose de 20 mg ^(19, 20), 100 mg ⁽²¹⁾, utilizando as técnicas de perfusão intestinal ⁽¹⁷⁾ e mesmo as técnicas de balanço metabólico, com ou sem rádio traçador ⁽¹⁸⁾. Como nos trabalhos de

Eastell et al.⁽²⁵⁾ e de Ebeling et al.⁽⁷¹⁾ não foi encontrado o efeito da redução da absorção intestinal de Ca pela idade, pode ser argumentado que o trabalho de Ebeling et al. sofre da imprecisão do teste utilizado, mas tal argumento não se aplica ao trabalho de Eastell et al. que empregou um teste com dois isotópos estáveis associado a um balanço metabólico limitado, o que é considerado por alguns investigadores como o padrão-ouro para medir a absorção intestinal de Ca⁽³⁷⁾. O mais provável é que ambos os estudos apresentem um erro tipo beta, devido ao número reduzido de mulheres estudadas.

No que diz respeito à falta de relação da absorção intestinal de Ca com a massa óssea, neste trabalho e também observado em outros estudos^(123, 124), poder-se-ia argumentar que isto deveu-se ao fato da aferição da massa óssea ter sido limitada a uma região do esqueleto e, portanto, não refletir o conteúdo mineral total esquelético. Tal argumento não parece ser pertinente, pois já foram demonstradas boas correlações entre o conteúdo mineral ósseo (CMO) do rádio medido por densitometria fotônica, ou por radiogamametria, e o Ca corporal total (CaCT) medido por ativação neutrônica, tanto em indivíduos normais^(9, 132, 133) quanto em osteoporóticos⁽¹³⁴⁾. Também o conteúdo mineral ósseo corporal total (CMOCT), medido por absorção fotônica dupla, correlaciona-se bem com densitometria óssea radial⁽¹³⁵⁾. Sabe-se, ainda, que existe uma excelente correlação entre CMO do rádio e a quantidade mineral da crista ilíaca, em indivíduos normais e em osteoporóticos,⁽¹⁰⁾ e que a massa óssea da região do rádio demonstra as alterações da idade e da menopausa, tão bem quanto as medidas em outras regiões esqueléticas⁽¹³⁵⁾. Alguns autores sugerem que a medida desta região

seja melhor, pois é mais precisa, que a de outras regiões, como da coluna lombar, ou do fêmur ^(136, 137). Outros investigadores discordam neste ponto de vista ^(138, 139). No presente estudo, as mulheres analisadas apresentaram as modificações características da menopausa, tanto na massa óssea, quando nos marcadores da atividade do metabolismo ósseo ^(109, 110, 111, 112), mas estas alterações ósseas não apresentaram nenhuma correlação com absorção intestinal de Ca. Estes dados corroboram as evidências de que a perda de massa óssea da deficiência estrogênica se dê, principalmente, por um efeito direto no tecido ósseo ou, ainda, por intermédio de fatores locais moduladores do remodelamento ósseo ⁽⁵²⁾ mas, por outro lado, também questionam fortemente a sugestão de que a diminuição da absorção intestinal da menopausa seja secundária ao aumento do catabolismo ósseo.

Sabe-se que muitos fatores contribuem para a variabilidade da massa óssea ⁽¹⁴⁰⁾, mas a hereditariedade seria um dos principais, senão o principal componente, chegando a contribuir com 70 a 80% da variância da massa óssea de adultos. Apesar deste componente poder diminuir com a idade e o componente ambiental aumentar de sua importância ⁽¹⁴¹⁾, estudos preliminares, avaliando gêmeos mono e dizigóticos, também sugerem que outros parâmetros do metabolismo do Ca, como a absorção intestinal de Ca, os hormônios controladores e os marcadores da formação óssea podem influir na massa óssea através da herança ⁽⁹⁵⁾. Porém, mesmo que a importância de outros componentes que influenciam na massa óssea seja pequena, estes podem adquirir um papel predominante quando, por exemplo, ocorrer o surgimento de doenças ou o uso de medicamentos que alterem a integridade óssea. Tudo isto sugere a

existência de mecanismos multifatoriais para explicar a perda de massa óssea e as osteoporoses, ditas involucionais, pela menopausa ou pelo envelhecimento. Na maioria dos trabalhos em que a absorção intestinal de Ca foi estudada, em pacientes com osteoporose, esta encontrou-se diminuída ^(21, 60, 79, 80, 123). Cannigia et al, em 1963 ⁽⁷⁹⁾, foram os primeiros a demonstrar em pacientes osteoporóticas uma redução da absorção intestinal de Ca, empregando ⁴⁵Ca. Mas foi Gallagher et al, em 1978 ⁽²¹⁾, que comprovaram que a redução na absorção de Ca das mulheres osteoporóticas persistia mesmo comparando com controles normais pós-menopáusicas emparelhadas para idade. Uma redução da absorção intestinal de Ca parece ser freqüente, mas não uniformemente encontrada em pacientes com osteoporose ⁽¹⁴²⁾ e pode ter resposta variável aos tratamentos. Em alguns pacientes a diminuição da absorção de Ca não responde à administração de Ca ⁽¹²²⁾ ou mesmo de 25-hidroxivitamina D ⁽⁶⁹⁾. Civitelli et al ⁽⁶⁰⁾ mostraram que a absorção intestinal de Ca de mulheres osteoporóticas também melhora com a administração de estrógenos conjugados ⁽⁶⁰⁾. Morris et al. ⁽¹²³⁾ confirmaram que o teste da absorção de Ca, ALFA, é capaz de discriminar mulheres pós-menopáusicas normais das osteoporóticas, e nestas encontraram correlações significantes com os níveis de calcitriol, albumina, fosfatase alcalina, e com a excreção de hidroxiprolina, que são importantes indicadores do metabolismo ósseo. Mais recentemente, entretanto, Tellez et al. ⁽¹⁴³⁾ estudando, em 41 mulheres com osteoporose, as relações da absorção intestinal de Ca, medida por balanço metabólico e pela técnica de absorção de Ca com dois isótopos e a velocidade de perda óssea no rádio medida por tomografia computadorizada e por índices de remodelamento ósseo,

não encontraram relação significativa entre estas variáveis, colocando em dúvida, mais uma vez, o papel patogênico ou fisiopatológico da redução da absorção intestinal de Ca nas osteoporoses involucionais.

Portanto, a importância da medida da absorção intestinal de Ca na variabilidade da massa óssea, que parece ser normalmente pequena, só será esclarecida quando algum teste desta função for aplicado de maneira sistemática a um número grande de indivíduos controlando para possíveis fatores de confusão. Tal empreendimento somente será possível com o emprego de teste de absorção de Ca simples, preciso e que expresse uma relação com seus mecanismos controladores. Nesta tese, o teste ALFA, Abs.Frac.1h, com carreador de 20 mg, mesmo carecendo de precisão, foi capaz de evidenciar os possíveis efeitos da deficiência estrogênica pós-menopáusia na absorção intestinal de Ca. Entretanto, o teste da Abs.Frac, após 3 ou 5 horas da ingestão de alimentos com cerca de 250 mg de Ca, parece possuir todas as características para ser o teste de eleição para esclarecer o papel da absorção intestinal de Ca na integridade da massa óssea.

CONCLUSÕES

1. As mulheres pós-menopáusicas apresentaram uma redução da absorção intestinal de Ca medida pelo teste ALFA, com o carreador de 20mg, em relação às mulheres pré-menopáusicas.
2. A diminuição da absorção intestinal de Ca pela menopausa não pode ser completamente separada da possível influência da idade, uma vez que estas variáveis estavam fortemente interligadas nas mulheres estudadas.
3. Não houve relação significativa da medida da absorção intestinal de Ca, ALFA, com as medidas da massa óssea no antebraço nem com a dos marcadores do metabolismo ósseo, sugerindo que normalmente o efeito da deficiência estrogênica da menopausa na absorção intestinal de Ca seja pequeno para explicar a perda de massa óssea desta condição.
4. As medidas da absorção intestinal de Ca, com carreador de 250 mg, foram mais reprodutíveis que o teste com carreador de 20 mg, e se associaram significativamente com os níveis séricos em jejum de calcitriol, o que não

ocorreu com o teste de 20 mg.

5. Os dois testes de absorção de Ca avaliados foram simples e práticos para uso na rotina clínica e estavam significativamente associados entre si.
6. Os níveis séricos de calcitriol, medidos após um jejum noturno, no intervalo de uma semana, em mulheres saudáveis, na dieta habitual, estavam significativamente relacionados.
7. A precisão do teste de absorção com carreador na dose maior, 250 mg, bem como sua boa correlação com níveis séricos de calcitriol, sugerem que este teste seja empregado preferencialmente, sendo que a medida em 3 h foi um pouco mais precisa e parece mais prática para uso ambulatorial.

BIBLIOGRAFIA

1. WHO Technical Report Series 843. Assessment of fracture risk and its application to screening for Postmenopausal Osteoporosis. World Health Organization, Geneva, 1994.
2. Riggs BL, Melton LJ III. Evidence for two distinct syndromes of involutional osteoporosis. *Am J Med* 75: 899-901, 1983.
3. Avioli, LV. Calcium and Phosphorous. In: *Modern Nutrition in Health and Disease*. Seventh edition. Maurice E. Shils and Vernon R. Young Editors, Lea & Febiger, Philadelphia, Chapter 5, 1988, pp. 142-158.
4. Bronner, F. Calcium Absorption. In: *Physiology of the gastrointestinal tract*. 2nd Edition, Leonard R. Johnson. Raven Press, New York, Chapter 50, 1987, pp. 1419-1435.
5. Broadus, AE. Physiological functions of Calcium, Magnesium, and Phosphorus and Mineral Ion Balance. In: Favus, Murray J. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Second edition. Raven Press, New York , Chapter 7, 1993, pp. 41-46.

6. Bringhurst FR. Calcium and Phosphate Distribution, Turnover, and Metabolic Actions. In: Lesley J. DeGroot editor, *Endocrinology* Third edition, W.B. Saunders Co., Philadelphia, Chapter 60, 1995, pp. 1015-1042.
7. Baron R. Anatomy and Ultrastructure of Bone. In: Favus, Murray J. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Second edition. Raven Press, New York, Chapter 1, 1993, pp. 3-9.
8. Norman AW. Intestinal Calcium Absorption: a Vitamin D hormone-mediated Adaptive response. *Am. J. Clin. Nutr.* 51: 290-300, 1990.
9. Cohn SH, Aloia JF, Vaswani AN, Zanzi I, Varstki D, Ellis KJ. Age and sex-related changes in bone mass measured by neutron activation. In: Menczel J, Robin CG, Makin, M., Steinberg, R. eds. *Osteoporosis*. John Wiley , Chichester, 1982, pp.33-43.
10. Manicourt DH, Orloff S, Brauman J, Schoutens A. Bone mineral content of the radius: good correlations with physicochemical determinations in iliac crest trabecular bone of normal and osteoporotic subjects. *Metabolism* 30: 57-62, 1981.
11. Johnston Jr., CC, Melton III, LJ. Bone Density Measurement and the Management of Osteoporosis. In Favus, Murray J. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Second edition. Raven Press, New York, Chapter 26, 1993, pp. 137-146.

12. Khosla S, Riggs BL, Melton LJ III. Clinical spectrum. In: Osteoporosis: etiology, diagnosis, and management. 2nd. Edition. Riggs BL, Melton LJ III Editors. Chapter 9, 1995, pp. 205-223.
13. Neer RM. Osteoporosis in Endocrinology. In: Lesley J. DeGroot editor, Endocrinology Third edition, W.B. Saunders Co., Philadelphia, Chapter 73, 1995, pp. 1223-1258.
14. Moro M, Hecker AT, Bouxsein ML, Myers ER. Failure load of thoracic vertebrae correlates with lumbar bone mineral density measured by DXA. *Calcif. Tissue Int* 56: 206-209, 1995.
15. Goldring SR, Krane SM, Avioli LV. Disorders of Calcification: Osteomalacia and Rickets. In: DeGroot LJ, ed. Endocrinology, 3rd. Edition. W.B. Saunders Co. Philadelphia, Chapter 72, 1995, pp. 1204-1227.
16. Allen LH. Calcium bioavailability and absorption: a review. *Am J. Clin. Nutr.* 35: 783-808, 1982.
17. Ireland P, Fordtran JS. Effect of dietary calcium and age on jejunal calcium absorption in humans studied by intestinal perfusion. *J. Clin. Invest.* 52: 2672-2681, 1973.
18. Heaney RP, Recker RR, Stegman MR, Moy AJ. Calcium absorption in women: relationship to calcium intake, estrogen status, and age. *J. Bone Mineral Res.* 4: 469-475, 1989.

19. Avioli LV, McDonald JE, Lee SW. The influence of age on the intestinal absorption of ^{47}Ca in women and its relation to ^{47}Ca absorption in postmenopausal osteoporosis. *J Clin. Invest.* 44: 1960-1967, 1965.
20. Bullamore JR, Gallagher JC, Wilkinson R, Nordin BEC. Effect of age on calcium absorption. *Lancet II*: 535-537, 1970.
21. Gallagher JC, Riggs BL, Eisman J, Hamstra A, Arnaud SB, DeLuca HF. Intestinal calcium Absorption and serum Vitamin D Metabolites in normal and Osteoporotics patients. Effect of age and dietary calcium. *J.Clin.Invest.* 64: 729-736, 1979.
22. Heaney RP, Recker RR, Saville PD. Menopausal changes in calcium balance performance *J.Lab.Clin. Med.* 92: 953-963, 1978.
23. Gallagher JC, Riggs BL, DeLuca HF. Effects of estrogen on calcium absorption and serum vitamin D metabolites in postmenopausal osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51: 1359-1364, 1980.
24. Aloia JF, Vaswani AN, Yeh JK, Ross P, Ellis K, Cohn SH.. Determinants of bone mass in postmenopausal osteoporosis. *Arch Intern Med* 143: 1700-1704, 1983.
25. Eastell R, Yergey AI, Vieira NE, et al. Interrelationship among vitamin D metabolism, true calcium absorption, parathyroid function, and age in women: evidence of an age-related intestinal resistance to 1,25-dihydroxyvitamin D action. *J.Bone Miner. Res.* 6: 125-132, 1991.

26. Wilkinson R. Absorption of Calcium, Phosphorus and Magnesium. In: Nordin BEC. Editor. Calcium, Phosphate and Magnesium Metabolism. Clinical Physiology and Diagnostic Procedures. Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York, Chapter 2, 1976, pp. 36-112.
27. Sheikh MS, Schiller LR, Fordtran JS. In vivo Intestinal Absorption Calcium in Humans. *Miner.Electrolyte Metab.* 16: 130-146, 1990.
28. Heaney RP Saville PD, Recker RR.. Calcium absorption as a function of calcium intake. *J.Lab.Clin.Med.* 85: 881-890, 1975.
29. Nordin BEC. Nutritional considerations. In: Nordin BEC. Editor. Calcium, Phosphate and Magnesium Metabolism. Clinical Physiology and Diagnostic Procedures. Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York, Chapter 1, 1976, pp. 1-35.
30. Heaney RP, Gallagher JC, Johnston Jr CC, Neer R, Parfitt AM, Whedon GD. Calcium nutrition and bone health in the elderly. *Am J Clin Nutr* 36: 986-1013.
31. Kanis JA. Calcium nutrition and its implications for osteoporosis. Part I.Children and healthy adults. *Eur J Clin Nutr* 48: 757-767, 1994.
32. Kanis JA. Calcium nutrition and its implications for osteoporosis. Part II. After the menopause. *Eur J Clin Nutr* 48: 833 -841, 1994.
33. Kanis JA, Passmore R. Calcium supplementation of the diet - I and II. *Brit Med J* 298: 137-140, 205-208, 1989.

34. Lemann Jr. J. Intestinal Absorption of Calcium, Magnesium, and Phosphorus.. In: Favus Murray J. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. Second edition. Raven Press, New York , Chapter 8, 1993, pp. 46-50.
35. Favus MJ. Factors that influence Absorption and Secretion of Calcium in the Small Intestine and Colon. *Am J Physiol* 11: G147-G157, 1985.
36. Wasserman RH, Chandler JS. Molecular mechanism of Intestinal Calcium Absorption. In: Bone and Mineral Research/3. William A. Peck, editor. Elsevier Science Publishers B.V. Chapter 6. 1985, pp. 181-209.
37. Charles P. Calcium Absorption and calcium bioavailability. *J Int Med* 231: 161-168, 1992.
38. Birge SJ, Peck WA, Berman, M., Whedon, G.D.: Study of calcium Absorption in man: A kinetic analysis and physiologic model. *J Clin Invest* 48: 1703-1713, 1969.
39. Marshall DH. Calcium and Phosphate Kinetics. In: Nordin BEC. Editor. Calcium, Phosphate and Magnesium Metabolism. Clinical Physiology and Diagnostic Procedures. Churchill Livingstone, Edinburgh, London and New York, Chapter 8, 1976, pp. 257-297.
40. Fordtran JS and Locklear TW. Ionic constituents and osmolality of gastric and small-intestinal fluids after eating . *Am J Digest Dis* 11:503-521, 1966.

41. Bronner F. Vitamin-D dependent active calcium transport: The role of CaBP - editorial. *Calcif Tissue Int* 43: 133-137, 1988.
42. Bronner F. Current concepts of calcium absorption: An overview. *J Nutr* 122: 641-643, 1992.
43. Fullmer CS. Intestinal Calcium Absorption: Calcium Entry. *J Nutr* 122: 644-650, 1992.
44. Pak CYC, Avioli LV. 1988. Factors affecting Absorbability of Calcium from calcium salts and foods - Editorial. *Calcif. Tissue Int.* 43: 43-66, 1988.
45. Recker RR. Calcium Absorption and achlorhydria. *New Eng J Med* 313: 70-73, 1985.
46. Wills MR. Intestinal Absorption of calcium. *Lancet* 1: 1029-1031, 1973.
47. Cochet B, Jung A, Griessen at al. Effects of lactose on intestinal calcium absorption in normals and lactase-deficient subjects. *Gastroenterology* 84: 935-940, 1983.
48. DeLuca HF, Krisinger J, Darwish H. The vitamin D system: 1990. *Kidney International* 38, suppl.29: s2-s8, 1990.
49. Pansu D, Bellaton C, Roche C, Bronner F. Duodenal and ileal calcium absorption in the rat and effects od vitamin D. *Am J Physiol* 244: G695-G700, 1983.
50. Karbach U. Paracellular calcium transport across the small intestine. *J Nutr* 122:

- 672-677, 1992.
51. Zhou L, Nemere I, Norman AW. 1,25-dihydroxyvitamin D analog structure-function assessment of the rapid stimulation of intestinal calcium absorption (transcaltachia). *J Bone Miner Res* 7:457-463, 1992.
 52. Lindsay R. Estrogen Deficiency. In: Riggs BL and Melton III LJ editors. *Osteoporosis: Etiology, Diagnosis and Management*. 2nd edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Chapter 6, 1995, pp. 133-160.
 53. Blumsohn A, Eastell R. Age-Related Factors. In: Riggs BL and Melton III LJ editors. *Osteoporosis: Etiology, Diagnosis and Management*. 2nd edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Chapter 7, 1995, pp. 161-182.
 54. Castillo L, Tanaka Y, DeLuca HF, Sunde ML. The stimulation of 25-hydroxyvitamin D₃-1-hydroxylase by estrogen. *Arch Biochem Biophys* 179: 211-217, 1977.
 55. Pike PW, Spanos E, Colston KW, MacIntyre I, Haussler MR. Influence of estrogen on renal vitamin D hydroxylases and serum 1,25(OH)₂D₃ in chicks. *Am J Physiol*.235: E338-343, 1978.
 56. Chan SDH, Chiu DKH, Atkins D. Oophorectomy leads to a relative decrease in 1,25-dihydroxy-cholecalciferol receptors in rat jejunal villous cells. *Clin Sci* 66: 745-748, 1984.
 57. Arjmandi BH, Salih MA, Herbert DC, Sims SH, Kalu DK. Evidence for estrogen-

- linked calcium transport in the intestine. *Bone Mineral* 21: 63-74, 1993.
58. Arjmandi BH, Hollis BW, Kalu DK. In vivo effect of 17 beta-Estradiol on intestinal calcium absorption in rats. *Bone Mineral* 26: 181-189, 1994.
59. Gennari C, Agnusdei D, Nardi P, Civitelli R. Estrogen preserves a normal intestinal responsiveness to 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in Oophorectomized women. *J.Clin. Endocrinol.Metab* 71: 1288-1293, 1990.
60. Civitelli R, Agnusdei D, Nardi P, Zacchei F, Avioli LV, Gennari C. Effects of one-year treatment with estrogens on bone mass, intestinal calcium absorption, and 25-hydroxyvitamin D 1-alpha-hydroxylase reserve in postmenopausal osteoporosis. *Calcif. Tissue Int.* 42: 77-86, 1988.
61. Selby PL, Peacock M, Barkworth SN, Brown WB, Taylor GA. Early effects of ethinyloestradiol and norethisterone treatment in menopausal women on bone resorption and calcium regulating hormones. *Clin. Sci.* 69: 265-269, 1985.
62. Heaney RP. A unified theory of osteoporosis. *Am J Med* 39: 877, 1965.
63. Kotowicz MA, Klee GG, Kao PC et al. Relationship between serum intact parathyroid hormone concentrations and bone remodeling in type I osteoporosis: evidence that skeletal sensitivity is increased. *Osteoporosis Int* 1: 14-22, 1990.
64. Komm BS, Terpening CM, Benz DJ. Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science* 241: 81-84,

1988..

65. Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 241: 84-86, 1988.
66. Sepcker BL, Vieira NE, O'Brien KO, Ho MI, Abrams SA, Yergey AI. Calcium kinetics in lactating women with low and high calcium intakes. *Am J. Clin Nutr.* 59: 593-599, 1994.
67. Slovik DM, Adams JS, Neer RM, Holick MF. Deficient production of 1,25-dihydroxy vitamin D in elderly osteoporotic patients. *N Eng J Med* 305: 372-374, 1981.
68. Tsai KS, Heath H, Kumar R, Riggs BL. Impaired vitamin D metabolism with aging in women. Possible role in pathogenesis of senile osteoporosis. *J Clin Invest* 73: 1668-1672, 1984.
69. Need AG, Horowitz M, Philcox JC, Nordin BEC. 1,25 dihydroxyvitamin D and calcium therapy in osteoporosis with calcium malabsorption: dose response relationship of calcium absorption and indices of bone turnover. *Mineral Electrolyte Metab.* 11: 34-40, 1984.
70. Francis RM, Peacock M, Taylor GA, Storer JH, Nordin BEC. Calcium malabsorption in elderly women with vertebral fractures: evidence for resistance to the action of vitamin D metabolites on the bowel. *Clin Sci* 66: 103-107, 1984.

71. Ebeling PR, Sandgren ME, DiMagno EP, Lane AW, DeLuca HF, Riggs BL. Evidence of an age-related decrease in intestinal responsiveness to vitamin D: relationship between serum 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and intestinal vitamin D receptor concentrations in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 75: 176-182, 1992.
72. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature (London)* 367: 284-287, 1994.
73. Eisman JA. Editorial - Vitamin D receptor gene alleles and osteoporosis: an affirmative view. *J Bone Mineral Res* 10: 1289-1293, 1995.
74. Peacock M. Editorial - Vitamin D receptor gene alleles and osteoporosis: a contrasting view. *J Bone Mineral Res* 10 : 1294-1297, 1995.
75. Dawson-Hughes B, Harris SS, Finneran S. Calcium absorption on high and low calcium intakes in relation to vitamin D receptor alleles. Poster in the 17th Annual Meeting of American Society of Bone and Mineral Research, September 9-13, 1995.
76. Kinyamu H, Gallagher JC, DeLuca HF, Lanspa S, Knezetc J, Agarwal R. Relationship between intestinal vitamin D receptor, VDR genotypes, calcium absorption, and serum 1,25(OH)₂D₃ in normal women. Poster in the 17th Annual Meeting of American Society of Bone and Mineral Research,

September 9-13, 1995.

77. Favus MJ. Intestinal Calcium Absorption: Have we absorbed enough from research to have a test for the Patient? Editorial. *J. Bone Min Res* 4: 461-462, 1989.
78. Bhandakkar SD, Bluhn MM, MacGregor J, Nordin BEC. An isotope test of Calcium Absorption. *Brit Med J* Dec 9: 1539-1541, 1961.
79. Cannigia A, Gennari C, Bianchi V, Guideri R. Intestinal Absorption of ^{45}Ca in senile Osteoporosis. *Acta Med. Scand.* 173: 613-617, 1963.
80. Avioli LV, McDonald JE, Singer RA, Henneman PH.. A new oral isotopic test of calcium absorption. *J Clin Invest* 44: 128-139, 1965.
81. DeGrazia JA, Ivanovich P, Fellows H, Rich C.. A double isotope method for measurement of intestinal absorption of calcium in man. *J Lab Clin Med* 66: 822-829, 1965.
82. Mautalen C, Cabrejas ML, Soto RJ. Isotopic determination of intestinal Calcium Absorption in normal subjects. *Metabolism* 18: 395-405, 1969.
83. Chanard J, Assailly J, Bader C, Funk-Brentano J-L. 1974 A rapid method for measurement of fractional intestinal absorption of calcium. *J Nucl Med* 15: 588-592, 1974.
84. Eastell R, Vieira NE, Yergey AL, Riggs, BL. One-day test using stable isotopes to measure True fractional Calcium absorption. *J Bone Min Res* 4: 463-468, 1989.

85. Marshall DH, Nordin BEC. A comparison of radioactive calcium absorption test with net calcium absorption. *Clin Sci* 61: 477-481, 1981.
86. Heaney RP, Recker RR. Estimation of true Calcium Absorption. *Ann Int Med* 103: 516-521, 1985.
87. Milhaud G, Aubert J-P, Bourichon J.. Étude du Métabolisme du calcium chez l'homme a l'aide de calcium⁴⁵. *Path Biol* 9: 1761-1768, 1961.
88. Heaney RP, Recker RR, Saville PD. Calcium balance and calcium requirements in middle-aged women. *Am J Clin Nutr* 30: 1603-1611, 1977.
89. Zerwekh JE, Sakhaee K, Pak CYC. Utility and limitation of calciuric response to oral calcium load as a measure of intestinal calcium absorption: comparison with isotopic fractional calcium absorption. *Invest Urology*, 19: 161-164, 1981
90. Sips AJ, Netelenbos JC, Barto R, Lips P, van der Vijgh WJ. One hour test for estimating intestinal absorption of calcium by using stable strontium as a marker. *Clin Chem* 40: 257-259, 1994.
91. The Italian Society of Osteoporosis. The use of stable tracers to study Intestinal Calcium Absorption. *Bone*. 17: 315-316, 1995.
92. Peacock M, Taylor GA, Brown W. Plasma 1,25 (OH)₂ vitamin D measured by radioimmunoassay and radioreceptor assay in normal and patient with primary hyperparathyroidism and renal failure. *Clin Chem Acta* 101: 93-96, 1980.
93. Francis RM, Peacock M, Barkworth SA, Marshall DH. A comparison of the effect

- of sorbitol and glucose on calcium absorption in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 43: 72-76, 1986.
94. Hui SL, Slemenda CW, Johnston Jr. CC. Age and Bone Mass as Predictors of fracture in a Prospective Study. *J Clin Invest* 81: 1804-1809, 1988.
95. Peacock M, Johnston Jr. CC, Christian JC. Inheritance of calcium absorption, calcium-regulating hormones and bone turnover. In: Calcium regulating hormones and bone metabolism. Cohn DV, Gennari C, Tashjian Jr. AH editors. Elsevier Science Publishers B.V. 1992, pp. 451-454.
96. Slemenda C, Hui SL, Longcope C, Johnston Jr. CC. Sex Steroids and bone Mass. A study of changes about the time of menopause. *J Clin Invest* 80: 1261-1269, 1987.
97. Zettner AJ, Seligson. Application of atomic absorption spectrophotometry in the determination of calcium in serum. *Clin Chem* 10: 869-890, 1964.
98. Fiske CH, Subbarow Y. Colorimetric determination of phosphate. *J Biol Chem* 66: 375-400, 1925.
99. Bartels E, Cikes M. Uber chromogene Der Kreatininbesummung Nach Jaffe. *Clin Chem Acta* 26: 1, 1961.
100. Kivirikko KI, Laitinen O, Prockop DJ. Modifications of a specific assay for hydroxyproline in urine. *Anal Biochem* 19: 249, 1962.
101. Lau K-HW, Onishi T, Wergedal JE, Singer FR, Baylink DJ. Characterization and

- assay of Tartrate-resistant Acid Phosphatase Activity in serum: Potential use to assess Bone resorption. *Clin Chem* 33: 458-462, 1987.
102. Sisson de Castro JA, Peacock M, McClintock R, Johnston Jr. CC. Plasma Tartrate-resistant Acid Phosphatase (TRAP) as a marker of Bone Resorption. *J. Bone Min. Res.* 4/ suppl. 1: S171, 1989.
103. Price PA, Nishimoto SK. Radioimmunoassay for the vitamin K-dependent protein of bone and its discovery in plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2234-2238, 1980.
104. Epstein S, McClintock R, Bryce G, Poser J, Johnston Jr. CC, Hui S. Differences in serum Bone Gla Protein with age and sex. *Lancet* 1:307-310, 1984.
105. Wiske PS, Epstein S, Bell NH, Queener S.F., Edmondson J, Johnston Jr. CC. Increases in immunoreactive Parathyroid Hormone with Age. *N Eng. J Med* 300: 1419-1421, 1979.
106. Shepard RM, Horst RL, Hamstra AJ, DeLuca HF. Determination of vitamin D and its metabolites in plasma from normal and anephric man. *Biochem J.* 182: 55-69, 1979.
107. Reinhardt TA, Horst RL, Orf JW, Hollis BW. A microassay for 1,25-dihydroxyvitamin D not requiring high performance liquid chromatography: application to clinical studies. *J Clin Endocrinol Metab* 58: 91-98, 1984.
108. Heaney RP, Recker RR. Estimating true fractional calcium absorption. Letter to

- the editor. *Ann Inn Med* 108: 905-906, 1988.
109. Johnston Jr CC, Hui SL, Witt RM, Appledorn R, Baker RS, Longcope C. Early menopausal changes in bone mass and sex steroids. *J Clin Endocrinol Metab* 61: 905-911, 1985.
110. Crilly RG, Francis RM, Nordin BEC. Steroid hormones, ageing and bone. *Clin Endocrinol Metab* 10: 115-139, 1981.
111. Nordin BEC, Polley KJ.. Metabolic consequences of the Menopause. A cross-sectional, longitudinal, and intervention study on 557 normal postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 41:s1-s59, 1987.
112. Falch JA, Gautvik KM.. A longitudinal study of pre- and postmenopausal changes in calcium metabolism. *Bone* 9: 15-19, 1988.
113. Stepan JJ, Pospichal J, Presl J, Pacovsky V. Bone loss and biochemical indices of bone remodeling in surgically induced Postmenopausal women. *Bone*: 279-284, 1987.
114. de la Piedra C, Torres R, Rapado A, Diaz Curriel M, Castro N. Serum Tartrate-resistant Acid Phosphatase and Bone Mineral Content in Postmenopausal Osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 45: 58-60, 1989.
115. Delmas PD. Biochemical markers for the assessment of bone turnover. In : *Osteoporosis. Etiology, diagnosis and management*. Riggs BL and Melton III LJ editors. 2nd edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Chapter 14,

- 1995.
116. Fromar AM, Meldrum DR, Geola F, Shamonki IM, Tataryn IV, Deftos LJ, Judd HL. Relationship of fasting urinary calcium to circulating estrogen and body weight in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 50: 70-75, 1980.
117. Riis BJ. Biochemical markers of bone turnover in diagnosis and assessment of therapy. *Am J Med* 91: suppl 5B, 64S-68S, 1991.
118. Azria M. The value of biomarkers in detecting alterations in bone metabolism. *Calcif Tissue Int* 45: 7-11, 1989.
119. Hartwell D, Riis BJ, Christiansen C. Comparison of vitamin D metabolism in early healthy and late osteoporotic postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 47: 332-337, 1990.
120. Falch JA, Oftebro H, Haug E.. Early postmenopausal bone loss is not associated with a decrease in circulating levels of 25-hydroxyvitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D, or vitamin D-binding protein. *J Clin Endocrinol Metab* 64: 836-841, 1987.
121. Epstein S, Bryce G, Hinman JW, Miller ON, Riggs BL, Hui SL, Jonhston Jr. CC. The influence of age on bone mineral regulating hormones. *Bone* 7: 421-425, 1986.
122. Need AG, Horowitz M, Philcox J, Nordin BEC. Biochemical effects of a calcium supplement in osteoporotic postmenopausal women with normal absorption and

- malabsorption of calcium. *Mineral Electrolytr Metab* 13: 112-116, 1987.
123. Morris HA, Need AG, Horowitz M, O'Loughlin P, Nordim BEC. Calcium Absorption in normal and osteoporotic Postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 49: 240 - 243, 1991.
124. Devine A, Prince RL, Kerr DA, et al. Correlates of intestinal calcium absorption in women 10 years past the menopause. *Calcif Tissue Int* 52: 358-360, 1993.
125. Wiegmann TB, Kaye M. Malabsorption of calcium and phosphate in chronic renal failure: ^{32}P and ^{45}Ca studies in dialysis patients. *Clin Nephrol* 34: 35-41, 1990.
126. Rubinger D, Krause I, Alcoy-Giggs M, Popovtzer MM. A simple test of intestinal absorption of calcium in rats. *Nephrons* 57: 206-209, 1991.
127. Selby PL, Peacock M. Ethinyl Estradiol and Norethindrone in the treatment of primary hyperparathyroidism in Postmenopausal women. *N Eng J Med* 314: 1481-1485, 1986.
128. Caniggia A, Gennari c, Borello G, et al.. Intestinal absorption of Ca-^{47} after treatment with oral oestrogen-gestogens in senile osteoporosis. *Br Med J* 4: 30-32, 1970.
129. Heaney RP, Recker R, Hinders SM. Variability of Calcium absorption. *Am J Clin Nutr* 47: 262-264, 1988.
130. Barger-Lux MJ, Heaney RP, Lanspa SJ, Healy J, Deluca HL. Bases of Calcium

- absorptive variability. *J Bone Mineral Res* 8: s338, Abstract 887, 1993
131. Krall EA, Dawson-Hughes B. Relation of fractional ^{47}Ca retention to season and rates of bone loss in healthy postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 6: 1323-1329, 1991.
132. Cohn SH, Ellis KS, Wallach S, et al. Absolute and relative deficit in total-skeletal calcium and radial bone mineral in osteoporosis. *J Nucl Med* 15: 428-435, 1974.
133. Harrison JE, McNeil KG, Meema HE, et al. Partial-body calcium measurements by in vivo neutron activation analysis: comparisons with x-ray photodensitometry measurements of the radius. *J Nucl Med* 15: 929-934, 1974.
134. Manzke E, Chesnut III CH, Wergedal JE, Baylink DJ, Nelp WB. Relationship between local and total bone mass in osteoporosis. *Metabolism* 24: 605-615, 1975.
135. Lindsay R, Cosman F, Herrington BS, Himmelstein S. Bone mass and body composition in normal women. *J Bone Mineral Res* 7: 55-63, 1992.
136. Gotfredsen A, Nilas L, Riis BJ, Thomsen K, Christiansen C. Bone changes occurring spontaneously and caused by oestrogen in early postmenopausal women: a local or generalised phenomenon? *Brit Med J* 292: 1098-1100, 1986.
137. Bjarnason K, Nilas L, Hassager C, Christiansen C. Dual energy x-ray absorptiometry of the spine - decubitus lateral versus anteroposterior projection

- in osteoporotic women: comparison to single energy x-ray absorptiometry of the forearm. *Bone* 16: 255-260, 1995.
138. Mazess RB, Peppler WW, Chesney RW, Lange TA, Lindgren U, Smith E Jr. Total body and regional bone mineral by dual photon absorptiometry in metabolic bone disease. *Calcif Tissue Int* 36: 8-13, 1984.
139. Riggs BL, Wahner HW, Dunn WL, Mazess RB, Offord KP, Melton LJ III. Differential changes in bone mineral density of the appendicular and axial skeleton with aging. relationship to spinal osteoporosis. *J.Clin.Invest* 67: 328-335, 1981.
140. Avioli LV, Heaney RP. Calcium intake and bone health - editorial. *Calcif Tissue Int.* 48: 221-223, 1991.
141. Slemenda CW, Christian JC, Willians CJ, Norton JA, Johnston Jr, CC. Genetic determinants of bone mass in adult women: a reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates. *J Bone Min Res* 6: 561-567, 1991.
142. Need AG, Nordin BEC, Horowitz M, Morris HA. Calcium and Calcitriol therapy in Osteoporotic Postmenopausal Women with Impaired Calcium Absorption. *Metabolism* 39 (suppl.1): 5 -54, 1990.

143. Tellez M, Arlot ME, Mawer EB et alli. Gastrointestinal calcium absorption and dietary calcium load: relationships with bone remodelling in vertebral osteoporosis. *Osteoporosis Int.* 5: 14-22, 1995.