

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA AGUIAR MOREIRA KULAK

**ESTUDO DA REMODELAÇÃO E MICROESTRUTURA
ÓSSEA POR HISTOMORFOMETRIA E MICROTOMOGRÁFIA
COMPUTADORIZADA EM MULHERES NA MENOPAUSA
COM DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA**

**CURITIBA
2010**

CAROLINA AGUIAR MOREIRA KULAK

**ESTUDO DA REMODELAÇÃO E MICROESTRUTURA
ÓSSEA POR HISTOMORFOMETRIA E MICROTOMOGRÁFIA
COMPUTADORIZADA EM MULHERES NA MENOPAUSA
COM DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA**

**Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Interna, Setor
de Ciências da Saúde, Universidade Federal
de Paraná.**

**Orientador: Prof. Dr. Cesar Luiz Boguszewski
Co-orientadores:
Prof. Dr. David W. Dempster
Prof.^a Dr.^a Victoria Z. C. Borba**

**CURITIBA
2010**

HISTÓRIA E AGRADECIMENTOS

Este projeto foi originalmente idealizado em dezembro de 1998, quando eu e Jaime voltávamos de Nova York, após um *fellow* na Universidade Columbia. Como a experiência de morar fora do país tinha sido ótima, programamos para um futuro próximo outro período no exterior. Faríamos um doutorado e iríamos então acompanhados dos nossos filhos, que ainda estavam para chegar. Sete anos passados, em 2005, iniciamos contatos com possíveis mentores no exterior. Naquela época, coisas importantes haviam acontecido. Entre elas, no âmbito familiar, o nascimento das crianças, Isabela e Jaime Neto. Do lado profissional, a criação da Unidade de Metabolismo Ósseo do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do HC-UFPR-SEMPR, juntamente com a amiga Victória e com a preciosa ajuda do Dr. Bilezikian (Columbia), que fez a doação do aparelho de densitometria. Essa Unidade contribuiu para o ensinamento do metabolismo ósseo em nosso meio, nosso crescimento científico, reconhecimento pelos colegas e, principalmente, uma grande amizade. Na sequência, mestrado, defendido sob orientação do amigo César, e muitos projetos em osteoporose secundária. Após todo esse percurso, em maio de 2005, por intermédio do Dr. Bilezikian (ele, novamente), fiz uma entrevista com a Dr.^a Juliet Compston, em Cambridge-UK, que aceitou ser minha mentora e sugeriu-me um estudo em histomorfometria óssea. Na época, fiquei tão empolgada com a oportunidade que, já em junho de 2005, fiz contato com Dr.^a Vanda Jorgetti (Nefrologia-USP) e iniciei minhas idas a São Paulo em busca do aprendizado do procedimento da biópsia óssea. Fui tão bem recebida no laboratório da Dr.^a Vanda que fiquei mais empolgada ainda. Lá, conheci a Dr.^a Melani Custódio que, tornando-se uma grande companheira, veio posteriormente várias vezes à Curitiba me auxiliar nas biópsias. Nesse meio tempo, os contatos de Jaime na mesma instituição na Inglaterra não se consolidaram, nos atingindo como um banho de água fria, sobretudo porque na ocasião eu já havia iniciado o estudo e as biópsias. Não demorou, felizmente, para que, graças à intervenção do Dr. Rui Ferriani, de Ribeirão Preto, surgisse uma oportunidade para Jaime na Universidade de Yale, Connecticut. Com isso, nossos planos mudaram e voltaram-se mais uma vez para os domínios do Tio Sam. Por força maior do destino, um dos maiores nomes da histomorfometria dos EUA estava próximo: exatamente na Universidade Columbia. Em 7 de setembro de 2008, assim, eu, Jaime, Isabela (9) e Jaiminho (6) partimos para Elmsford, cidade localizada nos subúrbios de Nova York. De mala e cuia – e com a sensação de sonho sendo realizado.

Nesta resumida história, muitas pessoas tiveram participação significativa, contribuindo de algum modo para a realização deste projeto de vida e de doutorado, tão importante para mim.

Prof. Dr. Lineu César Werneck, coordenador do Curso de Pós- Graduação em Medicina Interna do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (UFPR), pela oportunidade de realização deste projeto.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio no programa de pós-graduação e a oportunidade de participar do Projeto de Doutorado com Estudo no Exterior (PDEE).

Prof. Dr. César L. Boguszewski, chefe do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da UFPR-SEMPR. Sua ajuda foi fundamental no processo de admissão no programa de doutorado da UFPR e PDEE, como na elaboração final desta dissertação. Amigo presente e exemplo a ser seguido na vida acadêmica.

Prof.^a Dr.^a Victória Z. Cochenski Borba, parceira na Unidade de Metabolismo Ósseo do SEMPR. Participou de todos os passos deste projeto e incentivou minha experiência no exterior.

Equipe do Metabolismo Ósseo do SEMPR. Os médicos Victória Borba, Nádila Manaz e Cássio Ramos me deram cobertura no ano que estive fora do Brasil. As funcionárias Elizabete K. Coelho, Rafaela Ceron, Kelly Barba e Vanessa David colaboraram na marcação de consultas, coletas de sangue e exames de densitometria óssea.

Prof. Dr. Hans Graf, pessoa querida e meu exemplo na Endocrinologia. Sua ajuda foi fundamental no nosso *fellowship* na Universidade Columbia em 1997-98.

Drs. Gisah A. de Carvalho, Henrique L. Suplicy e Vicente F. C. Andrade. Amigos presentes na minha vida desde a residência em Endocrinologia.

“Família SEMPR”, pela amizade e apoio. O ambiente acolhedor do SEMPR foi um incentivo constante na realização deste projeto.

Prof. Dr. João Adriano de Barros, chefe do Laboratório de Função Pulmonar do HC-UFPR, pela ajuda na captação das pacientes.

Dr. Irinei Melek, pneumologista do Hospital Angelina Caron, pelo encaminhamento de pacientes ao nosso Serviço.

Dr.^a Lêda Maria Rabelo, pela revisão e sugestões. Este projeto (pneumo-endócrino) e outros que virão resgataram uma antiga amizade da época da residência de clínica médica.

Laboratório Alvaro Cascavel-PR, pelas dosagens da 25OHD.

Dr.^a Vanda Jorgetti, chefe do Laboratório de Fisiopatologia do Serviço de Nefrologia-USP. Abriu-me as portas de seu laboratório, o que possibilitou o processamento das biópsias. Dela obtive, além disso, os primeiros ensinamentos em histomorfometria óssea e apoio constante.

Lucienne Reis, bióloga do Laboratório de Fisiopatologia Renal do Serviço de Nefrologia-USP, pelo fornecimento das amostras das biópsias ósseas usadas como grupo de controle de microtomografia. A ela e demais funcionários, agradeço a receptividade e ajuda nas minhas idas ao laboratório.

Dr.^a Melani Custódio, nefrologia-USP, pelos ensinamentos na técnica da biópsia óssea e participação nos primeiros procedimentos, a par de sua amizade e torcida constantes.

Tios Sandra e Souza, que me acolheram com carinho nas minhas idas a São Paulo.

Residentes do SEMPR, que me auxiliaram nos procedimentos das biópsias, em especial à Dr.^a Andressa Bornschein, que esteve presente na maioria delas. Agradeço também ao Jaime, que participou dos procedimentos, transmitindo segurança com sua experiência.

Querido Prof. Dr. John P. Bilezikian, que me recebeu novamente, e tão bem, na Endocrinologia da Universidade Columbia. Possibilitou-me a realização do programa de doutorado-sanduiche na UFPR-Universidade Columbia e o acesso aos Laboratórios de Bioengenharia e Histomorfometria Óssea. Pessoa maravilhosa, cuja influência foi fundamental na minha vida acadêmica.

Dr. David W. Dempster, chefe do Laboratório de Histomorfometria Óssea do Regional Bone Center do Hospital Helen Hayes e coorientador deste projeto. Sua participação foi decisiva, tanto pelos ensinamentos em histomorfometria e orientação durante a análise das lâminas, como na organização dos dados. Colaborou na elaboração

Dr.^a Hua Zhou, pela sua contribuição no meu treinamento em histomorfometria óssea, e ao Dr. Shou Lu, pela ajuda com a microtomia e coloração das lâminas.

Aos Drs. Robert Recker and Donald Kimmel pela autorização do uso das lâminas de mulheres normais usadas como grupo controle para histomorfometria neste estudo.

Funcionários do Regional Bone Center do Hospital Helen Hayes, com os quais convivi nesse período: Adrienne Tewksbury, Dr.^a Felicia Cosman, Jerri Nieves, Dr. Robert Lindsay e a dedicada amiga Kathleen Fiolla.

Elizabeth Grubert, pelos ensinamentos de estatística e sua aplicação no presente estudo.

Dr. Edward Guo, chefe do Laboratório de Bioengenharia Óssea do Departamento de Engenharia Biomédica da Universidade Columbia, e a engenheira Sherry Lui, pela oportunidade de realização das microtomografias e ensinamento da técnica.

Minha amada e grande família, pela constante presença, apoio e torcida.

Meus filhos, Isabela e Jaime Neto, motivação para toda minha vida. A eles, minha gratidão pelo companherismo nesta jornada.

Meu marido Jaime, que diretamente compartilhou deste sonho e me apoiou em todos os momentos. A ele, meu sincero amor.

Meus amados pais, Mariliza e Francisco, pela minha formação como pessoa e como profissional e pelo amor e dedicação que sempre iluminaram meus passos.

Cabe-me dizer, por fim, que durante esta longa jornada de conhecimento, aprendizado, experiência profissional, científica e de vida, muitos desafios e dificuldades surgiram. Enfrentei-os com força e coragem: qualidades que busco espelhar em minha mãe. Muitas vezes, usei o bom humor, pois tinha certeza que coisas que tanto me incomodavam seriam um dia motivo para risadas, característica típica da minha família.

No final desta jornada, contudo, me deparei indiscutivelmente com o maior de todos os meus desafios: a doença e o falecimento do meu pai. Pai querido, amigo, que sempre vibrou com minha carreira e foi o grande incentivador da minha vida profissional.

A ele, portanto, *in memoriam* e com todo amor, dedico esta conquista.

RESUMO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é associada com osteoporose e fraturas por fragilidade óssea. Os objetivos deste estudo foram analisar a microestrutura óssea, bem como os índices estáticos e dinâmicos do osso cortical e trabecular em mulheres na menopausa com DPOC. Vinte mulheres com diagnóstico espirométrico de DPOC e sem uso de glicocorticoide sistêmico contínuo, foram submetidas a biópsia óssea após dupla marcação com tetraciclina. As biópsias ósseas foram analisadas através de duas técnicas, histomorfometria e microtomografia computadorizada (μ CT) e comparadas com controles pareados por idade. De acordo com a gravidade da DPOC (*Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* - GOLD), as pacientes foram classificadas em tipo I (15%), Tipo II (40%), Tipo III (30%) e Tipo IV (15%). As médias (\pm DP) do volume ósseo trabecular ($15,20 \pm 5,91$ vs. $21,34 \pm 5,53\%$, $p=0,01$), número das trabéculas ($1,31 \pm 0,26$ vs. $1,77 \pm 0,51$ por mm, $p=0,003$), espessura trabecular (141 ± 23 vs. $174 \pm 36 \mu\text{m}$, $p=0,006$) e densidade da conectividade (Conn.D) ($5,56 \pm 2,78$ vs. $7,94 \pm 3,08/\text{mm}$, $p=0,04$) foram significativamente menores nas pacientes com DPOC do que nos controles. A separação trabecular (785 ± 183 vs. $614 \pm 136 \mu\text{m}$, $p=0,01$) e a porosidade cortical ($4,11 \pm 1,02$ vs. $2,32 \pm 0,94$ poros/ mm^2 ; $p<0,0001$) foram maiores nas pacientes com DPOC, enquanto que a largura cortical foi menor (458 ± 214 vs. $762 \pm 240 \mu\text{m}$; $p<0,0001$). A análise dos parâmetros dinâmicos mostrou que as pacientes apresentaram uma taxa de aposição mineral significativamente menor do que os controles ($0,56 \pm 0,16$ vs. $0,66 \pm 0,12 \mu\text{m}/\text{dia}$; $p=0,01$). Houve uma correlação negativa entre os parâmetros estruturais como volume ósseo ($r=-0,40$), Conn.D ($r=-0,67$) e número de trabéculas ($r=-0,71$) com a intensidade do tabagismo. As pacientes com DPOC GOLD III e IV, apresentaram taxa de formação óssea mais baixa do que as pacientes com DPOC menos severa, GOLD I e II ($0,028 \pm 0,009$ vs. $0,016 \pm 0,011 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$; $p=0,04$). Concluímos que há uma deterioração da microestrutura óssea cortical e trabecular em mulheres com DPOC e que esta alteração correlaciona-se com a intensidade do tabagismo. Estas anormalidades esqueléticas vistas no osso trabecular e cortical podem explicar a alta prevalência de fraturas nesta doença.

ABSTRACT

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is associated with osteoporosis and fragility fractures. The objectives of this study were to assess static and dynamic indices of cancellous and cortical bone structure in postmenopausal women with COPD. Twenty women with COPD who had not received chronic oral glucocorticoids, underwent to bone biopsies after double-tetracycline labeling. Biopsies were analyzed by histomorphometry and computerized microtomography (μ CT) and compared with age-matched controls. Distribution of the patients according the severity of the disease by Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) was type I (15%), type II (40%), type III (30%) and type IV (15%). Comparing to the controls, the mean (\pm SD) of cancellous bone volume (15.20 ± 5.91 vs. $21.34\pm 5.53\%$, $p=0.01$), trabecular number (1.31 ± 0.26 vs. 1.77 ± 0.51 per mm, $p=0.003$), trabecular thickness (141 ± 23 vs. $174\pm 36\mu\text{m}$, $p=0.006$) and connectivity density were lower in patients with COPD (5.56 ± 2.78 vs. $7.94\pm 3.08/\text{mm}$, $p=0.04$). Trabecular separation (785 ± 183 vs. $614\pm 136\mu\text{m}$, $p=0.01$) and cortical porosity (4.11 ± 1.02 vs. 2.32 ± 0.94 voids/ mm^2 ; $p<0.0001$) were higher in COPD while cortical width (458 ± 214 vs. $762\pm 240\mu\text{m}$; $p<0.0001$) was lower. Dynamic parameters showed significantly lower mineral apposition rate in COPD (0.56 ± 0.16 vs. $0.66\pm 0.12\mu\text{m}/\text{day}$; $p=0.01$). There was a negative correlation between structural parameters such as bone volume ($r=-0.40$), Conn.D ($r=-0.67$), trabecular number ($r=-0.71$) with smoking. Patients with more severe disease, GOLD III and IV, presented lower bone formation rate than GOLD I and II (0.028 ± 0.009 vs. $0.016\pm 0.011\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$; $p=0.04$). We conclude that postmenopausal women with COPD present both cancellous and cortical bone structural deterioration, whereas some parameters correlated negatively with smoking. The skeletal abnormalities seen in cancellous and cortical bone provide an explanation for the high prevalence of vertebral fractures in this disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - BIÓPSIA ÓSSEA USANDO A TREFINA CONECTADA AO DRILL.....	37
FIGURA 2 - BLOCO DA BIÓPSIA SENDO CORTADO NO MICRÓTOMO.....	40
FIGURA 3 - CORTES SENDO CORADOS COM TRICRÔMICO DE GOLDNER	40
FIGURA 4 - EXEMPLO DE MEDIDA DA LARGURA CORTICAL DA PACIENTE N.º 19.....	42
FIGURA 5 - SUPERFÍCIE E LARGURA OSTEOIDE DA PACIENTE N.º 3	42
FIGURA 6 - SUPERFÍCIE REABSORVIDA DA PACIENTE N.º 1	42
FIGURA 7 - MARCAÇÕES DUPLAS E SIMPLES COM TETRACICLINA DA PACIENTE N.º 1.....	43
FIGURA 8 - EXEMPLO DA MEDIDA DA TAXA DE APOSIÇÃO MINERAL (MAR).....	43
FIGURA 9 - DISTRIBUIÇÃO DAS PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO DE GOLD	47
FIGURA 10 - MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (μ CT) DE CRISTA ILÍACA DE 2 PACIENTES E 2 CONTROLES	50
FIGURA 11 - CORRELAÇÃO ENTRE CONECTIVIDADE E TABAGISMO.....	51
FIGURA 12 - CORRELAÇÃO ENTRE PaO_2 E ESPESSURA TRABECULAR.....	51
FIGURA 13 - CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS MEDIDOS ATRAVÉS DA MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (μ CT) E DA HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA	52
FIGURA 14 - OSSO CORTICAL DE 2 PACIENTES E DOIS CONTROLES	53
FIGURA 15 - CORRELAÇÃO ENTRE VEF_1 E LARGURA CORTICAL.....	54
FIGURA 16 - TAXA DE FORMAÇÃO ÓSSEA (BFR) DO SUBGRUPO DE PACIENTES GOLD I E II EM COMPARAÇÃO COM O SUBGRUPO GOLD III E IV.....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC) E DOS GRUPOS CONTROLES	46
TABELA 2 -	RESULTADOS DA ESPIROMETRIA, OXIMETRIA DE PULSO E GASOMETRIA ARTERIAL DO SUBGRUPO DE PACIENTES GOLD I E II EM COMPARAÇÃO COM O SUBGRUPO GOLD III -IV	47
TABELA 3 -	RESULTADOS DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA (DMO) DAS PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA	48
TABELA 4 -	METABOLISMO MINERAL ÓSSEO DAS PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA.....	48
TABELA 5 -	MICROESTRUTURA DE OSSO TRABECULAR POR MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (μ CT) DE PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA E CONTROLES	49
TABELA 6 -	PARÂMETROS ESTRUTURAS DE OSSO CORTICAL DE PACIENTES E CONTROLES	53
TABELA 7 -	PARÂMETROS ESTÁTICOS DE REMODELAÇÃO DO OSSO TRABECULAR E DA SUPERFÍCIE ENDOCORTICAL	54
TABELA 8 -	PARÂMETROS DINÂMICOS DE REMODELAÇÃO ÓSSEA DE OSSO TRABECULAR E SUPERFÍCIE ENDOCORTICAL	55
TABELA 9 -	PARÂMETROS ESTÁTICOS E DINÂMICOS DE REMODELAÇÃO ÓSSEA TRABECULAR DE PACIENTES EXPOSTAS E NÃO EXPOSTAS AO GLICOCORTICOIDE INALATÓRIO (GI)	56
TABELA 10 -	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, DENSIDADE MINERAL ÓSSEA (DMO) E NÍVEIS DE 25OHD DE PACIENTES COM HISTÓRIA DE FRATURAS EM COMPARAÇÃO COM AS QUE NÃO FRATURARAM	57

LISTA DE SIGLAS

25OHD	- 25 hidroxivitamina D
AjAR	- Taxa de aposição ajustada (do inglês, <i>adjusted aposition rate</i>)
BFR	- Taxa de formação óssea (do inglês, <i>bone formation rate</i>)
BS	- Superfície óssea (do inglês, <i>bone surface</i>)
BV/TV	- Volume ósseo (do inglês, <i>bone volume</i>)
Conn. D	- Densidade da conectividade (do inglês, <i>connectivity density</i>)
Ct. Ar	- Área cortical (do inglês, <i>cortical área</i>)
Ct. Po.N	- Número de porosidade cortical (do inglês, <i>cortical porosity number</i>)
Ct. Wi	- Largura cortical (do inglês, <i>cortical width</i>)
CVF	- Capacidade vital forçada
DA	- Grau de anisotropia (do inglês, <i>anisotropy degree</i>)
DMO	- Densidade Mineral Óssea
DP	- Desvio-padrão
DPOC	- Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DXA	- Dual Energy X-ray Absortimetry (medida da absorção de Raio-X de Dupla Energia)
EBFR	- Taxa de formação óssea endocortical (do inglês, <i>endocortical bone formation rate</i>)
EES	- Superfície reabsorvida endocortical (do inglês, <i>endocortical eroded surface</i>)
EMAR	- Taxa de aposição mineral endocortical (do inglês, <i>endocortical mineral aposition rate</i>)
EMS	- Superfície mineralizante endocortical (do inglês, <i>endocortical mineralized surface</i>)
EOS	- Superfície osteoide endocortical (do inglês, <i>endocortical osteoid surface</i>)
ES	- Superfície reabsorvida (do inglês, <i>eroded surface</i>)
FA	- Fosfatase Alcalina
GI	- Glicocorticoide inalatório
GOLD	- Iniciativa Global para Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (do inglês, <i>Global Initiative For Chronic Obstructive Lung Disease</i>)
GS	- Glicocorticoide sistêmico
HC-UFPR	- Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná

ICTP	- Telepeptideo do colágeno tipo I (<i>do inglês, I collagen telepeptide</i>)
IMC	- Índice de Massa Corpórea
MAR	- Taxa de aposição mineral (<i>do inglês, mineral aposition rate</i>)
MS/BS	- Superfície mineralizante (<i>do inglês, mineralized surface</i>)
OW	- Largura osteoide (<i>do inglês, osteoid width</i>)
P1CP	- Peptídeos tipo I do pro-colágeno C-terminal
P1NP	- Peptídeos tipo I do pro-colágeno N-terminal
PaCO ₂	- Pressão Arterial Parcial do Gás Carbônico
PaO ₂	- Pressão Arterial Parcial de Oxigênio
PFP	- Prova de Função Pulmonar
PTH	- Paratohormônio
RANK	- Receptor ativador do fator nuclear kappa β
RANK-L	- Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa β
SMI	- Índice de modelo estrutural (<i>do inglês, structural model índice</i>)
Tb. N*	- Número de trabéculas medido pela microtomografia
Tb. Sp*	- Separação trabecular, medido pela microtomografia
Tb.N	- Número de trabéculas (<i>do inglês, trabecular number</i>)
Tb.Sp	- Separação trabecular (<i>do inglês, trabecular separartion</i>)
Tb.Th*	- Espessura trabecular (<i>do inglês, trabecular thichness</i>)
Tb.Th*	- Espessura trabecular, medido pela microtomografia
Tb.Wi	- Largura trabecular (<i>do inglês, trabecular width</i>)
TMD	- Densidade mineral do tecido (<i>do inglês, tissue mineral density</i>)
TNF α	- Fator de Necrose tumoral alfa
VEF ₁	- Volume expiratório forçado no primeiro segundo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1	DPOC	18
3.2	OSTEOPOROSE	20
3.3	DPOC E OSTEOPOROSE	22
3.3.1	Fatores contribuintes para osteoporose na DPOC.....	23
3.4	HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA.....	28
3.5	MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA (μ CT)	30
4	PACIENTES (SUJEITOS) E MÉTODOS	31
4.1	PACIENTES.....	31
4.2	CONTROLES.....	32
4.2.1	Controles da histomorfometria	32
4.2.2	Controles da microtomografia computadorizada	32
4.3	PROTOCOLO DE ESTUDO	33
4.3.1	Teste de função pulmonar.....	34
4.3.2	Densidade mineral óssea (DMO)	35
4.3.3	Exames laboratoriais	35
4.3.4	Biópsia óssea	36
4.3.5	Preparação do material da biópsia óssea	38
4.3.6	Microtomografia computadorizada	38
4.3.7	Microtomia e coloração	40
4.3.8	Histomorfometria óssea.....	40
4.3.9	Análise estatística	44
5	RESULTADOS	45
5.1	SELEÇÃO DAS PACIENTES PARA BIÓPSIA	45
5.2	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS PACIENTES SELECIONADAS E DOS GRUPOS CONTROLES	45
5.3	PROVA DE FUNÇÃO PULMONAR, CLASSIFICAÇÃO DA DPOC E GASOMETRIA ARTERIAL	46
5.4	DENSIDADE MINERAL ÓSSEA (DMO).....	47

5.5	METABOLISMO MINERAL ÓSSEO DAS PACIENTES COM DPOC.....	48
5.6	MICROESTRUTURA DO OSSO TRABECULAR PELA MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA (μ CT)	49
5.7	PARÂMETROS ESTRUTURAIS E DE REMODELAÇÃO ATRAVÉS DA HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA DE PACIENTES E CONTROLES	52
5.8	USO DE GLICOCORTICOIDE INALATÓRIO	55
5.9	HISTÓRIA DE FRATURA POR FRAGILIDADE ÓSSEA	56
6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64
	ANEXO 1 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EXAMES COMPLEMENTARES DAS PACIENTES COM DPOC	80
	ANEXO 2 - RESULTADO HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA DAS PACIENTE COM DPOC	84
	ANEXO 3 - RESULTADO DA MICROTOMOGRÁFIA ÓSSEA DAS PACIENTES COM DPOC	86
	ANEXO 4 - RESULTADO DA HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA DO GRUPO CONTROLE	87
	ANEXO 5 - RESULTADO MICROTOMOGRÁFIA ÓSSEA DO GRUPO CONTROLE	88
	ANEXO 6 - DADOS CLÍNICOS DO GRUPO CONTROLE DA MICROTOMOGRÁFIA ÓSSEA - μCT	89
	ANEXO 7 - DADOS CLÍNICOS DO GRUPO CONTROLES DA HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA.....	90
	ANEXO 8 - PARÂMETROS ESTRUTURAIS E ESTÁTICOS DE REMODELAÇÃO DE OSSO TRABECULAR DOS CONTROLES AMERICANOS E BRASILEIROS.....	91
	ANEXO 9 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	92
	ANEXO 10 - ARTIGOS PUBLICADOS	96

1 INTRODUÇÃO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é caracterizada pela limitação crônica ao fluxo aéreo que não é totalmente reversível e resulta em alterações patológicas no pulmão (RABE *et al.*, 2007; FROMER; COOPER, 2008). Em geral, a DPOC acomete 5 a 15% da população adulta, mas sua prevalência vem aumentando com os anos (CHAPMAN *et al.*, 2006). De acordo com o estudo PLATINO realizado na América Latina, a prevalência de DPOC na população acima de 40 anos de idade é de 14,3% (MENEZES *et al.*, 2008). Como na maioria das vezes a DPOC aparece em fumantes de longa data, os pacientes geralmente apresentam outras doenças relacionadas ao tabagismo e ao envelhecimento. Entre elas, a osteoporose tem sido considerada uma das co-morbidades mais comuns associadas a DPOC (ANDREASSEN; VESTBO, 2003; AGUSTI; SORIANO, 2008; BARNES; CELLI, 2009). Dependendo da população estudada, a frequência de osteopenia e osteoporose varia entre 9 a 69% em pacientes com DPOC (GRAAT-VERBOOM *et al.*, 2009; JØRGENSEN *et al.*, 2007).

A fisiopatologia da osteoporose em pacientes com DPOC não está bem estabelecida. Acreditava-se que o uso crônico de glicocorticoide sistêmico (GS) era a principal causa de perda óssea nestes indivíduos (BISKOBING, 2002; DUBOIS *et al.*, 2002; GLUCK; COLICE, 2004). No entanto, osteoporose e fraturas também foram relatadas em pacientes que nunca usaram GS (JØRGENSEN *et al.*, 2007; FRANCO *et al.*, 2009). Em um estudo transversal realizado em nosso serviço, 49 pacientes com DPOC sem uso crônico de GS apresentaram densidade mineral óssea (DMO) significativamente mais baixa do que o grupo controle e uma alta frequência de hiperparatireoidismo secundário por insuficiência de vitamina D (FRANCO *et al.*, 2009). Além disto, neste estudo foi observado uma correlação entre a presença de osteoporose e a gravidade da doença pulmonar, sugerindo que a obstrução pulmonar tenha um papel na patogênese da osteoporose na DPOC. Esta correlação com a gravidade da doença foi descrita por outros autores e observada também nos estudos que avaliaram fraturas (NUTI *et al.*, 2009; VRIES *et al.*, 2005).

A DPOC também tem sido relacionada ao aumento do risco de fraturas, com ocorrência de fratura vertebral em até 63% dos pacientes (CARTER *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2008; NUTI *et al.*, 2009). De particular preocupação são as fraturas de

vértebras torácicas, pois estima-se que cada fratura resulte em diminuição de 9% da capacidade vital forçada (SCHLAICH *et al.*, 1998), o que piora condição respiratória dos pacientes. Fraturas por fragilidade ocorrem por diminuição da força óssea, a qual está relacionada com a integração de dois fatores principais: densidade e qualidade óssea. A qualidade óssea refere-se à arquitetura, remodelação e mineralização óssea (SEEMAN; DELMAS, 2006). Alterações na microarquitetura óssea trabecular, como diminuição do volume ósseo, redução no número e na espessura das trabéculas e o aumento do espaço entre as mesmas, levam a redução da força e conseqüente aumento de fraturas. Portanto, a avaliação da microestrutura óssea é um instrumento importante na análise das propriedades mecânicas do osso e, conseqüentemente, do risco de fraturas por fragilidade (PARFITT *et al.*, 1987; DEMPSTER, 2003).

A microestrutura óssea pode ser avaliada em duas dimensões (2D) pela técnica de histomorfometria óssea (PARFITT, 1983a) ou em três dimensões (3D) por microtomografia computadorizada (μ CT) (HILDEBRAND *et al.*, 1999). A histomorfometria é o exame histológico de amostras de biópsia óssea calcificadas, realizada para obter informações tanto quantitativas como dinâmicas do tecido ósseo. Nesta técnica, a estrutura óssea é avaliada em 2D e os parâmetros estruturais são extrapolados para 3D. A μ CT é uma técnica não destrutiva com alta resolução espacial capaz de medição volumétrica de fragmentos de biópsias onde as imagens em 3D permitem a medida direta do diâmetro das trabéculas e da distância entre elas. Essa técnica também fornece informações sobre o grau de mineralização do tecido ósseo, que quando aumentado, indica fragilidade (KAZAKIA *et al.*, 2007).

Múltiplos fatores podem contribuir para a diminuição da massa óssea e piora da sua qualidade em pacientes com DPOC, incluindo tabagismo, inflamação sistêmica, hipercapnia, baixo índice de massa corpórea (IMC), hipóxia, diminuição de massa livre de gordura, hipogonadismo, deficiência de vitamina D e imobilidade (BISKOBING, 2002; KOCHETKOVA *et al.*, 2002; BLACK; SCRAGG, 2005; VRIEZE *et al.*, 2007; YANBAEVA *et al.*, 2007; ARVER; LEHTIHET, 2009). Até o momento, não há estudos que tenham avaliado a microarquitetura óssea e os parâmetros de remodelação óssea por histomorfometria e μ CT em pacientes com DPOC. Sendo assim, faltam informações referentes a correlação entre gravidade da obstrução pulmonar e microestrutura óssea ou parâmetros dinâmicos de formação e mineralização nesta população específica. O presente estudo é o primeiro realizado com este objetivo, e a

população foi formada por mulheres na menopausa com diagnóstico estabelecido de DPOC e que não faziam uso crônico de GS. Este projeto faz parte da linha de pesquisa da Unidade de Metabolismo Ósseo do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (SEMPR) que estuda causas secundárias de osteoporose (KULAK *et al.*, 2004; LORA *et al.*, 2005; DEMARTINI ADE *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2008; FRANCO *et al.*, 2009). Ele foi realizado em parceria com o laboratório de Fisiologia Renal da Disciplina de Nefrologia da Universidade São Paulo, sob responsabilidade da Dr.^a Vanda Jorgetti, onde foram processadas as biópsias das pacientes e fornecidos blocos com fragmentos ósseos de indivíduos normais para controle da μ CT. Outra parceria importante para realização deste projeto foi com a Universidade Columbia, Nova York, Estados Unidos da América (EUA). Através da Divisão de Endocrinologia, sob responsabilidade do Dr. John Bilezikian, parte deste projeto foi realizado no Laboratório de Histomorfometria Óssea do *Regional Bone Center* do Hospital Helen Hayes. Neste laboratório, sob a orientação do Dr. David Dempster, foi realizado a leitura das lâminas. Além disto, contamos também com o apoio do Laboratório de Bioengenharia Óssea do Departamento de Engenharia Biomédica da Universidade Columbia, sob responsabilidade do Dr. Edward Guo, onde foram realizados os exames de μ CT.

2 OBJETIVOS

- Avaliar parâmetros estruturais do tecido ósseo e da remodelação óssea pelas técnicas de histomorfometria e μ CT num grupo de mulheres na pós-menopausa com DPOC não tratadas com GS
- Correlacionar os achados de histomorfometria e μ CT com a gravidade da DPOC e com o tabagismo

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 DPOC

A DPOC é caracterizada pela limitação crônica ao fluxo de ar que não é totalmente reversível. É geralmente progressiva e causada por uma combinação de doenças das vias aéreas pequenas (bronquiolite obstrutiva) e doenças que fazem destruição de parênquima (enfisema). Além disso, está associada a resposta inflamatória anormal para partículas de substâncias nocivas ou gases, levando a inflamação crônica que provoca alterações estruturais e estreitamento das vias respiratórias pequenas (RABE *et al.*, 2007).

Fatores genéticos e ambientais são importantes na gênese da DPOC. O principal fator de risco para o desenvolvimento da DPOC é o tabagismo, presente em 90% dos casos. No entanto, nem todos os fumantes desenvolvem doença clinicamente significativa, o que demonstra que fatores adicionais estão envolvidos na susceptibilidade individual. Outras exposições inalatórias, tais como, gases nocivos, poeiras profissionais e produtos químicos (vapores, irritantes e fumos), bem como poluição do ar interior pela combustão de combustíveis de biomassa em espaços confinados, também podem causar DPOC (BECKLAKE, 1989). O fator de risco genético melhor documentado é a deficiência hereditária de alfa-1 antitripsina, o maior inibidor circulante das proteases de serina (IOACHIMESCU; STOLLER, 2005).

A DPOC é a quarta causa de mortalidade em todo o mundo, sendo considerado um problema de saúde pública crescente. Sua prevalência, morbidade e mortalidade variam entre as diferentes populações, mas, em geral, estão diretamente relacionadas com a prevalência de tabagismo. Uma revisão sistemática e meta-análise dos estudos efetuados em 28 países entre 1990 e 2004 e um estudo adicional do Japão, demonstraram que a prevalência de DPOC é significativamente maior em fumantes e também em ex-fumantes do que em não fumantes, em homens do que em mulheres e em indivíduos com idade superior a 40 anos (HALBERT *et al.*, 2006; RABE *et al.*, 2007). Em 12 países da Ásia-Pacífico e regiões, a prevalência de DPOC moderada e grave foi de 6,3% entre indivíduos com idade igual ou superior a 30 anos (REGIONAL

COPD WORKING GROUP, 2003). De acordo com o estudo PLATINO, a prevalência de DPOC em indivíduos acima de 40 anos de idade no Brasil é de 15,8%, sendo a quinta causa de hospitalização e morte no nosso país (MENEZES *et al.*, 2008).

A DPOC é caracterizada por inflamação das vias respiratórias que parece ser amplificação da resposta inflamatória normal aos agentes irritantes crônicos, como a fumaça do cigarro. Os mecanismos subjacentes a esta amplificação não são ainda compreendidos, mas podem ser geneticamente determinados (RABE *et al.*, 2007). Há um padrão específico de inflamação envolvendo neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Estas células liberam mediadores que interagem com células das vias aéreas e parênquima pulmonar (STOCKLEY, 2002). Estes mediadores atraem células inflamatórias da circulação (fatores quimiotáticos), amplificam o processo inflamatório (citocinas pró-inflamatórias) e induzem mudanças estruturais (fatores de crescimento). Os mediadores principais deste processo são leucotrieno B₄ (LTB₄), as citocinas [interleucina 8 (IL-8), citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral TNF- β , IL-1 e IL-6) e fatores de crescimento (TGF- β)] (BARNES, 2004).

A inflamação pulmonar é amplificada pelo estresse oxidativo e pelo excesso de proteinases (RABE *et al.*, 2007). Um desequilíbrio entre proteases, que quebram componentes do tecido conjuntivo, e anti-proteases, que são protetoras deste processo, foi observado em pacientes com DPOC (IOACHIMESCU; STOLLER, 2005). Embora o processo inflamatório ocorra nos pulmões, estudos demonstram que existe aumento de mediadores inflamatórios na circulação mesmo nos pacientes que pararam de fumar. O motivo pelo qual a DPOC se associa a processo inflamatório sistêmico é desconhecido, entretanto isto pode explicar, em parte, a presença de acometimento extra-pulmonar observado com o progresso da doença (AGUSTI; SORIANO, 2008).

Os sintomas característicos da DPOC são dispneia crônica e progressiva, tosse e produção de expectoração. A limitação ao fluxo aéreo é medida por testes de função pulmonar. O exame de espirometria é essencial para o diagnóstico da DPOC e fornece uma medida útil da gravidade da doença, pela medida do volume expiratório forçado no primeiro minuto (VEF₁) e capacidade vital forçada (CVF), com a obstrução do fluxo aéreo definida como VEF₁/CVF inferior a 70% após bromcodilatador. De acordo com a classificação proposta pelo GOLD (iniciativa global para a DPOC de 2007), a gravidade da doença é medida pela porcentagem de VEF₁ após a

administração de broncodilatador em relação ao valor previsto e também pela presença de sintomas de insuficiência respiratória (RABE *et al.*, 2007):

3.2 OSTEOPOROSE

Osteoporose é caracterizada por diminuição da força óssea, a qual é determinada pela somatória de densidade e qualidade óssea (NIH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL ON OSTEOPOROSIS PREVENTION, DIAGNOSIS, AND THERAPY, 2001). A prevalência de osteoporose está aumentando com a maior expectativa de vida observada em vários países do mundo. É um problema grave de saúde pública, devido a sua alta morbidade e mortalidade. Além disso, as fraturas osteoporóticas apresentam grande impacto econômico pelos altos custos que elas geram (COMPSTON, 2010).

A osteoporose resulta de desequilíbrio na remodelação do tecido ósseo, seja por aumento da reabsorção, diminuição da formação ou ambas. A remodelação óssea é um processo fisiológico que consiste na renovação do tecido, com o objetivo de manter a força do osso. Esse processo ocorre em unidades multicelulares microscópicas chamadas de BMU (unidade óssea multicelular), formadas pelos osteoclastos – células responsáveis pela reabsorção – e pelos osteoblastos, células formadoras de osso (PARFITT, 1984). Além disso, também participam deste processo os osteócitos, células que sinalizam o início da remodelação ao detectar as alterações biomecânicas e microestruturais do tecido ósseo local. Existe uma interação entre osteoblastos e osteoclastos, mediada principalmente pelo ligante do receptor ativador do NF- κ B (RANK-L) e osteoprotegerina (OPG). O RANK-L é expresso na superfície do osteoblasto e tem como função estimular a diferenciação e atividade dos osteoclastos, através da sua ligação no receptor ativador do NF- κ B (RANK), ativando a reabsorção óssea. Por outro lado a OPG, que é produzida pelos osteoblastos, tem como função diminuir a reabsorção óssea, pois liga-se ao RANK, impedindo a interação RANK-RANK-L (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003). Além disto, é conhecido que o RANK-L é influenciado pela inflamação sistêmica (HARDY; COOPER, 2009). De fato, células inflamatórias expressam o RANK-L e produzem citocinas inflamatórias (TNF α e interleucinas) as

quais estimulam a reabsorção óssea, independente dos osteoblastos. Em contraste, não ocorre aumento da formação óssea, o qual pode ser explicado pela inibição da diferenciação dos osteoblastos causada pelo TNF- α (GILBERT *et al.*, 2000) e também por um aumento da secreção autócrina do cortisol nos osteoblastos, diminuindo a sua função (HOFBAUER *et al.*, 1999).

Marcadores bioquímicos da remodelação óssea podem ser medidos no sangue ou na urina com o objetivo de avaliar formação e reabsorção óssea pela dosagem de substâncias que são liberadas durante a remodelação (GARNERO; DELMAS, 1997). São exemplos de marcadores bioquímicos de formação óssea: osteocalcina, fosfatase alcalina específica do osso e pró peptídeos colágeno tipo I N- e C-terminal (P1NP and P1CP). Os marcadores de reabsorção por sua vez são: peptídeos do colágeno tipo I, N e C terminal, peptídeo tipo I C terminal gerado pelas metaloproteinase, deoxipiridinolina ou a isoforma 5B do TRACP.

A osteoporose é tradicionalmente classificada como primária ou secundária. O termo osteoporose primária aplica-se à perda óssea associada ao processo de envelhecimento e, nas mulheres, as perdas adicionais relacionados à menopausa. A osteoporose pós-menopausa é caracterizada por uma diminuição progressiva da massa óssea que começa na menopausa devido à deficiência de estrógeno e de seu efeito anti-reabsorptivo. A osteoporose secundária por sua vez, é causada ou agravada pela exposição a outras doenças ou medicações (STEIN; SHANE, 2003). Neste caso, dependendo da idade em que o processo é iniciado, pode ocorrer a aquisição de um baixo pico de massa óssea em crianças e adolescentes ou perda óssea em adultos. A DPOC e uso de GS fazem parte da lista de doenças e medicamentos que reconhecidamente tem efeitos deletérios sobre o esqueleto (JØRGENSEN *et al.*, 2007). O tabagismo é um fator de risco importante para o desenvolvimento de osteoporose e fragilidade óssea (OLOFSSON *et al.*, 2005; KANIS *et al.*, 2005). A osteoporose é clinicamente definida pela presença de uma fratura atraumática. O diagnóstico é realizado pelo exame de densitometria óssea na coluna lombar, fêmur ou no rádio. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a osteoporose é diagnosticada quando o escore T for igual ou inferior a -2,5 desvios-padrão (DP) (KANIS *et al.*, 1994). O escore Z é usado em jovens e mulheres na pré menopausa e indica baixa massa óssea quando for inferior ou igual a -2,0. A DMO também é importante por sua correlação com risco de fraturas. Para cada DP abaixo do normal, o risco relativo de

fratura aumenta 1,5 a 3 vezes (MARSHALL; JOHNELL; WEDEL, 1996). No entanto, além da DMO, outros fatores contribuem para a força óssea e influenciam o risco de fraturas, tais como microarquitetura, composição da matriz mineral, grau de mineralização, acúmulo de microdanos e a remodelação óssea (SEEMAN; DELMAS, 2006). Além disto, fatores clínicos como história pessoal ou familiar de fratura, utilização de GS, artrite reumatoide, tabagismo, baixo IMC e maior ingestão de álcool foram associados a fraturas em estudos epidemiológicos (KANIS *et al.*, 2005; PINHEIRO *et al.*, 2009).

3.3 DPOC E OSTEOPOROSE

A incidência e prevalência de osteoporose em pacientes com DPOC ainda não foram determinadas em estudos epidemiológicos com grande número de pacientes. As informações sobre a frequência de osteoporose associada à DPOC originam-se principalmente de estudos pequenos em pacientes que fazem uso crônico de GS. Graat-Verboom e colaboradores (2009) realizaram uma revisão sistemática da literatura com objetivo de avaliar a prevalência de osteoporose na DPOC e sobre os fatores mais frequentes que correlacionam estas duas doenças. Treze artigos foram selecionados, totalizando 775 pacientes com a prevalência média de osteoporose de 35,1%, o qual variou entre 9 e 69%, na dependência da população estudada e do método usado para diagnosticar osteoporose. A prevalência média de osteopenia foi 38,4%, variando entre 27 e 67% em 8 estudos analisados. Entre os fatores que correlacionaram osteoporose e DPOC, os mais frequentes foram a composição corporal, uso de glicocorticoides e gravidade da doença pulmonar. Este último fator, a gravidade da DPOC, também correlacionou-se significativamente com a presença de osteoporose em nosso estudo transversal com 49 pacientes com DPOC e sem uso de GS (FRANCO *et al.*, 2009). Esses achados tem sido corroborado por outros estudos que também correlacionaram a osteoporose com baixo IMC e menor quantidade de massa magra (VRIEZE *et al.*, 2007; BOLTON *et al.*, 2004).

Pacientes com DPOC apresentam risco maior para fraturas osteoporóticas, principalmente de corpos vertebrais. No estudo italiano EOLO que avaliou 2.981 pacientes

com idade superior a 50 anos, a prevalência de uma ou mais fraturas vertebrais foi de 41,7% em homens e 41,2% em mulheres, sendo observada uma alta correlação entre a gravidade da DPOC e a presença de fraturas, principalmente em homens (NUTI *et al.*, 2009). Análise de regressão logística demonstrou que idade, história de fratura prévia, baixo IMC e uso de GC foram fatores preditores das fraturas. Além disso, a gravidade da DPOC foi altamente correlacionada com a prevalência de múltiplas fraturas em ambos os sexos. Estes achados confirmam os resultados dos estudos menores em relação a prevalência de fraturas e a sua associação com a gravidade da DPOC (PAPAIOANNOU *et al.*, 2003, VESTERGAARD *et al.*, 2007). Neste sentido, fatores relacionados com a gravidade da doença pulmonar como hipoxemia/hipercapnia e a presença de citocinas pró-inflamatórias podem justificar estes achados. Em um estudo em homens com DPOC uma correlação significativa entre o marcador de reabsorção, telepeptídeo do colágeno tipo I (ICTP), e PaCO₂ foi observada (DIMAI *et al.*, 2001). Além disto, os pacientes com hipercapnia (PaCO₂ > 45mm Hg; n=35) apresentaram uma menor DMO em relação aos que apresentaram eucapnia (PaCO₂ = 35-45mm Hg; n=36), sendo sugerido que a perda óssea na DPOC pode ser parcialmente atribuída ao aumento da reabsorção óssea associado ao aumento da PaCO₂. Por outro lado, Førlí e colaboradores (2008) sugeriram que a inflamação da DPOC se associa com aumento da reabsorção óssea baseado na correlação positiva entre marcadores de reabsorção óssea e a expressão do receptor do TNF α que eles encontraram num grupo de pacientes com DPOC aguardando transplante pulmonar.

3.3.1 Fatores contribuintes para osteoporose na DPOC

Tabagismo

A nicotina é considerada um dos componentes mais tóxicos do cigarro. Estudos *in vitro* mostraram que a nicotina inibe a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos bem como a função osteoblástica (NAKAYAMA *et al.*, 2008). Em contrapartida, alguns estudos demonstraram que a nicotina aumenta a proliferação de osteoblastos em animais e seres humanos (KAMER *et al.*, 2006). Estes resultados contraditórios podem ser explicados pelas diferenças nas concentrações séricas de nicotina (FANG *et al.*,

1991); em concentrações altas (>1mmol/L) a nicotina exerce uma ação anti-proliferativa sobre os osteoblastos, ao passo que em concentrações mais baixas (0,01-10 micromol/L) ela tem um efeito estimulatório (WALKER *et al.*, 2001). A nicotina também pode induzir a secreção de citocinas pelos osteoblastos, incluindo IL-6 e TNF (KAMER *et al.*, 2006). Os hormônios calciotrópicos, como o PTH e a calcitonina, também podem ser afetados pela nicotina. Estudos em animais demonstraram que existe aumento da concentração de PTH e diminuição de calcitonina na vigência de altas concentrações de nicotina (IWANIEC *et al.*, 2001).

O tabagismo se associa com aumento dos hormônios adrenais e redução dos hormônios esteroides (HAUTANEN *et al.*, 1993; SUPERVIA *et al.*, 2006). A diminuição dos níveis séricos de estrogênio nos fumantes pode ser explicada por diversos mecanismos. O fumo induz a degradação hepática do estradiol, levando a um aumento da proteína ligadora dos hormônios sexuais (SHBG) e conseqüente diminuição de estrogênio biologicamente ativo (DANIEL; MARTIN; FAIMAN, 1992). Ele também pode provocar redução na aromatização do estrogênio (MICHNOVICZ *et al.*, 1986) e diminuição da sua disponibilidade (MEEK; FINCH, 1999). Esses efeitos podem resultar em menopausa precoce (JICK; PORTER, 1977; McKINLAY; BIFANO; McKINLAY, 1985) ou em resposta diminuída à terapia hormonal nas mulheres fumantes (KOMULAINEN *et al.*, 2000). O tabagismo é um fator de risco independente para osteoporose tanto nos homens como nas mulheres. Existe uma alta prevalência de fraturas e baixa DMO entre os fumantes (LAW; HACKSHAW, 1997; KANIS *et al.*, 2005; OLOFSSON *et al.*, 2005). Uma meta-análise demonstrou um efeito negativo dose dependente do cigarro sobre a massa óssea, sendo mais importante nos fumantes quando comparados com ex-tabagistas (WARD; KLESGES, 2001). Outra meta-análise demonstrou uma associação entre tabagismo e risco de fraturas, sendo maior para fratura de quadril (VESTERGAARD; MOSEKILDE, 2003; KANIS *et al.*, 2005). Similarmente, o estudo BRAZOs demonstrou que o tabagismo é um fator de risco importante para a ocorrência de fraturas osteoporóticas em uma amostra representativa de homens e mulheres no Brasil (PINHEIRO *et al.*, 2009). Estes resultados sugerem que o tabagismo interfere na qualidade e na microestrutura óssea. De acordo, um estudo realizado com 1068 homens mostrou que os indivíduos tabagistas apresentavam uma menor espessura cortical na tomografia quantitativa computadorizada periférica (pQCT) em comparação com os não tabagistas (LORENTZON *et al.*, 2007).

Vitamina D

A vitamina D desempenha um papel vital na mineralização óssea e no metabolismo do cálcio e do fósforo (HOLICK, 2006). Ela é considerada um pró-hormônio esteroide com duas formas moleculares: vitamina D3 (colecalfiferol) e vitamina D2 (ergocalciferol). A principal fonte de vitamina D é endógena, sendo sua produção estimulada pela exposição solar, com menores quantidades sendo obtidas em alguns alimentos, como peixes oleosos (por exemplo, salmão) e óleos de peixe, incluindo o óleo de fígado de bacalhau (CHEN *et al.*, 2007). Durante exposição à luz solar, o 7-deidrocolesterol (DHC-7) é convertido em pré-vitamina D3 (preD3) na pele e esta, em seguida, é transformada em vitamina D3. A vitamina D (D representa D2 ou D3) sintetizada na pele ou ingerida na dieta é convertida pela enzima vitamina D-25-hidroxilase (25-OHase) em 25-hidroxivitamina D [25 (OH) D]. Esta, por sua vez, é convertida nos rins pela ação da 25-hidroxivitamina D1-hidroxilase (1-OHase) em sua forma biologicamente ativa, que é a 1,25-dihidroxivitamina D (1,25(OH)₂D ou calcitriol). O calcitriol aumenta a absorção intestinal de cálcio, e estimula a atividade osteoclástica (DELUCA, 2004). Esta última ação ocorre por ação do calcitriol sobre seu receptor nos osteoblastos, o que provoca aumento na expressão do receptor ativador de ligante NFkappaB (RANKL).

A vitamina D apresenta várias funções não esqueléticas, incluindo efeitos anti-proliferativos e de modulação (NAGPAL; NA; RATHNACHALAM, 2005). Inúmeras ações da vitamina D que podem ser relevantes na fisiopatologia de doenças respiratórias, como a inibição da formação das metilproteinases da matriz, proliferação dos fibroblastos e síntese de colágeno (DOBAK *et al.*, 1994). Além disso, receptores de vitamina D estão presentes no músculo esquelético e fraqueza muscular e aumento do risco de quedas tem sido associados com deficiência de vitamina D (BISCHOFF-FERRARI *et al.*, 2004). Uma eventual deficiência de vitamina D poderia, assim, ser um fator agravante em pacientes com DPOC, pela potencial piora da função pulmonar e maior comprometimento da função dos músculos respiratórios. Um estudo epidemiológico encontrou uma importante correlação entre os níveis séricos de 25OHD e VEF₁, mesmo após um ajuste para a atividade física, idade, história de tabagismo, IMC e ingestão de vitamina D (BLACK; SCRAGG, 2005). Outra potencial ação da vitamina D é no sistema imunológico por uma mediação da imunidade inata (GINDE *et al.*, 2009). A vitamina D apresenta ação moduladora na função da célula T e produção de

interleucina 10 (IL-10) e aumenta a expressão do peptídeo antimicrobiano catelicidina que é importante na defesa do hospedeiro contra a infecção do trato respiratório. Clinicamente, alguns autores demonstraram risco maior de infecção respiratória em indivíduos com níveis séricos de vitamina D menor do que 10 ng/mL comparados aqueles com níveis maiores que 30 ng/mL (GINDE, MANSBACH; CAMARGO JR., 2009). Além disto, estudos recentes com pacientes asmáticos têm observado uma associação entre baixas concentrações de vitamina D e piora da função pulmonar, aumento da hiperresponsividade das vias aéreas e maior necessidade de glicocorticoide (SUTHERLAND *et al.*, 2010; SEARING *et al.*, 2010, BREHM *et al.*, 2010).

A 25OHD é a forma circulante principal da vitamina D, com meia vida de 2 a 3 semanas. A maioria dos estudos define que uma concentração sérica de 25OHD igual ou menor que 50nmol/L (20ng/mL) é indicativa de deficiência de vitamina D, entre 51–74nmol/L (21–29ng/mL) indica insuficiência de vitamina D e concentrações maiores que 75nmol/L (30ng/mL) são adequadas (MALABANAN; VERONIKIS; HOLICK, 1998; HOLICK, 2007). Em adultos a deficiência de vitamina D pode levar à diminuição da massa óssea, aumentar o risco de fraturas osteoporóticas (LARSEN; MOSEKILDE; FOLDSPANG, 2004), e provocar defeito de mineralização (HOLICK, 2007). A deficiência de vitamina D é muito prevalente em todo o mundo (ERKAL *et al.*, 2006; HOLICK, 2007; HOLICK *et al.*, 2005). Na cidade de São Paulo há uma alta prevalência de insuficiência de vitamina D em idosos, atingindo percentuais de 43% naqueles avaliados em ambulatórios e 71% nos avaliados em asilos e instituições similares (SARAIVA *et al.*, 2007). Poucos estudos avaliaram as concentrações séricas de vitamina D em pacientes com DPOC (RIANCHO; ZARRABEITIA; GONZÁLEZ MARCÍAS, 1987; FØRLI *et al.*, 2004; DIMAI *et al.*, 2001; FRANCO *et al.*, 2009). Alguns demonstram que estes pacientes apresentam menores níveis de 25OHD, o qual poderia ser explicado em parte, pela diminuição da atividade física e exposição solar, que frequentemente acompanham estes pacientes. Em nossos pacientes com DPOC grave, encontramos uma correlação entre as concentrações séricas de 25OHD e saturação de oxigênio, sugerindo que a 25OHD pode ser um marcador da gravidade da doença pulmonar (FRANCO *et al.*, 2009).

Glicocorticoide

Embora os benefícios do uso crônico de GS e GI sobre a função pulmonar no tratamento da DPOC seja bastante controverso, o uso terapêutico destas medicações é bastante frequente na prática clínica. A principal indicação atual dos glicocorticoides é nos pacientes gravemente enfermos que apresentam maior tendência a exacerbações da DPOC (JARAD *et al.*, 1999; FROMER; COOPER, 2008). O uso crônico do GS é um fator de risco para osteoporose e fraturas em pacientes com DPOC, como também em outras doenças crônicas (McEVOY *et al.*, 1998; NUTI *et al.*, 2009). Pacientes que recebem dose alta de GS podem apresentar uma perda rápida da DMO em um período de 6 meses e podem apresentar fraturas por fragilidade, independente da DMO (SHANE *et al.*, 1997; PEARCE *et al.*, 1998). Existem vários mecanismos que explicam este efeito deletério rápido dos glicocorticoides sobre o esqueleto (CANALIS, 1996). O principal é na redução da formação óssea devido ao efeito direto sobre os osteoblastos (DEMPSTER, 1989). Adicionalmente, ocorre redução da absorção e aumento da excreção de cálcio, que resulta em hiperparatireoidismo secundário, que por sua vez ativa os osteoclastos e leva a aumento precoce e transitório na reabsorção óssea. O papel dos GI na redução da DMO e no risco de fraturas é controverso. Em geral, alterações nos marcadores da remodelação óssea como a osteocalcina observadas com GI são menores do que aquelas vistas com o GS, sugerindo um efeito mais brando do GI sobre o metabolismo ósseo (JOHNELL *et al.*, 2002). Uma meta-análise realizada em 1999 avaliou o efeito do GI em pacientes asmáticos e concluiu que apenas doses acima de 1,5mcg/dia (0,75mg/dia para propionato de fluticasona) resultavam em uma redução significativa da DMO (LIPWORTH, 1999). Posteriormente, vários estudos realizados com diferentes doses e tipos de GI, apresentaram conclusões discordantes (LUNG HEALTH STUDY RESEARCH GROUP, 2000; MATSUMOTO *et al.*, 2001; ADAMS; BESTALL; JONES, 2002; JOHNELL *et al.*, 2002; RICHY *et al.*, 2003; HALPERN *et al.*, 2004; SCANLON *et al.*, 2004).

Estudo longitudinal que avaliou 1.671 pacientes com asma e DPOC em uso de GI por um período de 9 anos, concluiu que o uso do GI foi fator de risco independente para fraturas, principalmente em indivíduos expostos a doses diárias superiores a 600mcg (HUBBARD *et al.*, 2006). Em conjunto, os trabalhos indicam que os efeitos deletérios dos GI sobre a massa óssea parecem depender da dose e do período de tempo de tratamento, com considerável susceptibilidade individual.

3.4 HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA

A histomorfometria consiste em um exame histológico de uma biópsia óssea calcificada com o objetivo de obter informação quantitativa sobre a remo-delação e a estrutura óssea (PARFITT, 1983a). Tradicionalmente, a análise é realizada em cortes 2D, porém destinados à determinação de parâmetros 3D, o qual é possível através da teoria da estereologia (PARFITT, 1983b). Esta teoria tem sido uma ferramenta importante e eficiente para muitas aplicações da microscopia, o qual utiliza a geometria probabilística para o cálculo das estimativas. Os avanços mais importantes na histomorfometria óssea ocorreram nas décadas de 50 e 60 do século passado, devido a duas grandes descobertas: o advento da plastificação que permitiu uma alta qualidade dos cortes histológicos do osso mineralizado (FROST, 1958) e o uso de agentes fluorescentes (exemplo: a tetraciclina) como marcadores do tecido ósseo, que se incorpora na frente de mineralização e permite o estudo dinâmico da formação óssea (FROST, 1969). O esquema de uso da tetraciclina varia de acordo com diferentes protocolos, mas em geral ela é administrada em dois turnos separados por um intervalo sem a medicação. A tetraciclina se deposita nos sítios de formação de osso recém-formado, ligando-se irreversivelmente a hidroxiapatita na frente de mineralização. Uma dupla marcação acontece quando a formação óssea em um determinado sítio está acontecendo durante a sequência inteira do uso da tetraciclina. Diferente da marcação simples, a qual acontece quando a formação óssea iniciou após os primeiros dias de uso de tetraciclina ou terminou antes do segundo curso da administração de tetraciclina. Além disto, a marcação simples pode ocorrer quando a formação óssea está muito lenta.

A crista ilíaca é o sítio preferido para biópsia óssea, sendo que o fragmento ideal deve conter as corticais interna e externa com osso trabecular entre elas. A biópsia óssea é um procedimento seguro, bem tolerado e as complicações graves são incomuns. Em uma grande série com 9.131 pacientes biopsiados, somente 64 (0,7%) apresentaram alguma complicação, sendo hematoma e dor local os mais frequentes (RAO, MATKOVIC; DUNCAN, 1980). Após o procedimento, o fragmento ósseo é encaminhado a um laboratório especializado para preparo do material para a análise histomorfométrica.

Os parâmetros histomorfométricos analisados são divididos em duas categorias: estruturais e remodelação, sendo este último dividido em parâmetros estáticos e dinâmicos. A histomorfometria óssea para fins clínicos é tipicamente limitada à análise de osso trabecular, sendo a análise do osso cortical, superfície endocortical e periósteo, mais usada em situações especiais, como no estudo de indivíduos em crescimento (RAUCH; TRAVERS; GLORIEUX, 2006) e na avaliação da resposta a terapias anabólicas (LINDSAY *et al.*, 2007).

Devido às dificuldades práticas na realização das biópsias ósseas em indivíduos normais, existem relativamente poucos estudos que avaliaram a histomorfometria óssea de pessoas saudáveis em diferentes populações (VEDI *et al.*, 1982; RECKER *et al.*, 1988; DOS REIS *et al.*, 2007). Porém todos os estudos mostraram uma alta variabilidade nos parâmetros estruturais e dinâmicos entre indivíduos saudáveis e também entre diferentes tipos raciais (PARISIEN *et al.*, 1997). No Brasil, um estudo histomorfométrico realizado em 125 cadáveres revelou diferenças nos parâmetros estruturais e de remodelação estática entre diferentes idades, raças e sexo (DOS REIS *et al.*, 2007).

Os achados histomorfométricos de mulheres com osteoporose pós-menopausa caracterizam-se por uma redução do volume trabecular, o qual resulta da perda progressiva das trabéculas que provoca diminuição da conectividade óssea (ARLOT *et al.*, 1990; ERIKSEN *et al.*, 1990). Além disto, ocorre frequentemente redução da espessura cortical e trabecularização da superfície endocortical, acompanhada de aumento da remodelação local (GARCIA CARASCO *et al.*, 1989). Entretanto, os índices dinâmicos da remodelação óssea variam muito, sendo difícil estratificar a osteoporose pós-menopausa como de alta, normal ou baixa remodelação (ARLOT *et al.*, 1990; ERIKSEN *et al.*, 1990; GARCIA CARASCO *et al.*, 1989; KIMMEL *et al.*, 1990). Isto se deve ao fato que na maioria dos casos a biópsia óssea é realizada em um estágio avançado da doença, num momento em que as anormalidades do metabolismo ósseo que levaram a redução da massa óssea podem não ser mais evidentes.

3.5 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (μ CT)

A μ CT da biópsia óssea é uma técnica de alta resolução que faz a medida volumétrica do fragmento ósseo em 3D. É um método não destrutivo que possibilita uma medida direta dos parâmetros estruturais, permitindo uma quantificação direta da microarquitetura óssea (MÜLLER *et al.*, 1996; RÜEGSEGGER; KOLLER; MÜLLER, 1996; HILDEBRAND *et al.*, 1999). Esta técnica depende da imagem do raio X em 3D, semelhante à usada na tomografia computadorizada, mas em menor escala e com uma resolução espacial aumentada. A μ CT do material da biópsia óssea pode ser realizada tanto antes, como posteriormente ao preparo do fragmento ósseo. A μ CT tem sido muito usada em estudos clínicos para novas medicações estudadas para o tratamento da osteoporose (FOX *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2007; RECKER *et al.*, 2008; RECKER *et al.*, 2009a; RECKER *et al.*, 2009b). Nenhum estudo avaliou a estrutura óssea através da μ CT em pacientes com DPOC.

4 PACIENTES (SUJEITOS) E MÉTODOS

4.1 PACIENTES

Pacientes com diagnóstico espirométrico de DPOC foram recrutados do Laboratório de Função Pulmonar e do ambulatório de DPOC do Serviço de Pneumologia do Hospital de Clínicas da UFPR, no período entre março de 2006 e junho de 2008. Os critérios de inclusão no estudo foram mulheres na menopausa (amenorreia há mais de 1 ano ou FSH > 40U/L) com idade superior a 45 e inferior a 75 anos, critérios diagnósticos clínicos e espirométricos (GOLD) de DPOC tabágica e diminuição da DMO (Escore T score < -1,5 em qualquer sítio avaliado). Foram excluídas as pacientes com história de uso de glicocorticoide oral por um período consecutivo superior a 3 meses em dose diária maior que 5mg de prednisona ou equivalente (AMERICAN COLLEGE OF REUMATHOLOGY AD HOC COMMITTEE ON GLUCOCOTICOID-INDUCED OSTEOPOROSIS, 2001). Também foram excluídos as pacientes cuja exposição à dose cumulativa de prednisona ou equivalente foi maior ou igual 1000mg por pelo menos 5 anos, período este que o paciente está em acompanhamento no HC (DUBOIS *et al.*, 2002). As pacientes alérgicas à tetraciclina, aquelas com doenças ou em uso de medicações que afetam o metabolismo ósseo, incluindo hiperparatireoidismo, hipertireoidismo, doença inflamatória intestinal, insuficiência renal crônica, doença hepática, diabetes mellitus tipo 1, uso de drogas antiepilépticas, análogos do LHRH, bisfosfonatos, teriparatida, ranelato de estrôncio, e moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERMs) foram excluídas. As pacientes com antecedentes de terapia estrogênica e que pararam tratamento há pelo menos 2 anos antes da biópsia óssea foram permitidas a participarem do estudo. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC da UFPR, e todas as pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (em anexo).

4.2 CONTROLES

4.2.1 Controles da histomorfometria

Trinta e três biópsias ósseas de mulheres caucasianas menopausadas saudáveis foram usadas como controle para parâmetros estáticos e dinâmicos de histomorfometria óssea (RECKER *et al.*, 1988). Estas mulheres foram selecionadas na cidade de Omaha NE (EUA) após uma história clínica, exame físico e avaliação bioquímica (multicanal) normais. Excluíram-se as mulheres que apresentavam fratura patológica, DPOC, neoplasia maligna, insuficiência renal crônica, acidose tubular renal, falência cardíaca congestiva, cirrose hepática, doença gastrointestinal ou doenças que fazem hipo ou hiperatividade das glândulas adrenais, tireoide e paratireoide. Além disto, o uso de qualquer medicação com potencial interferência sobre o metabolismo ósseo nos últimos 2 anos também foi considerado critério de exclusão. Todas as mulheres selecionadas receberam duas doses de tetraciclina antes da biópsia conforme o seguinte esquema: Tetraciclina 250mg 4 vezes ao dia por 3 dias (marcação 1), seguido de um período de 14 dias sem medicação, e mais 3 dias de tetraciclina na mesma dose (marcação 2). Este estudo foi realizado entre os anos de 1985-1987, sendo os blocos das biópsias não mais existentes, entretanto cortes histológicos provenientes de duas regiões distintas do bloco (separadas por 200 μ) estavam disponíveis para análise. Destes cortes, utilizamos os cortes corados com Tricrômico de Goldner e cortes não corados para a realização da análise das marcações com tetraciclina.

4.2.2 Controles da microtomografia computadorizada

Treze blocos contendo fragmento ósseo de um estudo realizado em cadáveres de mulheres na menopausa provenientes de São Paulo e região metropolitana, cujo fragmento ósseo foi retirado juntamente com a necrópsia foram usados como controles para a μ CT (DOS REIS *et al.*, 2007). Neste estudo com 119 indivíduos, 56

eram do sexo feminino, sendo 16 com idade superior a 50 anos. A maioria foi vítima de morte violenta e as outras causas foram infarto do miocárdio (30%), hemorragia intracraniana (5%) e em 3% dos casos a causa de morte não foi determinada. No momento em que a família autorizou a necrópsia, uma história médica detalhada foi obtida, excluindo aquelas que tinham antecedentes de doença gastrointestinal, cirurgia de intestino, doença hepática, doença renal, doença óssea metabólica, antecedentes de imobilização prolongada e uso de medicações que interferissem no metabolismo ósseo. De 16 blocos com fragmentos ósseos de mulheres que estavam na menopausa no momento da morte, 13 estavam em condições para μ CT e foram enviados ao Laboratório de Bioengenharia Óssea do Departamento de Engenharia Biomédica da Universidade Columbia.

4.3 PROTOCOLO DE ESTUDO

Neste estudo transversal, inicialmente os prontuários médicos de mulheres na menopausa com diagnóstico espirométrico de DPOC foram avaliados com objetivo de afastar outras causas secundárias de osteoporose. Na sequência, as pacientes cujas informações médicas disponíveis não demonstraram outras causas de osteoporose, foram convocadas para uma visita na Unidade de Metabolismo Ósseo do SEMPR, onde foram orientadas quanto ao protocolo de estudo e ao procedimento da biópsia e apresentadas ao TCLE. Em seguida, leram e assinaram o TCLE, foram submetidas à anamnese, exame físico, coleta de sangue, densitometria óssea e um questionário que avaliou:

- Idade e tempo de menopausa.
- Tempo de diagnóstico do DPOC.
- Antecedentes de fratura por fragilidade durante a vida adulta e uso de medicações (passado e presente).
- História de tabagismo presente ou passada e exposição cumulativa (número de maços de cigarros ao dia e por ano de tabagismo). Pacientes que pararam o tabagismo em um período inferior a seis meses, foram considerados como fumantes.

Além disto, na revisão cuidadosa nos prontuários foi identificado uso de GS e glicocorticoide inalatório (GI), bem como as doses e tempo de uso dos mesmos. Em relação o GS, as doses usadas durante exacerbações foram quantificadas pelo cálculo da dose cumulativa por período médio de 5 anos, multiplicando-se a dose diária (equivalente a prednisona) pelo número de dias utilizados. O único GI inalatório usado pelas pacientes foi a budesonida em doses diárias de 400mcg (1 dose diária) ou 800mcg.

4.3.1 Teste de função pulmonar

Todas as pacientes selecionadas tinham pelo menos um exame de espirometria prévio realizado no Laboratório de Função Pulmonar do Hospital de Clínicas da UFPR, conforme recomendações da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (SBPT) (PEREIRA; NEDES, 2002). Estes exames utilizam o aparelho *Survey Plus* (Collins Medical, Louisville, KY, USA), o protocolo e os valores de referência estabelecidos por *Knudson 76* para avaliação dos desvios da normalidade (KNUDSON; BURROWS; LEBOWITZ, 1976). Neste estudo, foram considerados os resultados do FEV₁, previsto e a razão FEV₁/FVC para o diagnóstico de DPOC quando a razão VEF₁/CVF pós-broncodilatador (salbutamol 400mcg) fosse menor que 0,7 (PEREIRA; NEDES, 2002). As pacientes com DPOC foram classificadas de acordo com a gravidade da obstrução pulmonar estabelecida por valores de VEF₁ e a presença de sintomas clínicos, seguindo os critérios de GOLD (RABE *et al.*, 2007).

- Estágio I - DPOC leve com ou sem sintomas de tosse e expectoração. A relação VEF₁/CVF pós-broncodilatador é menor que 70% e VEF₁ é maior ou igual 80%.
- Estágio II - DPOC moderada, com VEF₁ entre 50-80%. Em geral ocorre dispneia ao exercício e a maioria dos pacientes procura auxílio médico nesta fase.
- Estágio III - DPOC grave, com VEF₁ entre 30-50%. Nesta fase as exacerbações da doença são frequentes e com um decréscimo da qualidade de vida.

- Estágio IV - DPOC muito grave. Esta fase caracteriza-se por $VEF_1 < 30\%$ ou insuficiência respiratória crônica, ou seja, pressão arterial parcial de oxigênio (PaO_2) $< 60\text{mmHg}$ com ou sem pressão parcial de gás carbônico ($PaCO_2$) arterial $> 50\text{mmHg}$ ou insuficiência cardíaca direita (cor pulmonale).

4.3.2 Densidade mineral óssea (DMO)

A DMO foi avaliada pela medida de absorção de raio-x de dupla energia (DXA) com o equipamento Hologic QDRW 1000 (Hologic, Bedford, MA, USA) na Unidade de Metabolismo Ósseo do SEMPR. As regiões avaliadas foram coluna lombar (CL), colo de fêmur, e fêmur total. Pacientes com T score $< -1,5$ em qualquer sítio foram selecionadas para o presente estudo.

4.3.3 Exames laboratoriais

Os seguintes exames foram realizados na visita inicial das pacientes, com exceção da gasometria que foi colhida no momento da biópsia óssea:

- Cálcio total, [valor de referência (VR) 9 a 10,8 mg/dL]; fósforo, VR 2,5 a 4,8mg/dL; albumina, VR 3,4 a 4,8g/dL; fosfatase alcalina, VR 64 a 300U/L; e creatinina, VR 0,6 a 1,22mg/dLI.
- Estas dosagens foram realizadas no Laboratório Central do HC-UFPR, Setor de Bioquímica, no aparelho ADVIA650 (Bayer, Leverkusen, Alemanha). Para gasometria arterial usou-se o analisador de gás sanguíneo pH348 (Bayer, Leverkusen, Alemanha), com os seguintes VR: pH 7,33 a 7,43; pO_2 80 a 100mmHg; pCO_2 32 a 50 mmHg; bicarbonato 23 a 27mmol/L; e saturação de $O_2 > 95\%$.
- A dosagem do PTH molécula intacta foi realizada no Laboratório Central do HC-UFPR, Setor de Hormônios, por quimioluminescência (DPC, Immulite 2000, Los Angeles, EUA) com VR de 12 a 65pg/ml.

- A dosagem de 25OH D foi realizada em duplicata por radioimunoensaio (DiaSorin Stillwater, Minnesota, EUA) no Laboratório Álvaro (Cascavel, PR) no final do estudo. O coeficiente de variação intra-ensaio, de acordo com especificações do fabricante é menor do que 12,9 % para faixas de concentração entre 7,2 – 128 ng/ml. Níveis de 25OH D igual ou superior a 30ng/mL (75nmol/L) foram considerados como suficiência de vitamina D, entre 21 e 29ng/mL (52 to 72nmol/L) como insuficiência de vitamina D e inferiores a 20ng/mL (50nmol/L), como deficiência (HOLICK, 2007).

4.3.4 Biópsia óssea

Aproximadamente 1 semana após a primeira visita, os exames laboratoriais estavam prontos, com exceção da determinação de 25OHD. As pacientes que não apresentaram nenhuma alteração laboratorial foram selecionadas para biópsia. Nestas pacientes, coleta de sangue para dosagem de exames pré operatório como hemograma, coagulograma e glicemia foi realizado. As pacientes foram então chamadas para uma segunda visita, onde foram devidamente orientadas quanto ao uso de tetraciclina seguindo o seguinte esquema (3:10:3): tetraciclina 500mg duas vezes ao dia por 3 dias (marcação 1), seguido por um período sem tetraciclina de 10 dias e após mais 3 dias de tetraciclina na mesma dose inicial (marcação 2), sendo as biópsias realizadas no terceiro dia após a última dose de tetraciclina. Durante o período de uso de tetraciclina, contato telefônico foi realizado para certificar que as pacientes estavam tomando a medicação adequadamente. Todas as biópsias foram realizadas no Centro Cirúrgico do HC-UFPR, em condições estéreis, com as pacientes previamente sedadas com uma injeção IM de 5mg de midazolam administrada 30 minutos antes do procedimento. As biópsias foram feitas na crista ilíaca a 2cm posterior e inferior da espinha ilíaca ântero-superior. Inicialmente, com a paciente em decúbio dorsal, procedia-se a assepsia da região ilíaca com álcool iodado, colocando-se, em seguida, sobre a região um campo cirúrgico fenestrado. Após anestesia local de todos os planos, pele, subcutâneo e periósteo externo e interno com lidocaína 2% (10 a 20ml), procedia-se incisão de 3cm na pele, seguido de divulsão do subcutâneo

e músculo, dirigindo-se ao periósteo até criar um pertuito entre a pele e o periósteo externo. Neste pertuito foi introduzido a trefina de *Bordier* com diâmetro interno de 7,5mm e com seus bordos serrilhados fixando-se ao periósteo externo. Em seguida, conectamos a porção distal da trefina a um drill elétrico (Gauthier Medical, Rochester, MN, EUA), o qual propiciou o avanço da trefina lentamente através do tecido ósseo até atingir o osso cortical interno (Figura 1). Após esta transfixação do osso ilíaco, a trefina é retirada e o fragmento ósseo é desprendido do lúmen da trefina e imediatamente fixado em etanol a 70%. Após extração do fragmento fazia-se compressão hemostática com gaze durante 10 minutos e em seguida, sutura da pele com fio mononylon 3.0, e curativo compressivo local. As pacientes eram orientadas a ficar em decúbito lateral por 2 horas e após eram liberadas para casa com a orientação de restrição da atividade física durante as próximas 48 horas e uso de analgésicos, se necessário. Todas as pacientes retornaram 7 dias após a biópsia para retirada dos pontos e avaliação da cicatriz.



FIGURA 1 - BIÓPSIA ÓSSEA USANDO A TREFINA CONECTADA AO DRILL

4.3.5 Preparação do material da biópsia óssea

Os fragmentos das biópsias eram encaminhados para o Laboratório de Fisiologia Renal da Disciplina de Nefrologia da Universidade de São Paulo no mesmo dia do procedimento, via correio. Os fragmentos permaneciam em frascos inicialmente com etanol 70% por 3 dias (fixação), seguido por 3-5 dias em etanol 100% (desidratação) e depois em tolueno (clareamento) por 1 dia. Após, os fragmentos eram embebidos por 3 dias em 3 diferentes soluções contendo metilmetacrilato: solução I 25% de dibutilftlato/75% de metilmeacrilato; solução II 25% de dibutilftlato/75% metilmetacrilato + 1g de peróxido de benzoíla (1%); solução III 25% de dibutilftlato/75% metilmetacrilato + 2g peróxido de benzoíla (2%). Posteriormente, os fragmentos – ainda dentro dos vidros – eram colocados em uma estufa a 37°C por 24 horas, até a total polimerização do metacrilato. O frasco era então quebrado, formando com o auxílio de uma serra, um bloco retangular, que era lixado na sequência.

4.3.6 Microtomografia computadorizada

Após os fragmentos ósseos serem devidamente processados, os blocos foram enviados, seguindo normas da ANVISA, ao Laboratório de Bioengenharia Óssea do Departamento de Engenharia Biomédica da Universidade Columbia, em Nova York, EUA, para a realização das μ CT. Neste laboratório foram escaneados os blocos das biópsias das pacientes com DPOC e também dos controles pelo mesmo investigador, usando o aparelho de μ CT VivaCT 40 μ CT *imaging system* (Scanco Medical, Bassersdorf, Suíça) com resolução de 21 μ m. Após o escaneamento de cada bloco, uma imagem do fragmento ósseo foi reconstituída em 3D e as traves ósseas separadas da medula óssea usando a técnica de Gaussian e um limiar padronizado (KIM *et al.*, 2007). Na imagem disponível no computador, é adicionado um volume cilíndrico de interesse (VOI) medindo 1 x 0,5cm no centro do compartimento do osso trabecular. Posteriormente, este VOI é extraído e submetido a uma análise morfológica 3D que é modelo-independente. Baseado na imagem óssea trabecular limitada, a fração do volume ósseo (BV/TV) foi determinada dividindo o volume ósseo (BV) pelo volume total (TV)

de interesse. A espessura trabecular ($Tb.Th^*$) foi avaliada através de uma transformação a distância da imagem das traves ósseas em 3D e então determinada pela média do diâmetro do máximo de esferas que se enquadram dentro do tecido ósseo (HILDEBRAND *et al.*, 1999). O espaço trabecular ($Tb.Sp^*$) foi medido em um modelo similar, onde a transformação a distância foi aplicada ao espaço da medula óssea e não da imagem das traves ósseas. O número trabecular ($Tb.N^*$) foi determinado medindo o inverso da distância média entre as trabéculas ósseas. Além disto, a razão entre a superfície e o volume ósseo (BS/BV), o índice de modelo estrutural (SMI), a conectividade (Conn.D), a densidade mineral do tecido (TMD) e o grau de anisotropia (DA) foram também avaliados para cada imagem de osso trabecular. BS/BV foi calculada através da divisão da superfície óssea (BS) pelo volume ósseo trabecular (BV), com BS e BV determinados por uma abordagem de triangulação (MÜLLER; HILDEBRAND; RÜEGSEGGGER, 1994). O SMI estima a média da proporção de trabéculas longas e trabéculas curtas do osso trabecular (CHAPMAN *et al.*, 2006); o valor de SMI varia de 0 para uma estrutura com predomínio de trabéculas longas até 3 quando houver somente trabéculas curtas. A conectividade trabecular (Conn.D) é calculada pelo número de trabéculas que se conectam e o número de trabéculas isoladas no osso trabecular (ODGAARD; GUNDERSEN, 1993). A densidade mineral do tecido (TMD) é o conteúdo mineral do tecido ósseo dividido pelo volume ósseo. Isto reflete o grau de mineralização da matriz óssea do fragmento ósseo avaliado. Para mensurar a TMD, os valores de atenuação da μ CT foram inicialmente convertidos em densidade de hidroxapatita ($mg\ HA/cm^3$), através de uma conversão linear calibrada por um *phantom*. O grau de anisotropia refere-se a direção das trabéculas, sendo estas verticais ou horizontais. Todas as análises foram realizadas usando o programa padronizado para análise morfológica em HP AlphaStation do sistema da VivaCT 40 (SCANCO Medical AG, Bassersdorf, Suíça).

4.3.7 Microtomia e coloração

Após os exames da μ CT, os blocos das biópsias ósseas foram levados ao Laboratório de Histomorfometria Óssea do *Regional Bone Center* do Hospital Helen Hayes e cortes histológicos foram realizados usando o micrótomo de *Reichert-Jung Polycut* equipado com navalhas de tungstênio (Figura 2). Os cortes foram realizados paralelos ao eixo longitudinal do núcleo da biópsia. Dois grupos de cortes histológicos foram obtidos, sendo a distância entre eles de 300 μ m. Os cortes foram feitos em duas espessuras distintas: 20 μ m para a visualização da tetraciclina fluorescente sob a luz ultravioleta e 7 μ m para a análise da morfologia. Os cortes com 7 μ m de espessura foram corados com a técnica de Tricromio de Goldner (Figura 3).



FIGURA 2 - BLOCO DA BIÓPSIA SENDO CORTADO NO MICRÓTOMO

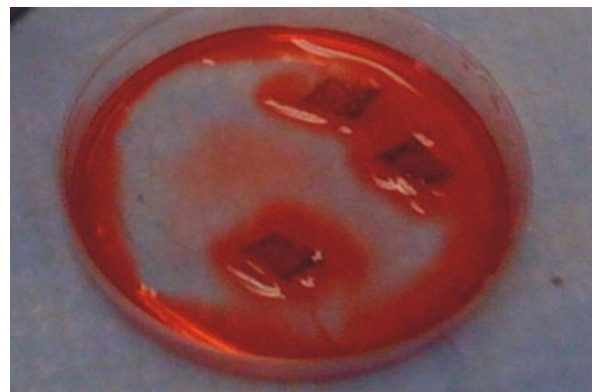


FIGURA 3 - CORTES SENDO CORADOS COM TRICRÔMICO DE GOLDNER

4.3.8 Histomorfometria óssea

A histomorfometria óssea de pacientes e controles foram realizados pelo mesmo investigador usando o microscópio (Nikon Labophot II) com luz ultravioleta, acoplado a uma câmara colorida de alta resolução digital (Olympus DP71), cursor e uma placa digitalizadora (Drawing board VI). Para análise das imagens foi usado o *software OsteoMeasure*, versão 1.2.0.0 (OsteoMetrics, Inc., Atlanta, GA).

Antes da interpretação das biópsias deste estudo, foram analisados 45 cortes histológicos como forma de treinamento, onde os resultados eram confrontados com

os resultados previamente medidos no laboratório de histomorfometria, até se atingir uma correlação altamente significativa entre os laudos.

A histomorfometria do osso trabecular e cortical como também da superfície endocortical foi realizada através da medida dos parâmetros descritos abaixo. Os índices histomorfométricos foram usados de acordo com as recomendações da Sociedade Americana para o Estudo do Metabolismo Ósseo e Mineral (PARFITT *et al.*, 1987). Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- **Volume Ósseo Trabecular (BV/TV, %):** a porcentagem da cavidade de medula ósea que é ocupada por osso trabecular, tanto mineralizado como não mineralizado.
- **Largura das trabéculas (Tb.Wi, em micrômetros):** média da medida transversal das trabéculas ósseas.
- **Número Trabecular (Tb. N):** o número de trabéculas ósseas por mm de tecido.
- **Separação das trabéculas (Tb.Sp.):** distância média entre as trabéculas, em mm.
- **Largura Cortical (Ct. Wi):** a largura média das duas corticais, interna e externa (Figura 4).
- **Superfície Osteoide (OS/BS %):** a porcentagem de superfície óssea coberta por osteoide (osso não mineralizado) (Figura 5).
- **Largura Osteoide (O.Wi):** a largura média das camadas de osteoide, medida em número de lamelas (Figura 5).
- **Superfície Reabsorvida (ES/BS%):** a porcentagem de superfície óssea ocupada por cavidades de reabsorção (lacunas de Howship), com ou sem osteoclasto (Figura 6).

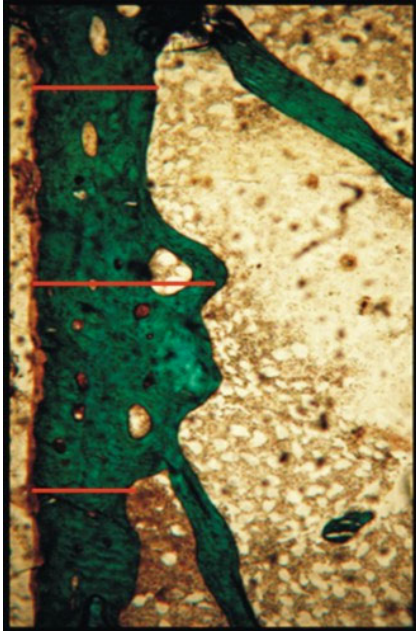


FIGURA 4 - EXEMPLO DE MEDIDA DA LARGURA CORTICAL DA PACIENTE N.º 19

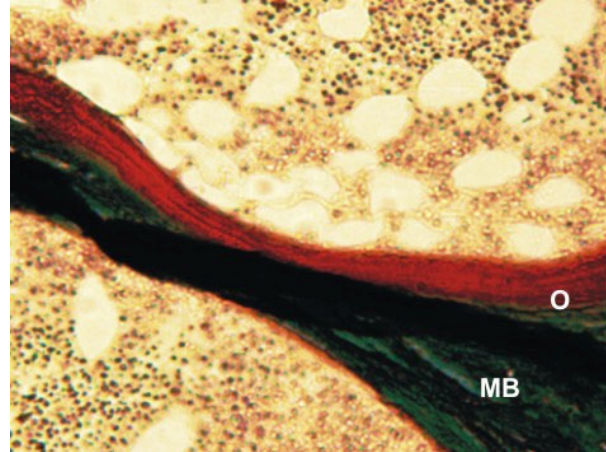


FIGURA 5 - SUPERFÍCIE E LARGUA OSTEOIDE DA PACIENTE N.º 3
NOTA: MB = Osso mineralizado; O = lamelas de osteoide.

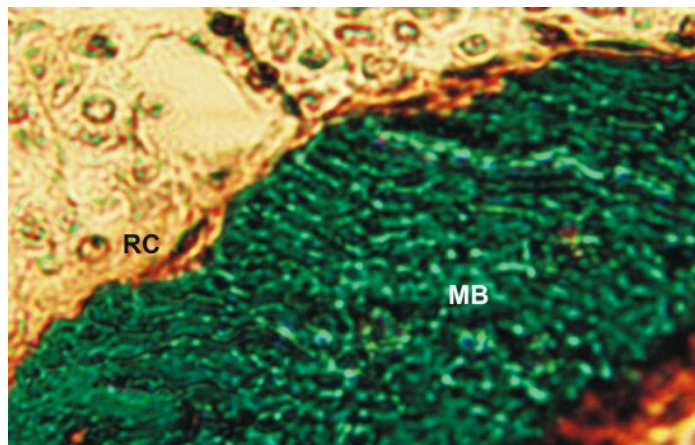


FIGURA 6 - SUPERFÍCIE REABSORVIDA DA PACIENTE N.º 1
NOTA: RC = cavidade de reabsorção; MB = osso mineralizado.

- **Superfície de Mineralização (MS/BS %):** a porcentagem de superfície óssea que contém marcação com tetraciclina e que reflete mineralização ativa (Figura 7). O cálculo é realizado usando a medida de todas as superfícies que contém marcação dupla mais a metade da superfície que contém marcação simples em relação à superfície óssea. Esta medida reflete a proporção de superfície óssea sobre o qual novo osso mineralizado estava sendo depositado durante o período de marcação com tetraciclina.
- **Taxa de Aposição Mineral (MAR):** é a distância entre os bordos de duas marcações por tetraciclina dividida pelos dias decorridos entre as duas

marcações por tetraciclina (medida padronizada neste estudo, 13 dias) em $\mu\text{m}/\text{dia}$ (Figura 8).

- **Taxa de Formação Óssea (BFR/BS):** é a quantidade de osso novo formado por unidade de superfície óssea por unidade de tempo. É calculada multiplicando a superfície de mineralização pela taxa de aposição mineral, em $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$.
- **Taxa de Aposição Óssea Ajustada (Aj.AR):** indica a quantidade de osso novo formado po unidade de superfície de osteoide por unidade de tempo. É calculada através da divisão da taxa de formação óssea pela superfície osteoide, em $\mu\text{m}/\text{dia}$.

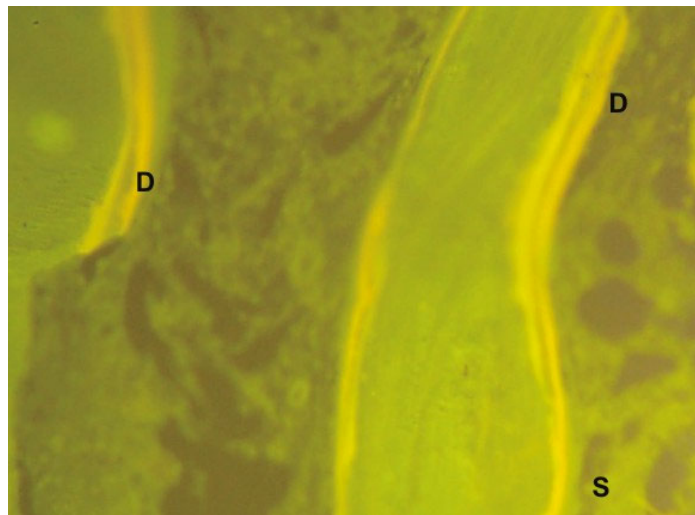


FIGURA 7 - MARCAÇÕES DUPLAS E SIMPLES COM TETRACICLINA DA PACIENTE N.º 1

NOTA: D = marcação dupla; S = marcação simples.

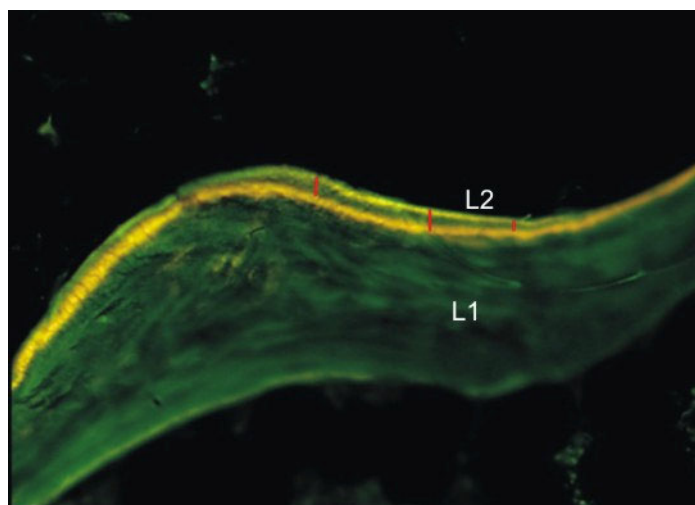


FIGURA 8 - EXEMPLO DA MEDIDA DA TAXA DE APOSIÇÃO MINERAL (MAR)

NOTA: L1 = marcação 1; L2 = marcação 2.

4.3.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa SAS versão 8.2 (SAS Institute, Cary, NC, EUA). As variáveis selecionadas para análise estatística foram inicialmente submetidas aos testes de *Shapiro-Wilk* e de *Kolmogorov-Smirnov*, os quais verificaram a suposição de distribuição simétrica das mesmas. Todas as variáveis contínuas de distribuição simétrica são apresentadas como média \pm DP, enquanto que as variáveis de distribuição assimétrica são apresentadas como mediana e valores mínimo e máximo. Para comparação das médias das variáveis contínuas simétricas de pacientes e controles foi aplicado o teste t de *Student*. Os testes Mann-Whitney U e teste de *Wilcoxon Rank Sum* foram usados para determinar a significância entre variáveis assimétricas. Todas as análises usaram testes bicaudais com nível de significância mínima de 5%. Os coeficientes de correlação de Pearson e *Spearman* foram calculados para avaliar a associação entre variáveis contínuas de distribuição simétrica e assimétrica, respectivamente.

5 RESULTADOS

5.1 SELEÇÃO DAS PACIENTES PARA BIÓPSIA

Noventa e três mulheres na menopausa com diagnóstico de DPOC por espirometria foram avaliadas. Destas, cinquenta e quatro foram excluídas pelos seguintes motivos: uso de GS por um período superior a 3 meses (n=20), outras causas secundárias de osteoporose (n=12), não aceitaram participar do estudo (n=8), apresentavam DPOC não tabágica (n=3), idade superior a 75 anos (n=10), alergia a tetraciclina (n=1). Das 39 pacientes restantes, 9 não apresentaram critério densitométrico para o estudo, 2 já estavam em tratamento para osteoporose com medicação antireabsortiva, uma paciente apresentou diagnóstico de hiperparatireoidismo primário, um tinha insuficiência renal e 6 não aceitaram o procedimento da biópsia. Ao final, 20 pacientes preencheram todos os critérios de inclusão e não apresentaram nenhum critério de exclusão do estudo.

5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS PACIENTES SELECIONADAS E DOS GRUPOS CONTROLES

As características clínicas das pacientes e dos 2 grupos controles estão demonstradas na Tabela 1. Vinte mulheres na menopausa com DPOC foram incluídas no estudo. A média de idade das pacientes foi de 62 anos e a média do IMC, 24,4kg/m². Quinze pacientes (75%) eram brancas e 5 (25%), pardas. A mediana da idade que as pacientes iniciaram menopausa era 45 anos (34-52) sendo o tempo médio de menopausa no momento do estudo de 17,2 anos (4-28). Cinco (25%) pacientes tinham usado estrogênio por um curto período de tempo. O tempo médio de duração da DPOC e tabagismo documentados no prontuário eram 5 e 46 anos, respectivamente. Todas as pacientes eram tabagistas ou tinham antecedentes de tabagismo, sendo que 50% continuavam até o período do estudo. A mediana da intensidade do tabagismo quantificada em anos-maço foi 33,1(10 a 69).

A média de idade das mulheres que fazem parte do grupo controle de histomorfometria era 60 anos, sendo todas caucasianas. O tempo médio de anos de menopausa foi de 13 e a mediana da idade do início da menopausa foi 47 (31-57). Dados referentes ao IMC e tabagismo não são disponíveis neste grupo. No grupo controle da μ CT, a média de idade das mulheres era 59,8 anos, sendo 69% brancas e 31%, pardas. Informações referentes a menopausa, tabagismo e IMC não são disponíveis neste grupo.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC) E DOS GRUPOS CONTROLES

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	DPOC (n=20)	CONTROLES HISTOMORFOMETRIA (n=33)	CONTROLES μ CT (n=13)
Idade (anos)	62,4 \pm 7,2	60 \pm 8,0	59,8 \pm 11,8
IMC (kg/m ²)	24,4 \pm 3,7	ND	ND
Tempo de menopausa (anos)	17,2 \pm 7,8	13 \pm 8,0	ND
Idade de menopausa (anos)	45 (34-52)	47 (31- 57)	ND
Tempo de diagnóstico de DPOC (anos)	5,0 \pm 5,2	ND	ND
Tempo de tabagismo (anos)	45,9 \pm 8,2	ND	ND
Tabagismo (anos-maço)	33,1 \pm 16,8	ND	ND
Cor da pele (brancos/pardos)	15 / 5	33	9 / 4

NOTAS: Valores são média ou mediana.

ND: Não disponível; μ CT: microtomografia computadorizada.

5.3 PROVA DE FUNÇÃO PULMONAR, CLASSIFICAÇÃO DA DPOC E GASOMETRIA ARTERIAL

A média do VEF₁, % do valor previsto, foi 57,5 \pm 26,8 e do valor obtido, 62,2 \pm 28,9. A média da razão do VEF₁/CVF foi 53,9 \pm 13%. A distribuição dos pacientes de acordo com a classificação de GOLD dada pelo valor de VEF₁ e sintomas clínicos foi: GOLD I: 3 (15%); GOLD II: 8 (40%); GOLD III: 6 (30%) e GOLD IV: 3 (15%) (Figura 9). A média (\pm DP) da saturação de oxigênio medida por oximetria de pulso foi de 92,6 \pm 5,8%, enquanto que na gasometria arterial, a média da saturação de oxigênio foi de 91,7 \pm 6,2%. Ainda na gasometria arterial foi obtido uma média do pH de 7,41 \pm 0,05; do pCO₂, 38,7 \pm 8mmHg; do paO₂, 66,6 \pm 12,6 mmHg; e do bicarbonato que foi 24,0 \pm 4,3mmol/L.

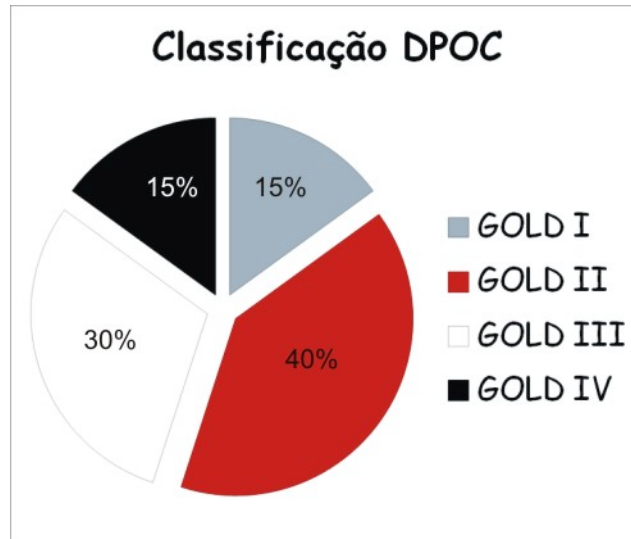


FIGURA 9 - DISTRIBUIÇÃO DAS PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO DE GOLD

Na Tabela 2, comparamos os parâmetros espirométricos e resultados da gasometria arterial de pacientes GOLD I-II e GOLD III-IV.

TABELA 2 - RESULTADOS DA ESPIROMETRIA, OXIMETRIA DE PULSO E GASOMETRIA ARTERIAL DO SUBGRUPO DE PACIENTES GOLD I E II EM COMPARAÇÃO COM O SUBGRUPO GOLD III -IV

	GOLD I-II (n=13)	GOLD III-IV (n=7)	VALOR DE p
Tempo de diagnóstico DPOC (anos)	4,3±5,8	6,2±3,6	NS
VEF ₁ pós-broncodilatador (L)	75,8±27	37,1±9,8	<0,001
VEF ₁ /CVF (%)	59,9±8,7	42,8±12,9	0,002
Bicarbonato (mmol/L)	23,7±3,5	24,5±5,7	NS
paO ₂ (mmHg)	67,9±13,2	64,3±11,9	NS
paCO ₂ (mmHg)	37,4±7,7	40,2±8,4	NS
Saturação O ₂ (%)	92±7,4	91,2±4,2	NS
Oximetria (%)	94,7±1,7	88,8±8,8	0,03

5.4 DENSIDADE MINERAL ÓSSEA (DMO)

Dezoito pacientes apresentaram osteoporose em pelo menos um dos sítios avaliados (escore T < -2,5) e duas pacientes, apresentaram osteopenia (paciente 2: escore T, -1,89 na coluna lombar e fêmur normais; paciente 5: escore T -1,96 na coluna lombar e -2,0 no colo do fêmur -1,56 em fêmur total. A média dos valores

absolutos da DMO da coluna lombar foi de $0,657\pm 0,105\text{g/cm}^2$, colo do fêmur foi $0,629\pm 0,124\text{g/cm}^2$, e do fêmur total, $0,672\pm 0,101\text{g/cm}^2$ (Tabela 3).

TABELA 3 - RESULTADOS DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA (DMO) DAS PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA

DMO (g/cm^2)	MÉDIA \pm DP	T SCORE	MÁXIMO	MÍNIMO
Coluna lombar	$0,657\pm 0,105$	- 3,37	-1,89	-6,00
Colo de fêmur	$0,629\pm 0,124$	-1,97	0,75	-3,39
Fêmur total	$0,672\pm 0,101$	-2,17	0,94	-4,00

5.5 METABOLISMO MINERAL ÓSSEO DAS PACIENTES COM DPOC

O valor médio do cálcio sérico total corrigido pela albumina foi de $9,28\pm 0,42\text{mg/dl}$ e do fósforo sérico $3,75\pm 0,79\text{mg/dL}$ (Tabela 4). A média da fosfatase alcalina e da creatinina foi $108\pm 47\text{U/L}$ e $0,83\pm 0,14\text{mg/dL}$, respectivamente. A mediana do clearance de creatinina, calculado pela fórmula de Cockcroft & Gault, foi de $62,8\text{ml/min}$ (53,3-99,4). A mediana da 25OHD foi $21,8\pm 10,54\text{ng/dL}$, 8 (40%) tinham insuficiência e 8 (40%) deficiência de vitamina D ($<19\text{ng/dL}$). Não houve correlação significativa entre os níveis de 25OHD e de PTH. Os níveis séricos de 25OHD não foram diferentes entre os grupos GOLD I-II e GOLD III-IV.

TABELA 4 - METABOLISMO MINERAL ÓSSEO DAS PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA

DOSAGENS LABORATORIAIS	MÉDIA \pm DP	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
Cálcio (mg/dl)	$9,2\pm 0,4$	9,2	8,6	10,3
Fósforo (mg/dl)	$3,7\pm 0,7$	3,9	2,3	4,6
Creatinina (mg/dL)	$0,83\pm 0,1$	0,9	0,6	1,0
Fosfatase Alcalina (U/L)	108 ± 47	94	46	211
PTH (pg/ml)	$51,8\pm 21,3$	47,8	22	108
25OHD (ng/ml)	$21,8\pm 10,5$	21,7	7,6	50,3

5.6 MICROESTRUTURA DO OSSO TRABECULAR PELA MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (μ CT)

Os principais parâmetros da microestrutura óssea de pacientes e controles medidos através da μ CT estão demonstrados na Tabela 5. Uma paciente foi excluída da amostra pelo fato da biópsia ter sido realizada em região superior à padronizada na crista íliaca, o qual aumenta a proporção de osso cortical e pode alterar os outros parâmetros avaliados. A média do BV/TV foi significativamente menor nos pacientes do que nos controles ($14,6\pm 5,9$ vs. $21,3\pm 5,5\%$, $p=0,01$), assim como o Tb.N* ($1,3\pm 0,2$ vs. $1,7\pm 0,5$ por mm, $p=0,003$), Tb.Th* (141 ± 24 vs. $174\pm 36\mu\text{m}$, $p=0,006$) e a Conn.D ($5,6\pm 2,7$ vs. $7,9\pm 3,0/\text{mm}^3$, $p=0,04$). Além disto, a média da DMA foi mais baixa nos pacientes do que nos controles (225 ± 64 vs. $286\pm 63\text{mgHA}/\text{cm}^3$, $p=0,007$) e a TMD maior nos pacientes do que no grupo controle (1033 ± 28 vs. $1002\pm 21\text{mgHA}/\text{cm}^2$, $p=0,006$). A média Tb.Sp* foi maior nas pacientes (790 ± 183 vs. $614\pm 136\mu\text{m}$, $p=0,01$). Não houve diferença em relação ao SMI ($1,4\pm 0,4$ vs. $1,3\pm 0,4$; $p=0,51$) e DA ($1,4\pm 0,1$ vs. $1,4\pm 0,1$, $p=0,47$). A Figura 10 ilustra imagens de μ CT de 2 pacientes (n.º 14 e 7) e 2 controles (n.º 3 e 5), os quais apresentam valores representativos da nossa amostra (Anexos 3 e 5).

TABELA 5 - MICROESTRUTURA DE OSSO TRABECULAR POR MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (μ CT) DE PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA E CONTROLES

PARÂMETROS ESTRUTURAIS	DPOC (n=19)	CONTROLES (n=13)	VALOR DE p
BV/TV (%)	14,7 \pm 4,9	21,3 \pm 5,5	0,01
Tb.Th* (μm)	141 \pm 24	174 \pm 36	0,006
Tb.N* (per mm)	1,3 \pm 0,2	1,7 \pm 0,5	0,003
Tb.Sp* (μm)	790 \pm 183	614 \pm 136	0,01
Conn.D (/mm ³)	5,6 \pm 2,7	7,9 \pm 3,0	0,04
DA	1,4 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1	NS
TMD (mgHA/cm ³)	1033 \pm 28	1002 \pm 21	0,006
SMI	1,4 \pm 0,4	1,3 \pm 0,4	NS

NOTAS: Valores são expressos em média \pm DP.

BV/TV: volume ósseo; Tb.Th: espessura trabecular; Tb.N: número de trabéculas; Tb.Sp: espaço inter-trabecular; Conn.D: conectividade, DA: grau de anisotropia; TMD: densidade mineral do tecido; SMI: índice de modelo estrutural.

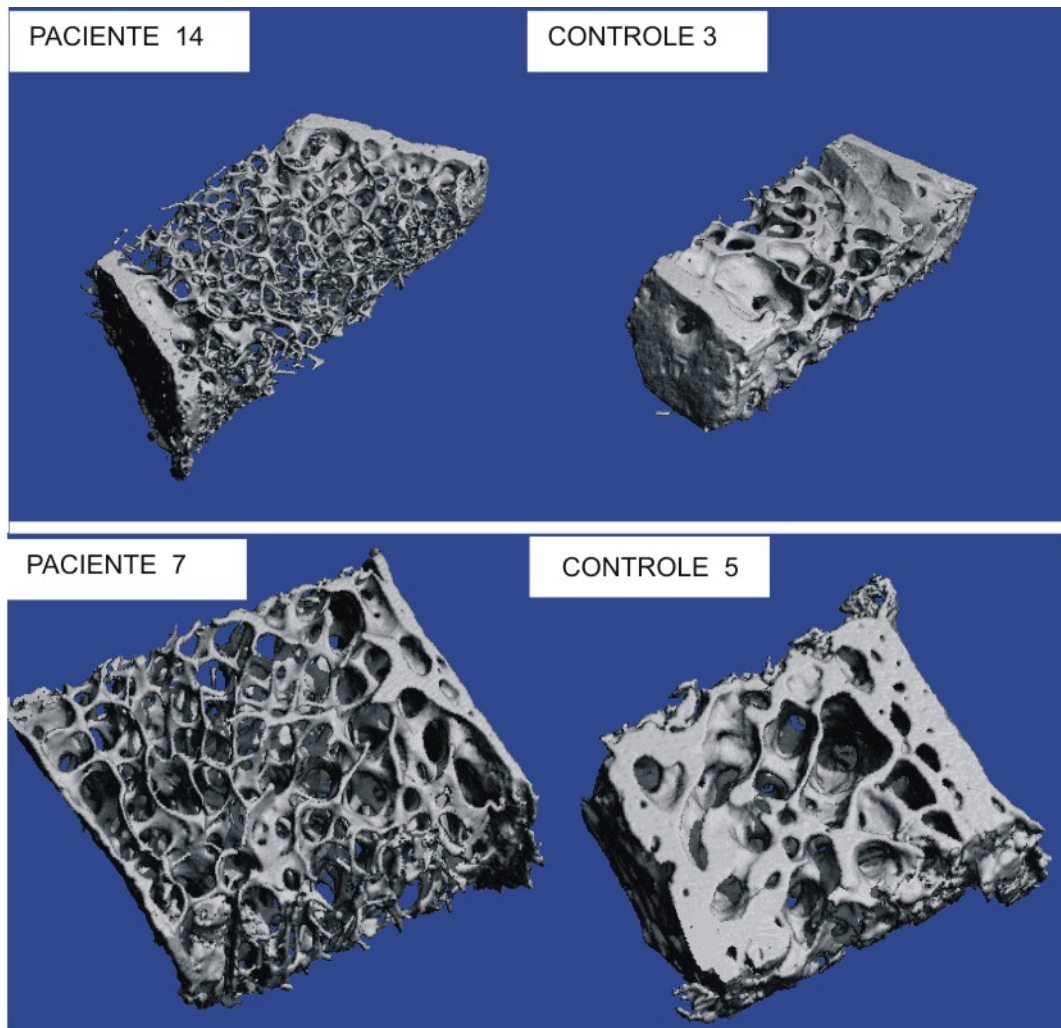


FIGURA 10 - MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (μ CT) DE CRISTA ILÍACA DE 2 PACIENTES E 2 CONTROLES

NOTA: Observa-se nas imagens de μ CT das pacientes a presença de trabéculas mais delgadas com uma maior separação entre elas quando comparadas com as imagens das μ CT dos controles, onde as trabéculas são mais espessas e conseqüentemente apresentam um espaço intertrabecular menor.

Não houve correlação significativa entre os parâmetros estruturais e idade, anos de menopausa e níveis séricos de 25OHD. Houve correlação inversa significativa entre tabagismo (anos-maço) e BV/TV ($r=-0,40$, $p=0,03$); Tb.N* ($r=-0,71$, $p=0,0005$) e Conn.D, ($r=-0,67$; $p=0005$) (Figura 11 A, B, C), e também observamos correlação positiva entre tabagismo e Tb.Sp* ($r=0,71$, $p=0,0004$) (Figura 11 D).

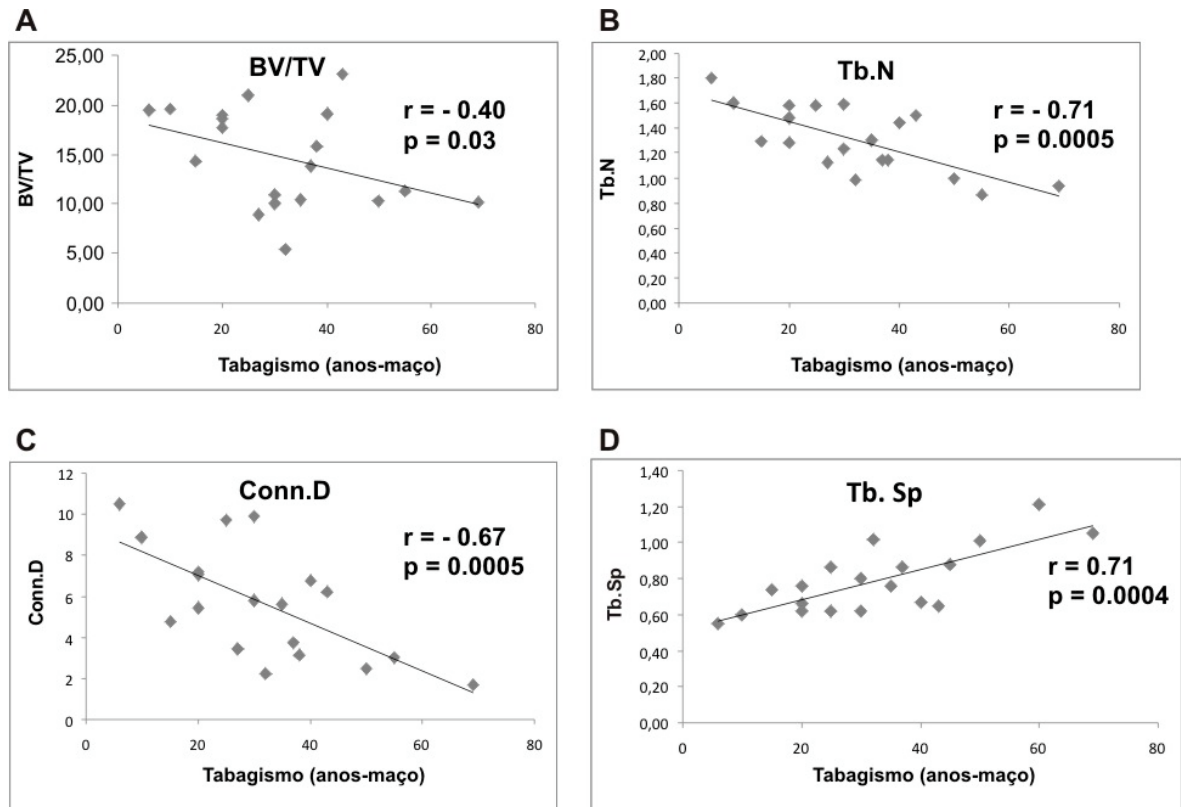


FIGURA 11 - CORRELAÇÃO ENTRE CONECTIVIDADE E TABAGISMO

Houve uma correlação significativa entre PaO_2 (mmHg) (Figura 12) e saturação de oxigênio por oximetria com espessura das trabéculas Tb.Th^* ($r=0,48$, $p=0,03$ e $r=0,55$, $p=0,01$, respectivamente).

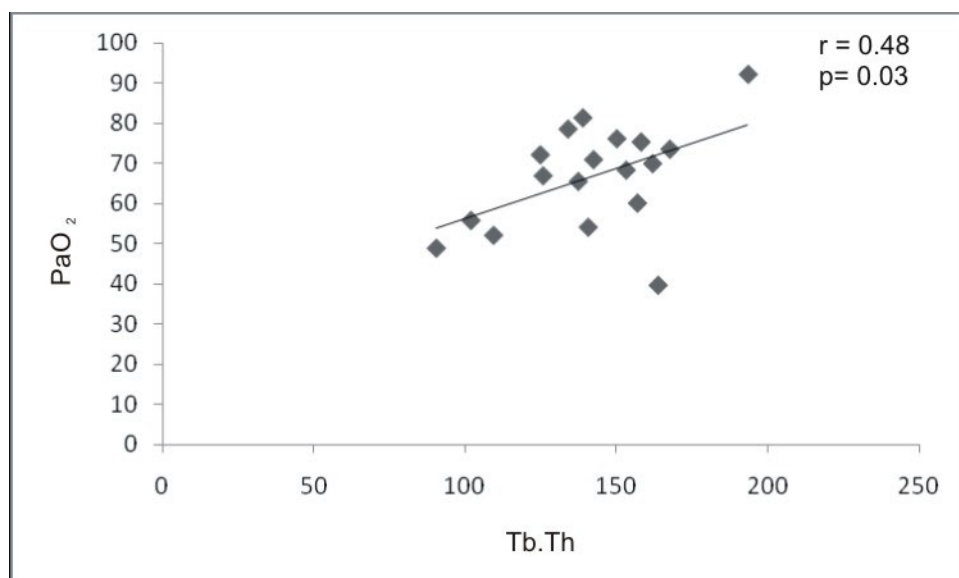


FIGURA 12 - CORRELAÇÃO ENTRE PaO_2 E ESPESSURA TRABECULAR

5.7 PARÂMETROS ESTRUTURAIS E DE REMODELAÇÃO ATRAVÉS DA HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA DE PACIENTES E CONTROLES

A média do BVTV foi significativamente menor nos pacientes do que nos controles ($14,5 \pm 4,6$ vs. $21,2 \pm 4,6\%$, $p < 0,001$), assim como o Tb.N ($1,4 \pm 0,3$ vs. $1,61 \pm 0,2$ por mm, $p = 0,02$) e a Tb.Wi ($101 \pm 20,3$ vs. $131 \pm 23,8 \mu\text{m}$, $p < 0,001$). O valor médio da Tb.Sp foi maior nos pacientes com DPOC do que nos controles (748 ± 225 vs. $627 \pm 129 \mu\text{m}$, $p = 0,02$). A Tb.Wi correlacionou-se positivamente com a oximetria ($r = 0,48$, $p = 0,02$) e negativamente com o valor médio do bicarbonato ($r = -0,55$, $p = 0,01$) e $p\text{CO}_2$ ($r = -0,50$, $p = 0,02$).

Os resultados dos parâmetros estruturais medidos pelas duas técnicas utilizadas neste estudo, μCT e histomorfometria óssea, correlacionaram-se significativamente, BV/TV: $r = 0,92$, $p < 0,001$; Tb.Th/ Tb.Wi, $r = 0,73$; Tb.N: $r = 0,86$ e Tb.Sp: $r = 0,85$ (Figura 13 A, B, C, D).

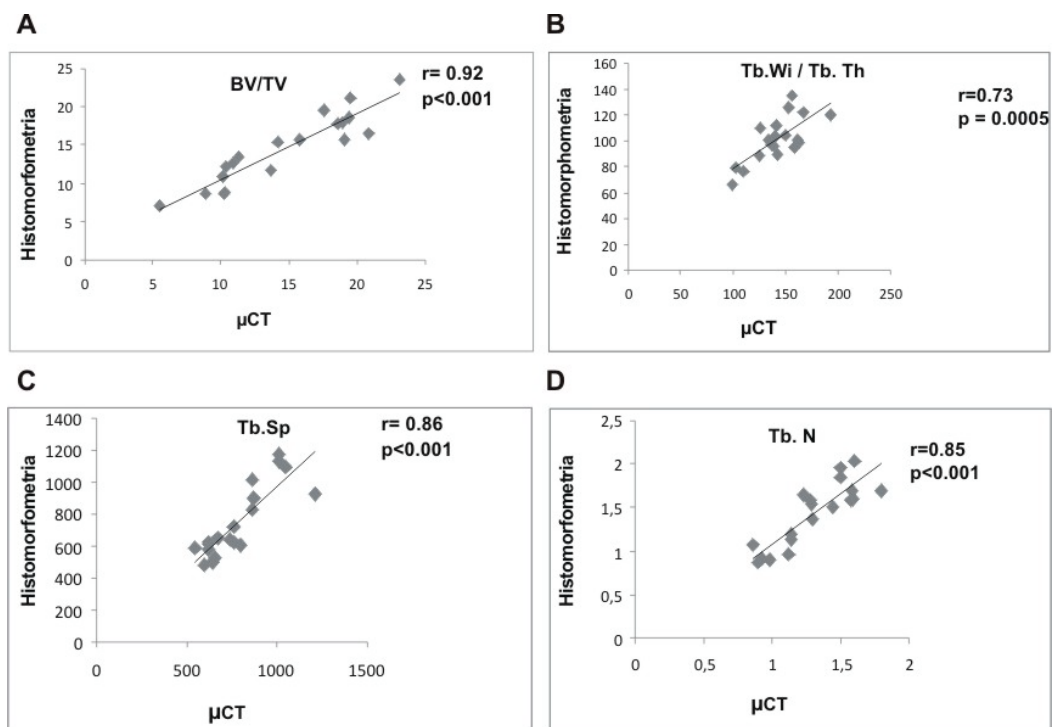


FIGURA 13 - CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS MEDIDOS ATRAVÉS DA MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (μCT) E DA HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA

NOTA: Unidades das variáveis: A = %; B = μm ; C = μm ; D = por mm.

Na análise do osso cortical, observou-se que tanto a largura (469 ± 212 vs. $762\pm 240\mu\text{m}$; $p<0,0001$) quanto à área cortical ($4,6\pm 1,8$ vs. $9,1\pm 3,2$, $p<0,0001$) eram significativamente menores nas pacientes do que nos controles (Tabela 6). Além disto, as pacientes apresentaram maior número de poros em relação à área cortical total ($4,2\pm 1,0$ vs. $2,3\pm 0,9$ poros/ mm^2 ; $p<0,0001$). Houve correlação positiva entre Ct.Wi e o VEF_1 ($r=0,53$, $p=0,02$) (Figura 15). A Figura 14 ilustra a região cortical de 2 pacientes e 2 controles, amostras representativas do grupo.

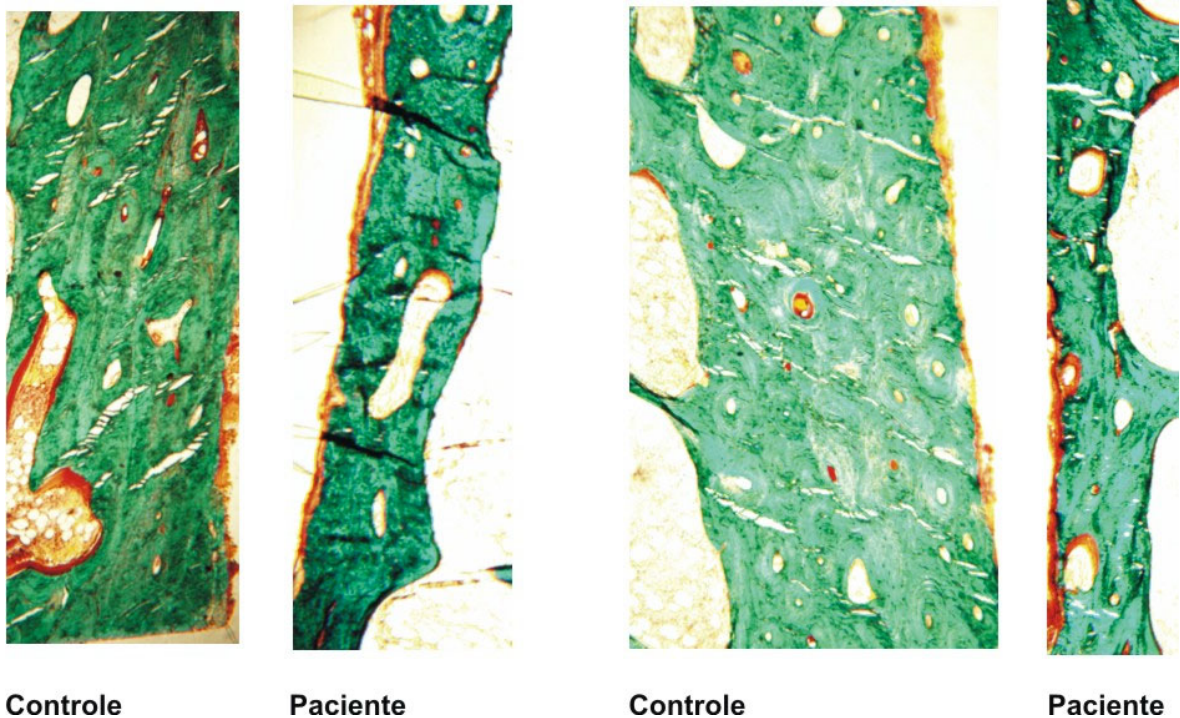


FIGURA 14 - OSSO CORTICAL DE 2 PACIENTES E DOIS CONTROLES

NOTA: Observa-se que tanto a área quanto a largura cortical dos controles é maior que das pacientes. Além disto, a presença de poros em relação à área cortical é maior nas pacientes do que nos controles.

TABELA 6 - PARÂMETROS ESTRUTURAIS DE OSSO CORTICAL DE PACIENTES E CONTROLES

PARÂMETROS ESTRUTURAIS	DPOC n=19	CONTROLES n=33	VALOR DE p
Ct. Wi (μm)	469 ± 212	762 ± 240	0,0004
Ct. Ar	$4,6\pm 1,8$	$9,1\pm 3,2$	<0,0001
Ct. Po. N (voids/ mm^2)	$4,2\pm 0,9$	$2,3\pm 0,9$	<0,0001

NOTA: Valores são expressos em média \pm DP.

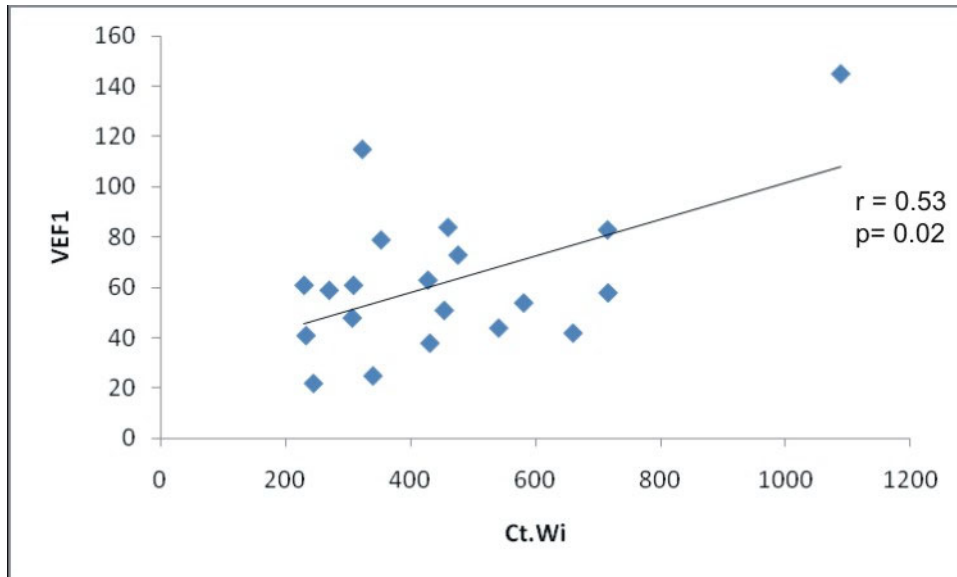


FIGURA 15 - CORRELAÇÃO ENTRE VEF₁ E LARGURA CORTICAL

Conforme demonstrado na Tabela 7, os parâmetros estáticos de remodelação óssea do osso trabecular não foram estatisticamente diferentes entre pacientes e controles.

TABELA 7 - PARÂMETROS ESTÁTICOS DE REMODELAÇÃO DO OSSO TRABECULAR E DA SUPERFÍCIE ENDOCORTICAL

PARÂMETROS ESTÁTICOS DE REMODELAÇÃO	DPOC (n=20)	CONTROLES (n=33)
OS/BS % osso trabecular	13,2±6,2	10,7±4,9
ES/BS % osso trabecular	3,4±2,5	4,1±1,5
O.Wi (nº de camadas)	3,4±1,2	4,2±1,0
OS/BS % endocortical	13,5±7,6	9,8±4,4
ES/BS % endocortical	1,4±1,0	1,1±0,6
O.Wi (nº de camadas)	3,1±0,7	3,4±0,9

NOTAS: Valores são expressos em média±DP.

OS/BS: superfície osteoide; ES/BS: superfície reabsorvida; O. Wi: espessura osteoide.

A Tabela 8 resume os dados dos parâmetros de remodelação óssea dinâmica do osso trabecular e superfície endocortical nos grupos de estudo. As únicas diferenças observadas foram em MAR, cujos valores foram significativamente menores nos pacientes com DPOC ($0,56 \pm 0,16$ vs. $0,66 \pm 0,12 \mu\text{m}/\text{dia}$; $p=0,01$) e na Aj.AR, que também foi menor no grupo DPOC ($0,20 \pm 0,15$ vs. $0,42 \pm 0,47 \mu\text{m}/\text{dia}$; $p=0,05$). Quando a média da BFR de pacientes GOLD I e II foi comparada com a média das pacientes GOLD III e IV, observou-se que a BFR foi significativamente mais baixa nas pacientes com doença pulmonar mais grave ($p=0,04$) (Figura 16).

TABELA 8 - PARÂMETROS DINÂMICOS DE REMODELAÇÃO ÓSSEA DE OSSO TRABECULAR E SUPERFÍCIE ENDOCORTICAL

PARÂMETROS DINÂMICOS DE REMODELAÇÃO	DPOC (n=20)	CONTROLES (n=33)	VALOR DE p
BFR ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$) trabecular	0,024 \pm 0,014	0,041 \pm 0,043	NS
AjAR ($\mu\text{m}/\text{dia}$) trabecular	0,20 \pm 0,15	0,42 \pm 0,47	0,05
MAR ($\mu\text{m}/\text{dia}$) trabecular	0,56 \pm 0,16	0,66 \pm 0,12	0,01
MS/BS (%) trabecular	5,0 \pm 2,9	5,0 \pm 3,8	NS
BFR $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$ endocortical	0,06 \pm 0,08	0,04 \pm 0,04	NS
MAR ($\mu\text{m}/\text{dia}$) endocortical	0,66 \pm 0,3	0,71 \pm 0,2	NS
MS/BS (%) endocortical	8,4 \pm 8,5	5,9 \pm 4,6	NS

NOTAS: Valores são expressos em média \pm DP.

BFR: taxa de formação óssea; Aj.AR: taxa de aposição mineral ajustada; MAR: taxa de aposição mineral, MS/BS: superfície de mineralização.

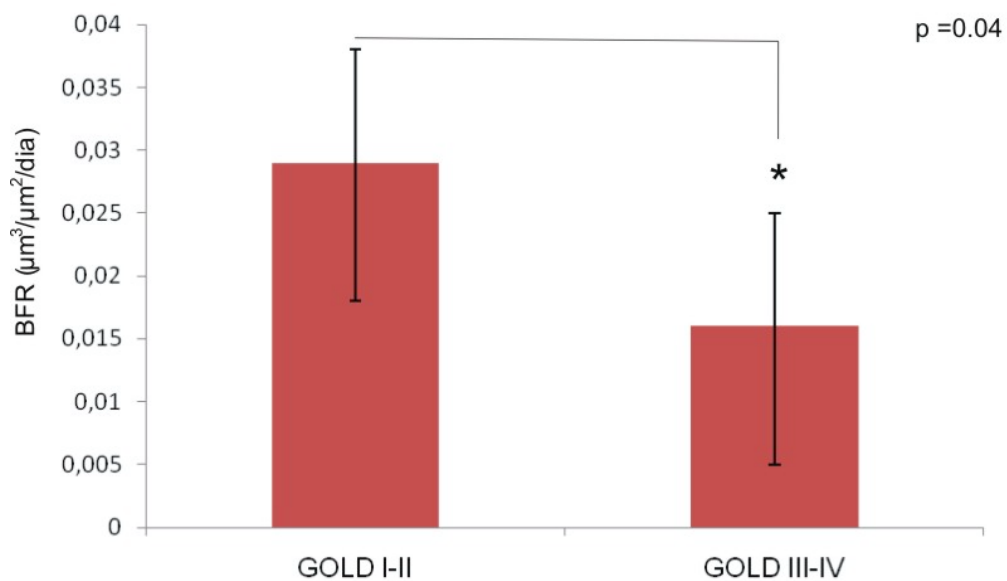


FIGURA 16 - TAXA DE FORMAÇÃO ÓSSEA (BFR) DO SUBGRUPO DE PACIENTES GOLD I E II EM COMPARAÇÃO COM O SUBGRUPO GOLD III E IV

NOTA: Valores são expressos em média \pm DP.

5.8 USO DE GLICOCORTICOIDE INALATÓRIO

Nove pacientes (45%) usavam GI, sendo o budosenida o único tipo de GI usado pelas pacientes: 5 pacientes usaram dose de 800mcg/dia por um período médio de 3,0 \pm 1,2 anos e 4 pacientes usaram dose de 400mcg ao dia por um período de 4,0 \pm 2,1 anos. Destes pacientes, três (15%) fizeram uso de GS durante exacerbações da doença, com dose cumulativa equivalente de prednisona de 398 \pm 165mg. Em relação à gravidade da doença pela classificação de GOLD, 2 (22,2%) pacientes expostas ao GI foram classificadas como GOLD II, 4 (44,4%) como GOLD III e 3 (33,3%),

como GOLD IV. Duas pacientes (22,2%) apresentaram fratura por fragilidade. As características clínicas, DMO e níveis séricos de 25OHD das pacientes expostas e não expostas ao GI, com exceção do IMC que foi maior nas usuárias de GI ($26,4 \pm 4,4$ vs. $22,8 \pm 1,9 \text{ kg/m}^2$, $p=0,02$), não foram estatisticamente diferentes entre os grupos.

Nenhuma diferença significativa foi observada com relação a exposição ou não ao GI com relação ao BV/TV (%) ($15,5 \pm 4,1$ vs. $14,3 \pm 5,6$), largura trabecular (131 ± 26 vs. $150 \pm 20,6 \mu\text{m}$), espaço intertrabecular (700 ± 109 vs. 850 ± 390) e número de trabéculas ($1,43 \pm 0,2$ vs. $1,22 \pm 0,2$).

Por outro lado, as pacientes expostas ao GI mostraram redução significativa da MS/BS ($3,6 \pm 2,2$ vs. $6,3 \pm 2,9$, $p=0,03$) e menor OS/BS ($10,3 \pm 4,4$ vs. $15,6 \pm 6,5$, $p=0,05$) em relação ao subgrupo não exposto ao GI (Tabela 9).

TABELA 9 - PARÂMETROS ESTÁTICOS E DINÂMICOS DE REMODELAÇÃO ÓSSEA TRABECULAR DE PACIENTES EXPOSTAS E NÃO EXPOSTAS AO GLICOCORTICOIDE INALATÓRIO (GI)

PARÂMETROS ESTÁTICOS E DINÂMICOS DE REMODELAÇÃO	EXPOSTAS AO GI (n=9)	NÃO EXPOSTAS AO GI (n=11)	VALOR DE p
OS/BS %	$10,3 \pm 4,4$	$15,6 \pm 6,5$	0,05
ES/BS %	$2,49 \pm 1,6$	$4,2 \pm 2,9$	NS
BFR $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$	$0,020 \pm 0,01$	$0,029 \pm 0,01$	NS
Aj.AR ($\mu\text{m}/\text{dia}$)	$0,17 \pm 0,13$	$0,22 \pm 0,17$	NS
MAR ($\mu\text{m}/\text{dia}$)	$0,55 \pm 0,21$	$0,56 \pm 0,10$	NS
MS/BS (%)	$3,6 \pm 2,2$	$6,3 \pm 2,9$	0,03

NOTAS: Valores são expressos em média \pm DP.

OS/BS: superfície osteoide; ES/BS: superfície reabsorvida; BFR: taxa de formação óssea; Aj.AR: taxa de aposição mineral ajustada; MAR: taxa de aposição mineral, MS/BS: superfície de mineralização.

5.9 HISTÓRIA DE FRATURA POR FRAGILIDADE ÓSSEA

Das 20 pacientes, 8 (40%) tinham história de fratura por fragilidade óssea documentadas no prontuário médico: 4 foram na coluna dorsal, 2 no rádio, e 2 no úmero. As principais características das pacientes com história de fratura em comparação com as pacientes que não sofreram fratura estão demonstradas na Tabela 10. O IMC nas pacientes com fratura foi $20,7 \pm 4,0 \text{ kg/m}^2$, significativamente menor do que o IMC de $26,2 \pm 3,6 \text{ kg/m}^2$ nas pacientes que não tiveram fratura ($p < 0,005$). De acordo com a severidade da doença, 2 (33,3%) pacientes que fraturaram foram classificadas como GOLD I; 3 (33,3%) como GOLD II e como GOLD III: 2 (22,2%) e 1 (11,1%), como GOLD IV. A DMO da coluna lombar, colo do fêmur e fêmur total foi estatisticamente

menor nas pacientes com história de fratura do que as que não haviam fraturado ($0,587\pm0,10$ vs. $0,703\pm0,08$, $p=0,01$; $0,612\pm0$ vs. $0,712\pm0,09$, $p=0,02$; $0,565\pm0,09$ vs. $0,671\pm0,12$, $p=0,05$, respectivamente). Os níveis séricos da 25OHD foram similares nos 2 grupos.

TABELA 10 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, DENSIDADE MINERAL ÓSSEA (DMO) E NÍVEIS DE 25OHD DE PACIENTES COM HISTÓRIA DE FRATURAS EM COMPARAÇÃO COM AS QUE NÃO FRATURARAM

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DMO E 25OHD	FRATURA (n=8)	SEM FRATURA (n=12)	VALOR DE p
Idade	64±5,3	61,3±8,3	NS
IMC (kg/m ²)	20,7±4,0	26,2±3,6	0,005
Tempo de menopausa	20,1±7,6	15,3±7,6	NS
Tempo de tabagismo	45,6±8,2	46,1±8,5	NS
Tabagismo anos-maço	32,5±11,1	33,5±19,8	NS
Tempo de DPOC	6,4±6,8	4,1±3,8	NS
DMO L2-L4 (g/cm ²)	0,587±0,10	0,703±008	0,01
DMO colo fêmur (g/cm ²)	0,565±0,09	0,671±0,12	0,05
DMO fêmur total (g/cm ²)	0,612±0,08	0,712±0,09	0,02
25OHD (ng/ml)	18,0±7,9	24,3±11,1	NS

NOTA: Valores são expressos em média±DP.

Não houve diferença significativa em relação a microestrutura óssea avaliada por μ CT e histomorfometria entre os dois grupos, com exceção da média da TMD que foi maior nos pacientes com fraturas do que nos que não fraturaram (1050 ± 29 vs. 1022 ± 28 HA/cm³, $p=0,02$). De modo semelhante, os parâmetros estáticos e dinâmicos da remodelação óssea não foram diferentes entre os subgrupos.

6 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a estrutura e remodelação do tecido ósseo em mulheres na menopausa com DPOC em níveis diferentes de gravidade (GOLD I- IV), sem uso crônico de GS, por duas técnicas independentes: histomorformetria e μ CT. Nesta avaliação, observamos uma alteração da integridade da microestrutura óssea na DPOC. Em ambas as técnicas utilizadas, o volume ósseo apresenta-se reduzido, associado a deterioração da microarquitetura cortical e trabecular. Estes achados indicam um estado de fragilidade, o qual contribui para diminuição da força óssea (DEMPSTER, 2003). De fato, pacientes com fraturas osteoporóticas apresentam uma integridade óssea pior quando comparados aos pacientes que não fraturaram independente da DMO (KLEEREKOPER *et al.*, 1985; AARON *et al.*, 2000). Sendo assim. As alterações de microestrutura óssea aqui demonstradas, podem justificar a alta prevalência de fraturas relatadas na DPOC, mesmo sem exposição ao GS (McEVOY *et al.*, 1998; NUTI *et al.*, 2009). Além disto, uma correlação negativa dos principais parâmetros estruturais com a intensidade do tabagismo foi observada, o que está em acordo com associação significativa entre tabagismo e fraturas publicadas em meta-análises e estudos populacionais (KANIS *et al.*, 2005; PINHEIRO *et al.*, 2009). É possível, por exemplo, que a relação inversa entre a conectividade óssea e o tabagismo decorra da alta e prolongada exposição do esqueleto à nicotina. A nicotina é o maior componente do cigarro e apresenta efeitos ambíguos no osso, pode tanto estimular como inibir a proliferação e diferenciação dos osteoblastos (KAMER *et al.*, 2006; NAKAYAMA *et al.*, 2008; ROTHEM *et al.*, 2009). Em cultura de linhagem celular de osteoblastos humanos, foi demonstrado que uma baixa concentração de nicotina aumenta a proliferação celular e a expressão gênica que regula o metabolismo ósseo no osteoblasto. Em contraste, concentrações elevadas de nicotina foram capazes de induzir supressão da atividade osteoblástica (ROTHEM *et al.*, 2009). Outro estudo observou que a nicotina aumenta a secreção de citocinas, como IL-6 e TNF α e portanto estimula reabsorção óssea (KAMER *et al.*, 2006). Baseado nos efeitos contraditórios dependentes da concentração de nicotina, podemos especular que em fumantes, existe um aumento inicial da remodelação seguido por uma supressão da formação óssea, à medida que vai aumentando a exposição do esqueleto ao

cigarro. Estes achados são de grande importância clínica, pois confirma um papel deletério do tabagismo sobre o tecido ósseo, caracterizando-o como um importante fator de risco para osteoporose e fraturas.

Alguns parâmetros estruturais avaliados neste estudo correlacionaram-se com a gravidade da DPOC, PaO_2 e PaCO_2 , como por exemplo, largura/espessura trabecular, medida pelas 2 técnicas usadas neste estudo. Estes achados sugerem que a doença pulmonar propriamente dita, hipoxemia e hipercapnia podem ter contribuído para a deterioração da microarquitetura óssea. Isto corrobora com outros estudos que correlacionaram a gravidade da DPOC com presença de fraturas (NUTI *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2008). Da mesma maneira, a espessura cortical se correlacionou com a gravidade da obstrução pulmonar, achado este relevante, pois estudos mais recentes em histomorfometria tem apontado os parâmetros corticais como importantes determinantes da força óssea. Por exemplo, parâmetros como largura cortical e porosidade medidos por histomorfometria de crista ilíaca, foram associados à presença de fraturas vertebrais em mulheres (SORNAY-RENDU *et al.*, 2009) e em homens (OSTERTAG *et al.*, 2009), respectivamente.

Na histomorfométrica dinâmica, pacientes com DPOC apresentaram uma diminuição da taxa de aposição mineral e da taxa de aposição ajustada, parâmetros estes, relacionados à atividade dos osteoblastos. Tais achados indicam que na DPOC, ocorre uma doença óssea de baixa remodelação, decorrente principalmente da diminuição da formação óssea. Isto corrobora com o aumento da densidade mineral do tecido (TMD), demonstrado pela técnica de μCT , o qual também indica baixa remodelação. Sabe-se que o grau de mineralização ou TMD influencia a propriedade mecânica a nível tecidual, podendo estar associado com uma maior quantidade de lesão tecidual, “os microdanos” (COURTNEY; HAYES; GIBSON, 1996). As duas técnicas utilizadas neste presente estudo demonstraram que a remodelação óssea nestas mulheres com DPOC, está diminuída. Este achado tem uma importância clínica significativa, pois sugere que estas pacientes possam se beneficiar com o uso de um tratamento anabólico, ou seja, que estimule a formação óssea. Além das elevadas concentrações de nicotina que podem comprometer o funcionamento dos osteoblastos, acredita-se que a própria DPOC possa estar associada à diminuição da formação óssea. Em nosso estudo, isto foi sugerido pelo fato da formação óssea estar menor nas pacientes com doença pulmonar mais grave (GOLD III-IV). A hipoxemia causada

pela obstrução pulmonar (confirmada pelos baixos níveis de PaO₂), deve existir a nível celular na DPOC e também pode ter efeito negativo sobre a função osteoblástica. Células osteoblásticas humanas expressam várias proteínas importantes para a formação óssea como o Runx2, osteocalcina, fosfatase alcalina e colágeno tipo I, que estão diminuídas na vigência da hipóxia (PARK *et al.*, 2002). Há poucos estudos em DPOC que correlacionam hipóxia e metabolismo ósseo (FUJIMOTO *et al.*, 1999; TAKABATAKE *et al.*, 2000). Um destes estudos encontrou uma correlação negativa entre PaO₂ e TNF α em pacientes com DPOC, sugerindo que a hipóxia estimularia a produção de TNF α , o qual atua como potente estimulador da reabsorção e inibidor da formação óssea (TAKABATAKE *et al.*, 2000). Em conjunto, os dados destes estudos sugerem que uma longa exposição à nicotina, hipóxia e citocinas inflamatórias podem interferir na remodelação óssea, causando aumento na reabsorção e diminuição da formação. É provável que estes fatores atuem em tempos diferentes durante a progressão da doença pulmonar, contribuindo para perda óssea e deterioração da microarquitetura esquelética observadas neste estudo.

Neste estudo foi observado que a maioria apresentou níveis séricos reduzidos de vitamina D, algumas com valores compatíveis com deficiência. Esta redução da vitamina D pode piorar a função pulmonar conforme demonstrado em estudos com pacientes asmáticos (SUTHERLAND *et al.*, 2010). Entretanto quando comparamos os grupos GOLD I-II *versus* GOLD III-IV, não encontramos redução dos níveis séricos de 25OHD no grupo de pacientes com maior gravidade. Neste estudo, portanto, a vitamina D não pode ser considerada um fator que pudesse estar interferindo na função pulmonar. A alta prevalência de hipovitaminose D nas pacientes com DPOC, estimulou novo estudo controlado, com dosagem de 25OHD em número maior de mulheres com DPOC, como também, em mulheres saudáveis.

O uso de GI pode exercer efeito negativo potencial sobre o esqueleto, embora este assunto ainda seja controverso (MATSUMOTO *et al.*, 2001; JOHNELL *et al.*, 2002; SCANLON *et al.*, 2004). O uso de GI poderia ser fator de confusão na análise dos dados deste estudo. Entretanto, não observamos piora na microarquitetura óssea nem aumento no número de fraturas neste grupo de pacientes expostas ao GI comparando-as com as não expostas. O único achado sugestivo neste subgrupo, foi a menor superfície de mineralização comparado com as não usuárias de GI, o que já havia sido demonstrado em estudo histomorfométrico prévio de pacientes com

osteoporose induzida por GS (DEMPSTER, 1989). Entretanto como as pacientes expostas ao GI apresentavam uma doença pulmonar mais grave, outros fatores como a hipóxia, podem ter alguma relação com este achado histomorfométrico. Estes dados enfatizam a necessidade de melhores estudos para estabelecer a influência do uso de GI sobre o metabolismo ósseo.

O menor IMC e a menor DMO no subgrupo com história de fraturas corroborou diversos estudos prévios que demonstram que eles são fatores de risco para aumento do risco de fraturas em DPOC e também na população geral (NUTI *et al.*, 2009; PINHEIRO *et al.*, 2009). Assim, além dos fatores relacionados com DPOC e tabagismo, estas pacientes também apresentam outros riscos clássicos para fraturas que contribuem para diminuição da força óssea.

Uma das limitações deste estudo foi o tamanho da amostra. Vale salientar, entretanto, que as pacientes com DPOC apresentam várias restrições que dificultam um deslocamento frequente para consultas médicas e, conseqüentemente, a participação em estudos clínicos. O recrutamento de pacientes foi dificultado pelo uso crônico de GS por muitas pacientes inicialmente consideradas para o estudo. Além disto, o procedimento invasivo fez com que várias não aceitassem participar da pesquisa. Em razão de todos estes problemas, consideramos que a casuística, embora não ideal foi suficiente para um estudo de biópsia óssea.

Outra limitação deste estudo foi a adequação do grupo controle, uma vez que motivos éticos impediram realizar biópsias em indivíduos normais; assim, optamos por utilizar biópsias armazenadas de outros estudos realizados em indivíduos normais para serem usadas como controle do nosso estudo (RECKER *et al.*, 1988; DOS REIS *et al.*, 2007). Além disso, foi necessário usar dois diferentes grupos: um somente usado para μ CT (controle brasileiro) por ser o único em que os blocos eram disponíveis e outro para histomorfometria (controle americano), por apresentar número suficiente de cortes histológicos disponíveis para análise. Devido à variabilidade dos parâmetros histomorfométricos entre diferentes raças (PARISIEN *et al.*, 1997), comparamos os parâmetros de remodelação estáticos e dinâmicos dos dois grupos controles brasileiro e americano e nenhuma diferença significativa foi encontrada. A falta de um grupo controle ideal mostra a necessidade de estudos de biópsias ósseas em indivíduos normais em nosso país, para que se estabeleça valores de referência para os parâmetros histomorfométricos dinâmicos na nossa população. A realização deste

projeto abre perspectivas para a criação de um laboratório de histomorfometria óssea em nossa instituição. Isto possibilitará, não somente avaliação histomorfométrica de indivíduos normais, como também de homens com obstrução pulmonar e de indivíduos tabagistas sem diagnóstico de DPOC.

7 CONCLUSÕES

Nesta casuística de 20 mulheres na menopausa com DPOC avaliadas no HC-UFPR e comparadas com controles, concluímos que:

1. As pacientes com DPOC apresentaram maior deterioração da microestrutura óssea cortical e trabecular.
2. Entre os parâmetros de remodelação óssea, taxa de aposição mineral e a aposição ajustada foram menores nas pacientes com DPOC.
3. A gravidade da doença pulmonar, de acordo com os critérios de GOLD, correlacionou-se inversamente com a formação óssea.
4. A intensidade do tabagismo correlacionou-se diretamente com a deterioração da microestrutura óssea trabecular nas pacientes com DPOC.

REFERÊNCIAS

AARON, J. E.; SHORE, P. A.; SHORE, R. C.; BENETON, M.; KANIS, J. A. Trabecular architecture in women and men of similar bone mass with and without vertebral fracture: II. Three-dimensional histology. **Bone**, v.27, n.2, p.277-82, Aug. 2000.

ADAMS, N.; BESTALL, J. M.; JONES, P. W. Inhaled fluticasone at different doses for chronic asthma. **Cochrane Database Syst Rev**, n.1, p.CD003534, 2002.

AGUSTI, A.; SORIANO, J. B. COPD as a systemic disease. **COPD**, v.5, n.2, p.133-8, Apr. 2008.

AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY AD HOC COMMITTEE ON GLUCOCORTICOID-INDUCED OSTEOPOROSIS. Recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis: 2001 update. **Arthritis & Rheumatism**, v.44, n.7, p.1496-1503, 2001.

ANDREASSEN, H.; VESTBO, J. Chronic obstructive pulmonary disease as a systemic disease: an epidemiological perspective. **Eur Respir J Suppl**, v.46, p.2s-4s, Nov. 2003.

ARLOT, M. E.; DELMAS, P. D.; CHAPPARD, D.; MEUNIER, P. J. Trabecular and endocortical bone remodeling in postmenopausal osteoporosis: comparison with normal postmenopausal women. **Osteoporos Int**, v.1, n.1, p.41-9, Oct. 1990.

ARVER, S.; LEHTIHET, M. Current guidelines for the diagnosis of testosterone deficiency. **Front Horm Res**, v.37, p.5-20, 2009.

BARNES, P. J. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. **Pharmacol Rev**, v.56, n.4, p.515-48, Dec. 2004.

BARNES, P. J.; CELLI, B. R. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. **Eur Respir J**, v.33, n.5, p.1165-85, May 2009.

BECKLAKE, M. R. Occupational exposures: evidence for a causal association with chronic obstructive pulmonary disease. **Am Rev Respir Dis**, v.140, n.3, Pt 2, p.S85-91, Sep. 1989.

- BISCHOFF-FERRARI, H. A.; DIETRICH, T.; ORAV, E. J.; HU, F. B.; ZHANG, Y.; KARLSON, E. W.; DAWSON-HUGHES, B. Higher 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with better lower-extremity function in both active and inactive persons aged > or =60 y. **Am J Clin Nutr**, v.80, n.3, p.752-8, Sep. 2004.
- BISKOBING, D. M. COPD and osteoporosis. **Chest**, v.121, n.2, p.609-20, Feb. 2002.
- BLACK, P. N.; SCRAGG, R. Relationship between serum 25-hydroxyvitamin d and pulmonary function in the third national health and nutrition examination survey. **Chest**, v.128, n.6, p.3792-8, Dec. 2005.
- BOLTON, C. E.; IONESCU, A. A.; SHIELS, K. M.; PETTIT, R. J.; EDWARDS, P. H.; STONE, M. D.; NIXON, L. S.; EVANS, W. D.; GRIFFITHS, T. L.; SHALE, D. J. Associated loss of fat-free mass and bone mineral density in chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v.170, n.12, p.1286-93, Dec. 2004.
- BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v.423, n.6937, p.337-42, May 2003.
- BREHM, J. M.; SCHUEMANN, B.; FUHLBRIGGE, A. L.; HOLLIS, B. W.; STRUNK, R. C.; ZEIGER, R. S.; WEISS, S. T.; LITONJUA, A. A.; CHILDHOOD ASTHMA MANAGEMENT PROGRAM RESEARCH GROUP. Serum vitamin D levels and severe asthma exacerbations in the Childhood Asthma Management Program study. **J Allergy Clin Immunol**, v.126, n.1, p.52-8 e5, Jul. 2010.
- CANALIS, E. Clinical review 83: Mechanisms of glucocorticoid action in bone: implications to glucocorticoid-induced osteoporosis. **J Clin Endocrinol Metab**, v.81, n.10, p.3441-7, Oct. 1996.
- CARTER, J. D.; PATEL, S.; SULTAN, F. L.; THOMPSON, Z. J.; MARGAUX, H.; STERRETT, A.; CARNEY, G.; MURPHY, N.; HUANG, Y.; VALERIANO, J.; VASEY, F. B. The recognition and treatment of vertebral fractures in males with chronic obstructive pulmonary disease. **Respir Med**, v.102, n.8, p.1165-72, Aug. 2008.
- CHAPMAN, K. R.; MANNINO, D. M.; SORIANO, J. B.; VERMEIRE, P. A.; BUIST, A. S.; THUN, M. J.; CONNELL, C.; JEMAL, A.; LEE, T. A.; MIRAVITLLES, M.; ALDINGTON, S.; BEASLEY, R. Epidemiology and costs of chronic obstructive pulmonary disease. **Eur Respir J**, v.27, n.1, p.188-207, Jan. 2006.

CHEN, T. C.; CHIMEH, F.; LU, Z.; MATHIEU, J.; PERSON, K. S.; ZHANG, A.; KOHN, N.; MARTINELLO, S.; BERKOWITZ, R.; HOLICK, M. F. Factors that influence the cutaneous synthesis and dietary sources of vitamin D. **Arch Biochem Biophys**, v.460, n.2, p.213-7, Apr. 2007.

COMPSTON, J. Osteoporosis: social and economic impact. **Radiol Clin North Am**, v.48, n.3, p.477-82, May 2010.

COURTNEY, A. C.; HAYES, W. C.; GIBSON, L. J. Age-related differences in post-yield damage in human cortical bone. Experiment and model. **J Biomech**, v.29, n.11, p.1463-71, Nov. 1996.

DANIEL, M.; MARTIN, A. D.; FAIMAN, C. Sex hormones and adipose tissue distribution in premenopausal cigarette smokers. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v.16, n.4, p.245-54, Apr. 1992.

DELUCA, H. F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. **Am J Clin Nutr**, v.80, n.6 Suppl, p.1689S-96S, Dec. 2004.

DEMARTINI ADE, A.; KULAK, C. A.; BORBA, V. C.; CAT, M. N.; DONDONI, R. S.; SANDRINI, R.; NESI-FRANÇA, S.; LACERDA FILHO, L. [Bone mineral density of children and adolescents with congenital hypothyroidism]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.51, n.7, p.1084-92, Oct. 2007.

DEMPSTER, D. W. Bone histomorphometry in glucocorticoid-induced osteoporosis. **J Bone Miner Res**, v.4, n.2, p.137-41, Apr. 1989.

DEMPSTER, D. W. Bone microarchitecture and strength. **Osteoporos Int**, v.14, Suppl 5, p.S54-6, Sep. 2003.

DIMAI, H. P.; DOMEJ, W.; LEB, G.; LAU, K. H. Bone loss in patients with untreated chronic obstructive pulmonary disease is mediated by an increase in bone resorption associated with hypercapnia. **J Bone Miner Res**, v.16, n.11, p.2132-41, Nov. 2001.

DOBAK, J.; GRZYBOWSKI, J.; LIU, F. T.; LANDON, B.; DOBKE, M. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ increases collagen production in dermal fibroblasts. **J Dermatol Sci**, v.8, n.1, p.18-24, Aug. 1994.

DOS REIS, L. M.; BATALHA, J. R.; MUÑOZ, D. R.; BORELLI, A.; CORREA, P. H.; CARVALHO, A. B.; JORGETTI, V. Brazilian normal static bone histomorphometry: effects of age, sex, and race. **J Bone Miner Metab**, v.25, n.6, p.400-6, 2007.

DUBOIS, E. F.; RÖDER, E.; DEKHUIJZEN, P. N.; ZWINDERMAN, A. E.; SCHWEITZER, D. H. Dual energy X-ray absorptiometry outcomes in male COPD patients after treatment with different glucocorticoid regimens. **Chest**, v.121, n.5, p.1456-63, May 2002.

ERIKSEN, E. F.; HODGSON, S. F.; EASTELL, R.; CEDEL, S. L.; O'FALLON, W. M.; RIGGS, B. L. Cancellous bone remodeling in type I (postmenopausal) osteoporosis: quantitative assessment of rates of formation, resorption, and bone loss at tissue and cellular levels. **J Bone Miner Res**, v.5, n.4, p.311-9, Apr. 1990.

ERKAL, M. Z.; WILDE, J.; BILGIN, Y.; AKINCI, A.; DEMIR, E.; BÖDEKER, R. H.; MANN, M.; BRETZEL, R. G.; STRACKE, H.; HOLICK, M. F. High prevalence of vitamin D deficiency, secondary hyperparathyroidism and generalized bone pain in Turkish immigrants in Germany: identification of risk factors. **Osteoporos Int**, v.17, n.8, p.1133-40, 2006.

FANG, M. A.; FROST, P. J.; IIDA-KLEIN, A.; HAHN, T. J. Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells. **Bone**, v.12, n.4, p.283-6, 1991.

FØRLI, L.; HALSE, J.; HAUG, E.; BJØRTUFT, Ø.; VATN, M.; KOFSTAD, J.; BOE, J. Vitamin D deficiency, bone mineral density and weight in patients with advanced pulmonary disease. **J Intern Med**, v.256, n.1, p.56-62, Jul. 2004.

FØRLI, L.; MELLBYE, O. J.; HALSE, J.; BJØRTUFT, O.; VATN, M.; BOE, J. Cytokines, bone turnover markers and weight change in candidates for lung transplantation. **Pulm Pharmacol Ther**, v.21, n.1, p.188-95, 2008.

FOX, J.; MILLER, M. A.; RECKER, R. R.; BARE, S. P.; SMITH, S. Y.; MOREAU, I. Treatment of postmenopausal osteoporotic women with parathyroid hormone 1-84 for 18 months increases cancellous bone formation and improves cancellous architecture: a study of iliac crest biopsies using histomorphometry and micro computed tomography. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v.5, n.4, p.356-7, Oct./Dec. 2005.

FRANCO, C. B.; PAZ-FILHO, G.; GOMES, P. E.; NASCIMENTO, V. B.; KULAK, C. A.; BOGUSZEWSKI, C. L.; BORBA, V. Z. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with osteoporosis and low levels of vitamin D. **Osteoporos Int**, Mar. 2009.

FROMER, L.; COOPER, C. B. A review of the GOLD guidelines for the diagnosis and treatment of patients with COPD. **Int J Clin Pract**, v.62, n.8, p.1219-36, Aug. 2008.

FROST, H. M. Preparation of thin undecalcified bone sections by rapid manual method. **Stain Technol**, v.33, n.6, p.273-7, Nov. 1958.

FROST, H. M. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. **Calcif Tissue Res**, v.3, n.3, p.211-37, 1969.

FUJIMOTO, H.; FUJIMOTO, K.; UEDA, A.; OHATA, M. Hypoxemia is a risk factor for bone mass loss. **J Bone Miner Metab**, v.17, n.3, p.211-6, 1999.

GARCIA CARASCO, M.; DE VERNEJOU, M. C.; STERKERS, Y.; MORIEUX, C.; KUNTZ, D.; MIRAVET, L. Decreased bone formation in osteoporotic patients compared with age-matched controls. **Calcif Tissue Int**, v.44, n.3, p.173-5, Mar. 1989.

GARNERO, P.; DELMAS, P. D. Bone markers. **Baillieres Clin Rheumatol**, v.11, n.3, p.517-37, Aug. 1997.

GILBERT, L.; HE, X.; FARMER, P.; BODEN, S.; KOZLOWSKI, M.; RUBIN, J.; NANES, M. S. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. **Endocrinology**, v.141, n.11, p.3956-64, Nov. 2000.

GINDE, A. A.; MANSBACH, J. M.; CAMARGO JR., C. A. Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Arch Intern Med**, v.169, n.4, p.384-90, 23 Feb. 2009.

GINDE, A. A.; MANSBACH, J. M.; CAMARGO JR., C. A. Vitamin D, respiratory infections, and asthma. **Curr Allergy Asthma Rep**, v.9, n.1, p.81-7, Jan. 2009.

GLUCK, O.; COLICE, G. Recognizing and treating glucocorticoid-induced osteoporosis in patients with pulmonary diseases. **Chest**, v.125, n.5, p.1859-76, May 2004.

GRAAT-VERBOOM, L.; WOUTERS, E. F.; SMEENK, F. W.; VAN DEN BORNE, B. E.; LUNDE, R.; SPRUIT, M. A. Current status of research on osteoporosis in COPD: a systematic review. **Eur Respir J**, v.34, n.1, p.209-18, Jul. 2009.

HALBERT, R. J.; NATOLI, J. L.; GANO, A.; BADAMGARAV, E.; BUIST, A. S.; MANNINO, D. M. Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. **Eur Respir J**, v.28, n.3, p.523-32, Sep. 2006.

HALPERN, M. T.; SCHMIER, J. K.; VAN KERKHOVE, M. D.; WATKINS, M.; KALBERG, C. J. Impact of long-term inhaled corticosteroid therapy on bone mineral density: results of a meta-analysis. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v.92, n.2, p.201-7; quiz 207-8, 267, Feb. 2004.

HARDY, R.; COOPER, M. S. Bone loss in inflammatory disorders. **J Endocrinol**, v.201, n.3, p.309-20, Jun. 2009.

HAUTANEN, A.; MÄNTTÄRI, M.; KUPARI, M.; SARNA, S.; MANNINEN, V.; FRICK, M. H.; ADLERCREUTZ, H. Cigarette smoking is associated with elevated adrenal androgen response to adrenocorticotropin. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.46, n.2, p.245-51, Aug. 1993.

HILDEBRAND, T.; LAIB, A.; MÜLLER, R.; DEQUEKER, J.; RÜEGSEGG, P. Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. **J Bone Miner Res**, v.14, n.7, p.1167-74, Jul. 1999.

HOFBAUER, L. C.; GORI, F.; RIGGS, B. L.; LACEY, D. L.; DUNSTAN, C. R.; SPELSBERG, T. C.; KHOSLA, S. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. **Endocrinology**, v.140, n.10, p.4382-9, Oct. 1999.

HOLICK, M. F. The role of vitamin D for bone health and fracture prevention. **Curr Osteoporos Rep**, v.4, n.3, p.96-102, Sep. 2006.

HOLICK, M. F. Vitamin D deficiency. **N Engl J Med**, v.357, n.3, p.266-81, Jul. 2007.

HOLICK, M. F.; SIRIS, E. S.; BINKLEY, N.; BEARD, M. K.; KHAN, A.; KATZER, J. T.; PETRUSCHKE, R. A.; CHEN, E.; DE PAPP, A. E. Prevalence of Vitamin D inadequacy among postmenopausal North American women receiving osteoporosis therapy. **J Clin Endocrinol Metab**, v.90, n.6, p.3215-24, Jun. 2005.

HUBBARD, R.; TATTERSFIELD, A.; SMITH, C.; WEST, J.; SMEETH, L.; FLETCHER, A. Use of inhaled corticosteroids and the risk of fracture. **Chest**, v.130, n.4, p.1082-8, Oct. 2006.

IOACHIMESCU, O. C.; STOLLER, J. K. A review of alpha-1 antitrypsin deficiency. **COPD**, v.2, n.2, p.263-75, Jun. 2005.

IWANIEC, U. T.; FUNG, Y. K.; AKHTER, M. P.; HAVEN, M. C.; NESPOR, S.; HAYNATZKI, G. R.; CULLEN, D. M. Effects of nicotine on bone mass, turnover, and strength in adult female rats. **Calcif Tissue Int**, v.68, n.6, p.358-64, Jun. 2001.

JARAD, N. A.; WEDZICHA, J. A.; BURGE, P. S.; CALVERLEY, P. M. An observational study of inhaled corticosteroid withdrawal in stable chronic obstructive pulmonary disease. ISOLDE Study Group. **Respir Med**, v.93, n.3, p.161-6, Mar. 1999.

JICK, H.; PORTER, J. Relation between smoking and age of natural menopause. Report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program, Boston University Medical Center. **Lancet**, v.1, n.8026, p.1354-5, Jun. 1977.

JOHNELL, O.; PAUWELS, R.; LÖFDAHL, C. G.; LAITINEN, L. A.; POSTMA, D. S.; PRIDE, N. B.; OHLSSON, S. V. Bone mineral density in patients with chronic obstructive pulmonary disease treated with budesonide Turbuhaler. **Eur Respir J**, v.19, n.6, p.1058-63, Jun. 2002.

JØRGENSEN, N. R.; SCHWARZ, P.; HOLME, I.; HENRIKSEN, B. M.; PETERSEN, L. J.; BACKER, V. The prevalence of osteoporosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a cross sectional study. **Respir Med**, v.101, n.1, p.177-85, Jan. 2007.

KAMER, A. R.; EL-GHORAB, N.; MARZEC, N.; MARGARONE, J. E.; DZIAK, R. Nicotine induced proliferation and cytokine release in osteoblastic cells. **Int J Mol Med**, v.17, n.1, p.121-7, Jan. 2006.

KANIS, J. A.; JOHNELL, O.; ODEN, A.; JOHANSSON, H.; DE LAET, C.; EISMAN, J. A.; FUJIWARA, S.; KROGER, H.; McCLOSKEY, E. V.; MELLSTROM, D.; MELTON, L. J.; POLS, H.; REEVE, J.; SILMAN, A.; TENENHOUSE, A. Smoking and fracture risk: a meta-analysis. **Osteoporos Int**, v.16, n.2, p.155-62, Feb. 2005.

KANIS, J. A.; MELTON, L.J. 3rd; CHRISTIANSEN, C.; JOHNSTON, C. C.; KHALTAEV, N. The diagnosis of osteoporosis. **J Bone Miner Res**, v.9, n.8, p.1137-41, Aug. 1994.

KAZAKIA, G. J.; BURGHARDT, S.; CHEUNG, S.; MAJUMDAR, S. Assessment of bone tissue mineralization by conventional x-ray microcomputed tomography: comparison with synchrotron radiation microcomputed tomography and ash measurements. **Med Phys**, v.35, n.7, Jul. 2008.

KIM, C. H.; ZHANG, H.; MIKHAIL, G.; VON STECHOW, D.; MÜLLER, R.; KIM, H. S.; GUO, X. E. Effects of thresholding techniques on microCT-based finite element models of trabecular bone. **J Biomech Eng**, v.129, n.4, p.481-6, Aug. 2007.

KIMMEL, D. B.; RECKER, R. R.; GALLAGHER, J. C.; VASWANI, A. S.; ALOIA, J. F. A comparison of iliac bone histomorphometric data in post-menopausal osteoporotic and normal subjects. **Bone Miner**, v.11, n.2, p.217-35, Nov. 1990.

KJENSLI, A.; MOWINCKEL, P.; RYG, M. S.; FALCH, J. A. Low bone mineral density is related to severity of chronic obstructive pulmonary disease. **Bone**, v.40, n.2, p.493-7, Feb. 2007.

KLEEREKOPER, M.; VILLANUEVA, A. R.; STANCIU, J.; RAO, D. S.; PARFITT, A. M. The role of three-dimensional trabecular microstructure in the pathogenesis of vertebral compression fractures. **Calcif Tissue Int**, v.37, n.6, p.594-7, Dec. 1985.

KNUDSON, R. J.; BURROWS, B.; LEBOWITZ, M. D. The maximal expiratory flow-volume curve: its use in the detection of ventilatory abnormalities in a population study. **Am Rev Respir Dis**, v.114, n.5, p.871-9, Nov. 1976.

KOCHETKOVA, E. A.; GEL'TSER, B. I.; SEMISOTOVA, E. F.; VOLKOVA, M. V. [Biochemical and immunological markers of osteoporosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease]. **Klin Med (Mosk)**, v.80, n.10, p.31-5, 2002.

KOMULAINEN, M.; KRÖGER, H.; TUPPURAINEN, M. T.; HEIKKINEN, A. M.; HONKANEN, R.; SAARIKOSKI, S. Identification of early postmenopausal women with no bone response to HRT: results of a five-year clinical trial. **Osteoporos Int**, v.11, n.3, p.211-8, 2000.

KULAK, C. A.; BORBA, V. Z.; BILEZIKIAN, J. P.; SILVADO, C. E.; PAOLA, L.; BOGUSZEWSKI, C. L. Bone mineral density and serum levels of 25 OH vitamin D in chronic users of antiepileptic drugs. **Arq Neuropsiquiatr**, v.62, n.4, p.940-8, Dec. 2004.

LARSEN, E. R.; MOSEKILDE, L.; FOLDSPANG, A. Vitamin D and calcium supplementation prevents osteoporotic fractures in elderly community dwelling residents: a pragmatic population-based 3-year intervention study. **J Bone Miner Res**, v.19, n.3, p.370-8, Mar. 2004.

LAW, M. R.; HACKSHAW, A. K. A meta-analysis of cigarette smoking, bone mineral density and risk of hip fracture: recognition of a major effect. **BMJ**, v.315, n.7112, p.841-6, Oct. 1997.

LI, L.; BRENNAN, K. J.; GAUGHAN, J. P.; CICOLELLA, D. E.; KUZMA, A. M.; CRINER, G. J. African Americans and men with severe COPD have a high prevalence of osteoporosis. **COPD**, v.5, n.5, p.291-7, Oct. 2008.

LINDSAY, R.; ZHOU, H.; COSMAN, F.; NIEVES, J.; DEMPSTER, D. W.; HODSMAN, A. B. Effects of a one-month treatment with PTH(1-34) on bone formation on cancellous, endocortical, and periosteal surfaces of the human ilium. **J Bone Miner Res**, v.22, n.4, p.495-502, Apr. 2007.

LIPWORTH, B. J. Systemic adverse effects of inhaled corticosteroid therapy: a systematic review and meta-analysis. **Arch Intern Med**, v.159, n.9, p.941-55, 10 May 1999.

LORA, F. L.; AMARANTE, H. M.; PISANI, J. C.; BORBA, V. V.; KULAK, C. A.; CARMES, E. R. [Bone mineral density evaluation in inflammatory bowel disease patients]. **Arq Gastroenterol**, v.42, n.4, p.201-5, Oct./Dec. 2005.

LORENTZON, M.; MELLSTRÖM, D.; HAUG, E.; OHLSSON, C. Smoking is associated with lower bone mineral density and reduced cortical thickness in young men. **J Clin Endocrinol Metab**, v.92, n.2, p.497-503, Feb. 2007.

LUNG HEALTH STUDY RESEARCH GROUP. Effect of inhaled triamcinolone on the decline in pulmonary function in chronic obstructive pulmonary disease. **N Engl J Med**, v.343, n.26, p.1902-9, 28 Dec. 2000.

MALABANAN, A.; VERONIKIS, I. E.; HOLICK, M. F. Redefining vitamin D insufficiency. **Lancet**, v.351, n.9105, p.805-6, Mar. 1998.

MARSHALL, D.; JOHNELL, O.; WEDEL, H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. **BMJ**, v.312, n.7041, p.1254-9, May 1996.

MATSUMOTO, H.; ISHIHARA, K.; HASEGAWA, T.; UMEDA, B.; NIIMI, A.; HINO, M. Effects of inhaled corticosteroid and short courses of oral corticosteroids on bone mineral density in asthmatic patients: a 4-year longitudinal study. **Chest**, v.120, n.5, p.1468-73, Nov. 2001.

McEVOY, C. E.; ENSRUD, K. E.; BENDER, E.; GENANT, H. K.; YU, W.; GRIFFITH, J. M.; NIEWOEHRER, D. E. Association between corticosteroid use and vertebral fractures in older men with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v.157, n.3, Pt 1, p.704-9, Mar. 1998.

McKINLAY, S. M.; BIFANO, N. L.; McKINLAY, J. B. Smoking and age at menopause in women. **Ann Intern Med**, v.103, n.3, p.350-6, Sep. 1985.

MEEK, M. D.; FINCH, G. L. Diluted mainstream cigarette smoke condensates activate estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor-mediated gene transcription. **Environ Res**, v.80, n.1, p.9-17, Jan. 1999.

MENEZES, A. M.; PEREZ-PADILLA, R.; HALLAL, P. C.; JARDIM, J. R.; MUIÑO, A.; LOPEZ, M. V.; VALDIVIA, G.; PERTUZE, J.; MONTES DE OCA, M.; TÁLAMO, C.; PLATINO TEAM. Worldwide burden of COPD in high- and low-income countries. Part II. Burden of chronic obstructive lung disease in Latin America: the PLATINO study. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.12, n.7, p.709-12, Jul. 2008.

MICHNOVICZ, J. J.; HERSHCOPF, R. J.; NAGANUMA, H.; BRADLOW, H. L.; FISHMAN, J. Increased 2-hydroxylation of estradiol as a possible mechanism for the anti-estrogenic effect of cigarette smoking. **N Engl J Med**, v.315, n.21, p.1305-9, Nov. 1986.

MÜLLER, R.; HAHN, M.; VOGEL, M.; DELLING, G.; RÜEGSEGGER, P. Morphometric analysis of noninvasively assessed bone biopsies: comparison of high-resolution computed tomography and histologic sections. **Bone**, v.18, n.3, p.215-20, Mar. 1996.

MÜLLER, R.; HILDEBRAND, T.; RÜEGSEGGER, P. Non-invasive bone biopsy: a new method to analyse and display the three-dimensional structure of trabecular bone. **Phys Med Biol**, v.39, n.1, p.145-64, Jan. 1994.

NAGPAL, S.; NA, S.; RATHNACHALAM, R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. **Endocr Rev**, v.26, n.5, p.662-87, Aug. 2005.

NAKAYAMA, Y.; MEZAWA, M.; ARAKI, S.; SASAKI, Y.; WANG, S.; HAN, J.; LI, X.; TAKAI, H.; OGATA, Y. Nicotine suppresses bone sialoprotein gene expression. **J Periodontal Res**, Nov. 2008.

NIH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL ON OSTEOPOROSIS PREVENTION, DIAGNOSIS, AND THERAPY. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. **JAMA**, v.285, n.6, p.785-95, Feb. 2001.

NUTI, R.; SIVIERO, P.; MAGGI, S.; GUGLIELMI, G.; CAFFARELLI, C.; CREPALDI, G.; GONNELLI, S. Vertebral fractures in patients with chronic obstructive pulmonary disease: the EOLO Study. **Osteoporos Int**, v.20, n.6, p.989-98, Jun. 2009.

ODGAARD, A.; GUNDERSEN, H. J. Quantification of connectivity in cancellous bone, with special emphasis on 3-D reconstructions. **Bone**, v.14, n.2, p.173-82, Mar./Apr. 1993.

OLOFSSON, H.; BYBERG, L.; MOHSEN, R.; MELHUS, H.; LITHELL, H.; MICHAËLSSON, K. Smoking and the risk of fracture in older men. **J Bone Miner Res**, v.20, n.7, p.1208-15, Jul. 2005.

OSTERTAG, A.; COHEN-SOLAL, M.; AUDRAN, M.; LEGRAND, E.; MARTY, C.; CHAPPARD, D.; DE VERNEJOUL, M. C. Vertebral fractures are associated with increased cortical porosity in iliac crest bone biopsy of men with idiopathic osteoporosis. **Bone**, v.44, n.3, p.413-7, Mar. 2009.

PAPAIOANNOU, A.; PARKINSON, W.; FERKO, N.; PROBYN, L.; IOANNIDIS, G.; JURRIAANS, E.; COX, G.; COOK, R. J.; KUMBHARE, D.; ADACHI, J. D. Prevalence of vertebral fractures among patients with chronic obstructive pulmonary disease in Canada. **Osteoporos Int**, v.14, n.11, p.913-7, Nov. 2003.

PARFITT, A. M. The physiologic and Clinical Significance of Bone Histomorphometric Data. In: RECKER, R. (Ed.). **Bone histomorphometry: techniques and interpretation**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1983a. p.143-244.

PARFITT, A. M. Stereologic Basis of Bone Histomorphometry: theory of quantitative microscopy and reconstruction of third dimension. In: RECKER, R. (Ed.). **Bone histomorphometry: technique and interpretation**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1983b. p.53-85

PARFITT, A. M. The cellular basis of bone remodeling: the quantum concept reexamined in light of recent advances in the cell biology of bone. **Calcif Tissue Int**, v.36, Suppl 1, p.S37-45, 1984.

PARFITT, A. M.; DREZNER, M. K.; GLORIEUX, F. H.; KANIS, J. A.; MALLUCHE, H.; MEUNIER, P. J.; OTT, S. M.; RECKER, R. R. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. **J Bone Miner Res**, v.2, n.6, p.595-610, Dec. 1987.

PARISIEN, M.; COSMAN, F.; MORGAN, D.; SCHNITZER, M.; LIANG, X.; NIEVES, J.; FORESE, L.; LUCKEY, M.; MEIER, D.; SHEN, V.; LINDSAY, R.; DEMPSTER, D. W. Histomorphometric assessment of bone mass, structure, and remodeling: a comparison between healthy black and white premenopausal women. **J Bone Miner Res**, v.12, n.6, p.948-57, Jun. 1997.

PARK, J. H.; PARK, B. H.; KIM, H. K.; PARK, T. S.; BAEK, H. S. Hypoxia decreases Runx2/Cbfa1 expression in human osteoblast-like cells. **Mol Cell Endocrinol**, v.192, n.1-2, p.197-203, Jun. 2002.

PEARCE, G.; TABENSKY, D. A.; DELMAS, P. D.; BAKER, H. W.; SEEMAN, E. Corticosteroid-induced bone loss in men. **J Clin Endocrinol Metab**, v.83, n.3, p.801-6, Mar. 1998.

PEREIRA, C. A. C.; NEDES, J. A. (Eds.) Diretrizes para testes de função pulmonar. **J Pneumol**, v.28, n.3, p.2-237, 2002.

PINHEIRO, M. M.; CICONELLI, R. M.; MARTINI, L. A.; FERRAZ, M. B. Clinical risk factors for osteoporotic fractures in Brazilian women and men: the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). **Osteoporos Int**, v.20, n.3, p.399-408, Mar. 2009.

RABE, K. F.; HURD, S.; ANZUETO, A.; BARNES, P. J.; BUIST, S. A.; CALVERLEY, P.; FUKUCHI, Y.; JENKINS, C.; RODRIGUEZ-ROISIN, R.; VAN WEEL, C.; ZIELINSKI, J.; GLOBAL INITIATIVE FOR CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. **Am J Respir Crit Care Med**, v.176, n.6, p.532-55, Sep. 2007.

RAO, D. S.; MATKOVIC, V.; DUNCAN, H. Transiliac Bone Biopsy: Complications and diagnostic value. **Henry Ford Med**, v.28, p.112-118, 1980.

RAUCH, F.; TRAVERS, R.; GLORIEUX, F. H. Cellular activity on the seven surfaces of iliac bone: a histomorphometric study in children and adolescents. **J Bone Miner Res**, v.21, n.4, p.513-9, Apr. 2006.

RECKER, R. R.; DELMAS, P. D.; HALSE, J.; REID, I. R.; BOONEN, S.; GARCÍA-HERNANDEZ, P. A.; SUPRONIK, J.; LEWIECKI, E. M.; OCHOA, L.; MILLER, P.; HU, H.; MESENBRINK, P.; HARTL, F.; GASSER, J.; ERIKSEN, E. F. Effects of intravenous zoledronic acid once yearly on bone remodeling and bone structure. **J Bone Miner Res**, v.23, n.1, p.6-16, Jan. 2008.

RECKER, R. R.; KIMMEL, D. B.; PARFITT, A. M.; DAVIES, K. M.; KESHAWARZ, N.; HINDERS, S. Static and tetracycline-based bone histomorphometric data from 34 normal postmenopausal females. **J Bone Miner Res**, v.3, n.2, p.133-44, Apr. 1988.

RECKER, R. R.; MARIN, F.; ISH-SHALOM, S.; MÖRICKE, R.; HAWKINS, F.; KAPETANOS, G.; DE LA PEÑA, M. P.; KEKOW, J.; FARRERONS, J.; SANZ, B.; OERTEL, H.; STEPAN, J. Comparative effects of teriparatide and strontium ranelate on bone biopsies and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with osteoporosis. **J Bone Miner Res**, v.24, n.8, p.1358-68, Aug. 2009a.

RECKER, R. R.; STE-MARIE, L. G.; LANGDAHL, B.; MASANAUSKAITE, D.; ETHGEN, D.; DELMAS, P. D. Oral ibandronate preserves trabecular microarchitecture: micro-computed tomography findings from the oral iBandronate Osteoporosis vertebral fracture trial in North America and Europe study. **J Clin Densitom**, v.12, n.1, p.71-6, Jan./Mar. 2009b.

REGIONAL COPD WORKING GROUP. COPD prevalence in 12 Asia-Pacific countries and regions: projections based on the COPD prevalence estimation model. **Respirology**, v.8, n.2, p.192-8, Jun. 2003.

RIANCHO, J. A.; ZARRABEITIA, M. T.; GONZÁLEZ MARCÍAS, J. [Vitamin D and the function of macrophages]. **Med Clin (Barc)**, v.89, n.1, May 30, p.39. 1987.

RICHY, F.; BOUSQUET, J.; EHRLICH, G. E.; MEUNIER, P. J.; ISRAEL, E.; MORIL, H.; DEVOGELAER, J. P.; PEEL, N.; HAIM, M.; BRUYERE, O.; REGINSTER, J. Y. Inhaled corticosteroids effects on bone in asthmatic and COPD patients: a quantitative systematic review. **Osteoporos Int**, v.14, n.3, p.179-90, May 2003.

ROTHEM, D. E.; ROTHEM, L.; SOUDRY, M.; DAHAN, A.; ELIAKIM, R. Nicotine modulates bone metabolism-associated gene expression in osteoblast cells. **J Bone Miner Metab**, v.27, n.5, p.555-61, 2009.

RÜEGSEGGER, P.; KOLLER, B.; MÜLLER, R. A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. **Calcif Tissue Int**, v.58, n.1, p.24-9, Jan. 1996.

SARAIVA, G. L.; CENDOROGLIO, M. S.; RAMOS, L. R.; ARAÚJO, L. M.; VIEIRA, J. G.; MAEDA, S. S.; BORBA, V. Z.; KUNII, I.; HAYASHI, L. F.; LAZARETTI-CASTRO M. [Prevalence of vitamin D deficiency, insufficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly inpatients and living in the community of the city of Sao Paulo, Brazil]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.51, n.3, p.437-42, Apr. 2007.

SCANLON, P. D.; CONNETT, J. E.; WISE, R. A.; TASHKIN, D. P.; MADHOK, T.; SKEANS, M.; CARPENTER, P. C.; BAILEY, W. C.; BUIST, A. S.; EICHENHORN, M.; KANNER, R. E.; WEINMANN, G.; LUNG HEALTH STUDY RESEARCH GROUP. Loss of bone density with inhaled triamcinolone in Lung Health Study II. **Am J Respir Crit Care Med**, v.170, n.12, p.1302-9, Dec. 2004.

SCHLAICH, C.; MINNE, H. W.; BRUCKNER, T.; WAGNER, G.; GEBEST, H. J.; GRUNZE, M.; ZIEGLER, R.; LEIDIG-BRUCKNER, G. Reduced pulmonary function in patients with spinal osteoporotic fractures. **Osteoporos Int**, v.8, n.3, p.261-7, 1998.

SEARING, D. A.; ZHANG, Y.; MURPHY, J. R.; HAUK, P. J.; GOLEVA, E.; LEUNG, D. Y. Decreased serum vitamin D levels in children with asthma are associated with increased corticosteroid use. **J Allergy Clin Immunol**, v.125, n.5, p.995-1000, May 2010.

SEEMAN, E.; DELMAS, P. D. Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. **N Engl J Med**, v.354, n.21, p.2250-61, May 2006.

SHANE, E.; RIVAS, M.; McMAHON, D. J.; STARON, R. B.; SILVERBERG, S. J.; SEIBEL, M. J.; MANCINI, D.; MICHLER, R. E.; AARONSON, K.; ADDESSO, V.; LO, S. H. Bone loss and turnover after cardiac transplantation. **J Clin Endocrinol Metab**, v.82, n.5, p.1497-506, May 1997.

SORNAY-RENDU, E.; CABRERA-BRAVO, J. L.; BOUTROY, S.; MUNOZ, F.; DELMAS, P. D. Severity of vertebral fractures is associated with alterations of cortical architecture in postmenopausal women. **J Bone Miner Res**, v.24, n.4, p.737-43, Apr. 2009.

SOUZA, H. N.; LORA, F. L.; KULAK, C. A.; MAÑAS, N. C.; AMARANTE, H. M.; BORBA, V. Z. [Low levels of 25-hydroxyvitamin D (25OHD) in patients with inflammatory bowel disease and its correlation with bone mineral density]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.52, n.4, p.684-91, Jun. 2008.

STAUBER, M.; MÜLLER, R. Volumetric spatial decomposition of trabecular bone into rods and plates--a new method for local bone morphometry. **Bone**, v.38, n.4, p.475-84, Apr. 2006.

STEIN, E.; SHANE, E. Secondary osteoporosis. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v.32, n.1, p.115-34, vii, Mar. 2003.

STOCKLEY, R. A. Neutrophils and the pathogenesis of COPD. **Chest**, v.121, n.5, Suppl, p.151S-155S, May 2002.

SUPERVÍA, A.; NOGUÉS, X.; ENJUANES, A.; VILA, J.; MELLIBOVSKY, L.; SERRANO, S.; AUBÍA, J.; DÍEZ-PÉREZ, A. Effect of smoking and smoking cessation on bone mass, bone remodeling, vitamin D, PTH and sex hormones. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v.6, n.3, p.234-41, Jul./Sep. 2006.

SUTHERLAND, E. R.; GOLEVA, E.; JACKSON, L. P.; STEVENS, A. D.; LEUNG, D. Y.M. Vitamin D levels, lung function, and steroid response in adult asthma. **Am J Respir Crit Care Med**, v.181, n.7, p.699-704, 1 Apr. 2010.

TAKABATAKE, N.; NAKAMURA, H.; ABE, S.; INOUE, S.; HINO, T.; SAITO, H.; YUKI, H.; KATO, S.; TOMOIKE, H. The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor-alpha system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Crit Care Med**, v.161, n.4, Pt 1, p.1179-84, Apr. 2000.

VEDI, S.; COMPSTON, J. E.; WEBB, A.; TIGHE, J. R. Histomorphometric analysis of bone biopsies from the iliac crest of normal British subjects. **Metab Bone Dis Relat Res**, v.4, n.4, p.231-6, 1982.

VESTERGAARD, P.; MOSEKILDE, L. Fracture risk associated with smoking: a meta-analysis. **J Intern Med**, v.254, n.6, p.572-83, Dec. 2003.

VRIEZE, A.; DE GREEF, M. H.; WIJKSTRA, P. J.; WEMPE, J. B. Low bone mineral density in COPD patients related to worse lung function, low weight and decreased fat-free mass. **Osteoporos Int**, v.18, n.9, p.1197-202, Sep. 2007.

WALKER, L. M.; PRESTON, M. R.; MAGNAY, J. L.; THOMAS, P. B.; EL HAJ, A. J. Nicotinic regulation of c-fos and osteopontin expression in human-derived osteoblast-like cells and human trabecular bone organ culture. **Bone**, v.28, n.6, p.603-8, Jun. 2001.

WARD, K. D.; KLESGES, R. C. A meta-analysis of the effects of cigarette smoking on bone mineral density. **Calcif Tissue Int**, v.68, n.5, p.259-70, May 2001.

YANBAEVA, D. G.; DENTENER, M. A.; CREUTZBERG, E. C.; WESSELING, G.; WOUTERS, E. F. Systemic effects of smoking. **Chest**, v.131, n.5, p.1557-66, May 2007.

ANEXOS

ANEXO 1
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EXAMES
COMPLEMENTARES DAS PACIENTES COM DPOC

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS PACIENTES COM DPOC

NOME	IDADE	IMC	RAÇA	TABAGISMO ATUAL	ANOS DE TABAGISMO	TABAGISMO ANOS/MAÇO	FRATURA	ANOS DE MENOPAUSA	TERAPIA HORMONAL	ANOS DPOC	GLICOCORTICÓIDE INALATÓRIO
1-GR	61	26,1	Branca	Não	45	69	Não	15	Não	10	Não
2-MSS	61	26,5	Branca	Sim	46	45	Não	25	Não	1	Não
3-JP	64	24,1	Branca	Não	40	20	Não	14	Não	5	Sim
4-AC	74	22,4	Branca	Sim	60	32	Não	20	Não	0,5	Não
5-DS	51	23,9	Branca	Sim	40	20	Não	10	Sim	0,5	Não
6-CNP	66	21,6	Branca	Não	50	43	Sim	26	Não	20	Não
7-RC	54	29,6	Branca	Sim	47	10	Sim	2	Sim	5	Sim
8-TCM	68	30,5	Branca	Sim	58	20	Não	28	Não	10	Sim
9-DP	57	20,0	Parda	Sim	43	60	Não	9	Não	0,5	Não
10-MAV	53	21,0	Parda	Sim	40	40	Sim	4	Não	7	Não
11-RSZ	69	18,0	Branca	Não	50	30	Sim	24	Não	10	Sim
12-HSK	61	22,3	Branca	Não	30	15	Sim	27	Não	1	Não
13-MLDP	61	21,9	Branca	Não	55	25	Sim	15	Não	0,5	Não
14-MLP	67	22,5	Parda	Sim	50	25	Sim	25	Não	2	Não
15-MNS	57	30,8	Branca	Não	35	6	Não	14	Sim	10	Sim
16-MJS	48	22,4	Parda	Sim	40	35	Não	7	Sim	2	Sim
17-DAS	72	30,4	Parda	Sim	60	50	Não	20	Não	2	Sim
18-RSE	68	23,3	Branca	Não	50	37	Sim	18	Não	1	Não
19-CMS	69	28,0	Branca	Não	40	30	Não	20	Não	3	Sim
20-LL	67	24,5	Branca	Sim	40	50	Sim	22	Sim	10	Sim

CLASSIFICAÇÃO DA DPOC, PROVA DE FUNÇÃO PULMONAR E GASOMETRIA ARTERIAL

NOME	CLASSIFI- CAÇÃO GOLD	VEF ₁ PREVISTO	VEF ₁ OBTIDO	VEF ₁ /CVF	pH	Bic	PaO ₂	PaCO ₂	Sat O ₂	OXIMETRIA
1-GR	II	55	54	70	7,42	18,1	75,3	28,1	95,7	93
2-MSS	II	65	73	69	7,47	24,3	60,1	34,1	92,7	93
3-JP	III	30	42	39	7,46	20,8	73,5	30,8	96	96
4-AC	II	56	61	53	7,39	26,9	52,1	45	86,6	96
5-DS	II	75	79	62						96
6-CNP	I	73	83	50	7,47	23,9	92,1	33,3	97,1	97
7-RC	III	27	38	30	7,45	26,9	54,1	43,5	88,5	90
8-TCM	IV	22	25	41	7,29	20,4	81,3	42,6	94,9	87
9-DP	I	129	145	69	7,4	20,8	68,3	34,3	93,9	97
10-MAV	II	63	63	70	7,38	22,2	76,1	38	95,1	96
11-RSZ	IV	22	22	35	7,42	35,5	48,9	55,5	84,5	70
12-HSK	I	107	115	58	7,44	26,8	69,9	40,4	94,6	94
13-MLDP	II	58	58	41	7,41	19,6	65,5	31	93,5	94
14-MLP	I	77	84	62	7,43	27,4	70,9	41,5	94,8	95
15-MNS	II	49	61	54	7,43	26,3	66,9	40	93,9	94
16-MJS	III	42	44	69	7,37	24,1	72,1	41,9	94,2	94
17-DAS	III	48	41	49	7,36	18,1	64,9	32,8	92,2	94
18-RSE	II	56	59	61	7,45	19,8	78,5	28,8	96,3	95
19-CMS	II	48	51	60	7,33	28,8	39,7	55,4	70,1	91
20-LL	IV	46	48	37	7,49	25,9	55,8	34,6	88,5	91

DENSITOMETRIA ÓSSEA E DOSAGENS LABORATORIAIS DAS PACIENTES COM DPOC

NOME	LSDMO	FNDMO	FTDMO	CÁLCIO	FÓSFORO	CREATININA	FOSFATASE ALCALINA	PTH	25OHD
1-GR	0,674	0,755	0,827	9,4	4,1	0,6	106	108,00	15,3
2-MSS	0,832	0,841	0,898	9	2,7	0,6	76	48,90	32,2
3-JP	0,819	0,626	0,752	10,3	4,5	1,1	166	59,00	23,9
4-AC	0,676	0,735	0,633	9,3	2,8	1	76	42,20	21
5-DS	0,734	0,664	0,731	8,9	5,6	0,9	206	26,40	24,2
6-CNP	0,490	0,565	0,635	9,1	3,6	0,8	166	77,70	19
7-RC	0,719	0,644	0,763	9	2,3	0,9	46	42,80	50,3
8-TCM	0,687	0,637	0,690	8,6	3,9	1	69	52,00	11,4
9-DP	0,528	0,594	0,580	9,2	3,8	0,7	110	37,90	21,7
10-MAV	0,735	0,678	0,737	9,3	4,6	0,8	82	41,30	7,79
11-RSZ	0,470	0,390	0,455	9,4	3,3	0,6	98	46,80	11,5
12-HSK	0,642	0,580	0,655	9,3	4,1	0,7	211	51,30	29,9
13-MLDP	0,558	0,473	0,531	8,8	3,8	0,8	115	87,20	9,42
14-MLP	0,710	0,639	0,680	10	4,5	0,7	128	23,70	21,8
15-MNS	0,753	0,618	0,672	9,3	3	1	50	43,10	7,65
16-MJS	0,633	0,538	0,709	9,9	4	0,8	87	22,50	23,3
17-DAS	0,725	0,933	0,705	8,9	3,9	1	93	41,00	31,3
18-RSE	0,494	0,611	0,598	9,2	3,6	0,9	94	56,60	19,1
19-CMS	0,662	0,473	0,593	9,2	4	0,9	90	54,30	30,1
20-LL	0,605	0,591	0,612	9,4	2,9	0,8	104	74,80	26,1

ANEXO 2
RESULTADO HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA DAS PACIENTE COM DPOC

NOME	Ct.Wi	Ct.Ar	Ct.PO.Ar	BVTV	BSTV	Tb.Wi	Tb.N	Tb.Sp	Ct.PO.N	O.Wi	OS/BS
1-GR	581	5,83	0,32	8,69	1,83	95,2	0,91	1097	4,99	3,5	14,37
2-MSS	476	5,19	0,2	15,67	2,26	135,2	1,13	897	5,19	3,5	23,07
3-JP	660	6,49	0,25	19,56	3,22	121,97	1,59	620	5,19	3,5	9,16
4-AC	309	2,92	0,11	7,06	1,82	76,48	0,9	1177	3,6	2	10,29
5-DS	353	3,51	0,21	17,8	3,19	111,22	1,59	615	4,21	4	9,03
6-CNP	715	7,76	0,52	23,62	3,93	120,21	1,96	498	4,99	7	12,00
7-RC	431	4,71	0,35	21,16	4,08	103,6	2,04	479,9	3,89	7	18,41
8-TCM	340	3,4	0,57	17,88	3,71	96,26	1,85	529,4	4,14	2	6,29
9-DP	1088	8,71	0,84	13,43	2,14	125,73	1,07	927,3	5,22	4	20,18
10-MAV	428	4,42	0,16	15,76	3,03	104,16	1,51	652,1	3,58	4,5	6,27
11-RSZ	245	2,08	0,07	10,91	3,28	66,41	1,64	603	4,79	2,5	12,66
12-HSK	323	3,12	0,26	15,35	3,07	100,03	1,53	643	3	3,5	12,92
13-MLDP	716	6,61	0,22	16,45	3,39	97,15	1,69	580,4	3,43	4,5	28,13
14-MLP	460	5,38	0,29	8,72	1,95	89,26	0,97	1016,5	3,19	5	20,13
15-MNS	230	2,14	0,038	18,55	3,39	109,9	1,69	589,5	4,21	2	12,38
16-MJS	541	5,41	0,19	12,18	2,75	88,4	1,37	718,9	4,62	2,5	7,76
17-DAS	233	2,03	0,02	26,04	3,44	151,3	1,72	566	2,25	2,5	10,03
18-RSE	270	2,63	0,11	8,84	1,76	100,86	0,87	1133	1,7	2	16,14
19-CMS	454	4,21	0,1	11,71	2,38	98,21	1,19	830	5,12	3	12,94
20-LL	307	3,22	0,17	12,68	3,87	79,16	1,6	621	4,83	1	3,05
NOME	ES/BS	BFR	MAR	MS	Aj.AR	O.Wi	OS.BS	ES/BS	BFR	MAR	MS.BS
1-GR	4,94	0,03	0,61	6,58	0,20	3	27,92	2,48	0,13	1,03	13,03
2-MSS	11,53	0,04	0,51	11,94	0,17	5	31,92	1,12	0,13	0,72	18,15
3-JP	5,4	0,02	0,51	5,54	0,21	3,5	6,47	0,71	0,03	0,8	4,58
4-AC	3,93	0,007	0,4	2,32	0,06	2,5	12,24	1,72	0,025	0,76	4,77
5-DS	3,18	0,04	0,76	6,58	0,44	3,5	11,68	2,32	0,0079	0,84	1,41
6-CNP	2,56	0,031	0,56	5,67	0,25	3	21,35	4,66	0,03	0,55	3,77
7-RC	2,2	0,012	0,76	4,42	0,06	2,5	15,56	0,36	0,017	0,66	3,35
8-TCM	2,88	0,006	0,64	0,95	0,09	2	3,82	0,99	0,008	0,46	0,97
9-DP	7,92	0,04	0,65	11,54	0,24	3,5	37,02	3,14	0,38	1,07	36,54
10-MAV	2,06	0,04	0,63	5,77	0,64	3,5	11,32	0,56	0,056	0,58	9,8
11-RSZ	3,06	0,047	0,64	7,48	0,23	4,5	15,61	0	0,067	0,77	8,83
12-HSK	1,89	0,018	0,53	3,72	0,07	4	14,84	0,24	0,11	0,73	15,34
13-MLDP	4,4	0,032	0,59	5,69	0,11	4	17,27	4,53	0,123	1,11	11,76
14-MLP	2,53	0,031	0,58	5,71	0,15	4,5	19,03	1,5	0,057	0,76	8,34
15-MNS	0,92	0,02	0,61	3,37	0,16	2	4,67	1	0	0	0
16-MJS	3,46	0,038	0,66	3,9	0,49	2,5	6,99	1,33	0,1	0,83	12,74
17-DAS	0,68	0,0189	0,6	3,24	0,18	1,5	1,48	0,71	0,001	0,15	0,36
18-RSE	2,2	0,016	0,43	3,76	0,09	2	2,94	0,72	0,05	0,52	9,91
19-CMS	3,44	0,02	0,56	3,6	0,15	4	6,4	0,4	0,04	0,97	5,95
20-LL	0,44	0	0	0	0,00	1,5	2,41	0,84	0	0	0

ANEXO 3
RESULTADO DA MICROTOMOGRAFIA ÓSSEA DAS PACIENTES COM DPOC

NOME	μ CT BV/TV	μ CT CONN.D	μ CT SMI	μ CT Tb.N	μ CT Tb.Th	μ CT Tb.Sp	μ CT TMD	μ CT DA
1-GR	10,20	1,72	1,34	0,93	158	1,05	1032	1,84
2-MSS	15,85	3,16	1,23	1,14	157	0,88	1038	1,38
3-JP	17,69	5,43	1,26	1,29	168	0,76	1036	1,41
4-AC	5,45	2,26	2,21	0,98	109	1,01	1049	1,38
5-DS	18,65	7,08	1,21	1,58	145	0,62	1019	1,38
6-CNP	23,10	6,21	0,91	1,50	193	0,64	1039	1,24
7-RC	19,58	8,89	0,89	1,60	141	0,60	999	1,31
8-TCM	18,99	7,19	1,00	1,48	139	0,66	1024	1,19
9-DP	11,33	3,02	2,00	0,87	153	1,21	990	1,58
10-MAV	19,11	6,78	1,12	1,45	150	0,67	1037	1,43
11-RSZ	10,09	5,78	1,54	1,23	91	0,80	1076	1,38
12-HSK	14,26	4,78	1,88	1,29	162	0,74	1041	1,28
13-MLDP	20,95	9,72	0,95	1,59	137	0,62	1003	1,51
14-MLP	8,90	3,43	2,33	1,13	142	0,86	1057	1,17
15-MNS	19,46	10,51	0,94	1,80	126	0,55	992	1,61
16-MJS	10,42	5,63	2,01	1,31	125	0,76	1016	1,32
17-DAS								
18-SER	10,33	2,49	1,43	0,99	134	1,01	1046	1,58
19-CMS	13,79	3,76	1,80	1,14	164	0,87	1047	1,32
20-LL	10,96	9,90	1,87	1,59	102	0,62	1104	1,39

ANEXO 4

RESULTADO DA HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA DO GRUPO CONTROLE

IDENTIF. CONTROLES	Ct.Wi	Ct.Ar	Ct.Po.Ar	BV/TV	BS.TV	Tb.Wi	Tb.N	Tb.Sp	Ct.Po.N	O.Wi	OS.BS
1	571	5,75	0,36	25,56	3,73	137,12	1,86	522	3,12	5	9,24
2	862	10,08	0,68	18,5	2,91	126,7	1,45	675	3,25	4,5	9,56
3	1047	15,8	0,54	25,64	3,45	148,6	1,72	565	2,61	3,5	5,03
4	460	5,3	0,14	9,77	1,86	104,4	0,93	1079	4,26	2,5	8,97
5	996	11,44	0,16	19,66	2,77	141,9	1,38	708	2,35	4	8,15
6	711	8,67	0,29	17,75	2,8	126,3	1,4	702	4,21	5	14,50
7	1197	13,93	0,33	26,45	3,85	137,23	1,92	505	1,2	4	4,79
8	394	3,53	0,38	25,23	3,89	129,7	1,94	502	1,97	3,5	3,00
9	597	6,66	0,44	24,31	4	121,09	2	487,5	4,49	5,5	11,82
10	1080	13,42	0,64	34,11	3,97	171,8	1,98	487	1,91	5	17,84
11	500	7,7	0,25	23,27	4	116,24	2	488	2,59	4,5	8,85
12	606	7,07	0,28	17,3	3,55	97,46	1,77	555	2,54	3,5	14,40
13	652	7,97	0,31	18,33	3,31	110,7	1,65	595	3,06	5	13,71
14	812	9,65	0,23	20,33	3,18	128,3	1,59	619	1,29	4,5	10,06
15	1166	13,38	0,56	24,9	2,86	174,7	1,43	682	1,75	3	5,73
16	924,5	12,49	0,62	22,8	2,74	166,3	1,37	713	2,52	5	8,31
17	1120	13,02	1,32	17,4	2,91	119,7	1,45	677	1,99	5	8,30
18	708	9,13	0,17	20,27	3,64	111,15	1,82	538	1,42	5	7,16
19	854	11,75	0,17	20,5	2,82	145,2	1,41	696	0,66	3	9,33
20	708	5,84	0,19	25,2	2,48	202	1,24	787	2,33	5,5	21,12
21	625	7,7	0,33	19	2,62	144,65	1,31	756	2,14	3	9,23
22	446	5,26	0,07	12,1	2,09	115,9	1,04	945	2,24	4	13,14
23	686,5	7,53	0,26	20	3,34	119,4	1,67	586	1,79	3,5	8,89
24	1093	12,49	0,48	15,6	3,22	96,8	1,61	611	3	2	6,57
25	515	5,43	0,23	16,21	3,19	101,45	1,59	616	3,68	4	10,95
26	771	9,35	0,24	23,67	3,05	155,8	1,52	642	1,28	5	26,82
27	782	9,65	1,38	23,96	4,07	117,6	2,03	479	2,17	6	12,54
28	715,5	8,65	0,3	25,1	3,66	136,91	1,83	538	1,78	5	9,48
29	446	4,95	0,21	18,93	3,43	110,21	1,71	571	1,71	3,5	10,47
30	6,18	6,44	0,28	22,81	3,37	135	1,69	578	3,1	6,5	16,68
31	631	8,07	0,35	21,76	3,39	128,21	1,69	577	1,47	4	12,19
32	638	7,88	0,27	19,38	3,21	120,6	1,6	612	1,57	4	13,00
33	1227	15,41	0,41	25,05	3,22	155,7	1,61	607	1,23	2	3,94

IDENTIF. CONTROLES	ES.BS	BFR	MAR	MS.BS	Aj.AR	O.Wi Endocortical	OS.BS Endocortical	ES.BS Endocortical	BFR Endocortical	MAR Endocortical	MS.BS Endocortical
21	3,33	0,034	0,7	5,35	0,37	3	6,79	0,41	0,015	0,35	2,18
22	3,32	0,093	0,72	13,84	1,01	5	16,05	0,77	0,049	1,03	4,8
23	5,89	0,0104	0,95	1,1	0,2	4	12,48	0,85	0,035	1,17	3,62
24	6,14	0,019	0,51	3,28	0,23	2	7,99	1,705	0,033	0,95	3,53
25	2,84	0,038	0,6	6,29	0,47	3,5	12,51	1,56	0,06	0,78	8,67
26	1,00	0,015	0,44	4,13	0,1	3,5	22,99	0,73	0,067	0,66	8,45
27	2,57	0,025	0,76	3,29	0,53	2,5	0,83	0,46	0,041	1,17	3,55
28	1,99	0,028	0,88	3,2	0,93	2	3,21	0,69	0,0011	0,3	0,39
29	3,42	0,038	0,7	5,17	0,34	5,5	9,32	0,3	0,25	1,12	23,4
30	7,24	0,055	0,7	7,9	0,29	5	21,31	2,32	0,082	0,76	10,51
31	5,99	0,051	0,64	6,89	0,62	3	6,89	1,91	0,017	0,85	2,07
32	4,10	0,014	0,76	1,13	0,1	4,5	8,75	0,08	0,005	0,7	0,77
33	5,54	0,02	0,58	3,36	0,14	3,5	11,55	0,58	0,053	0,75	6,97
34	4,08	0,011	0,58	2,24	0,11	4	7,73	1,35	0,039	0,73	4,61
35	3,02	0,017	0,58	1,92	0,34	2	10,66	2,82	0,038	0,92	4,88
36	6,07	0,224	0,58	2,72	2,75	5,5	6,54	1,16	0,0017	0,3	0,59
37	1,28	0,012	0,79	1,58	0,15	5,5	18,33	0,77	0,015	0,3	3,08
38	4,71	0,01	0,55	1,86	0,14	4,5	13,77	1,17	0,081	0,93	8,98
39	1,93	0,007	0,5	1,68	0,07	4	7,29	0,95	0,023	0,3	4,32
40	8,53	0,126	0,7	16,27	0,59	4	12,58	1,6	0,034	0,71	5,33
41	4,94	0,054	0,72	7,56	0,58	2	3,3	1,51	0,05	0,61	8,31
42	1,44	0,043	0,76	5,72	0,32	3	6,41	1,06	0,035	0,59	6,82
43	2,98	0,022	0,58	3,89	0,25	3,5	10,35	0,87	0,04	0,72	5,43
44	5,32	0,006	0,5	1,14	0,1	3	13,7	0,88	0,07	0,77	11,25
45	2,60	0,016	0,64	2,53	0,16	2,5	6,46	3,91	0,016	0,64	2,7
46	2,63	0,076	0,69	11,04	0,28	3,5	10,18	0,64	0,013	0,8	1,79
47	6,23	0,089	0,74	12,14	0,71	5	13,49	0,31	0,12	0,78	11,14
48	3,50	0,02	0,56	3,72	0,22	2	1,4	0,57	0,034	0,78	4,7
49	7,65	0,03	0,7	2,45	0,3	3	6,26	1,02	0,009	0,74	1,31
50	2,13	0,038	0,57	6,72	0,22	5	20,01	0,72	0,028	0,42	6,86
51	4,27	0,037	0,65	5,78	0,3	2,5	5,7	1,8	0,11	0,78	14,4
52	3,93	0,06	0,6	10	0,46	3	8,54	1,24	0,05	0,67	7,8
53	5,53	0,02	0,97	1,56	0,66	1	1,56	0,41	0,015	0,67	2,24

ANEXO 5
RESULTADO MICROTOMOGRAFIA ÓSSEA DO GRUPO CONTROLE

IDENTIFICAÇÃO CONTROLES μ CT	μ CT BV/TV	μ CT CONN.D	μ CT SMI	μ CT Tb.N	μ CT Tb.Th	μ CT Tb.Sp	μ CT TMD	μ CT DA
1	15,9	5,8	1,2	1,6	134	634	989	1,41
2	20,5	6,9	1,3	1,7	140	574	986	1,36
3	23,6	4,2	1,0	1,3	231	801	987	1,30
4	31,3	11,3	1,3	1,8	210	545	1005	1,28
5	22,5	6,1	1,4	1,6	202	624	1010	1,28
6	13,4	4,1	1,6	1,2	168	814	1017	1,53
7	15,1	8,4	1,5	1,8	141	640	1036	1,42
8	25,3	10,3	1,3	1,9	181	568	972	1,50
9	25,8	8,9	0,7	1,7	198	609	1035	1,37
10	20,1	13,4	2,3	3,1	131	329	1007	1,62
11	21,9	7,1	1,1	1,4	182	617	982	1,42
12	21,70	7,50	1,10	1,6	174	618	1004	1,39
13	20,80	9,20	1,20	1,7	176	609	1001	1,43

ANEXO 6**DADOS CLÍNICOS DO GRUPO CONTROLE DA MICROTOMOGRÁFIA ÓSSEA - μ CT**

IDENTIFICAÇÃO CONTROLES μ CT	IDADE	RAÇA
1	75	Branca
2	49	Branca
3	59	Parda
4	77	Branca
5	49	Parda
6	66	Branca
7	73	Parda
8	49	Parda
9	51	Branca
10	48	Branca
11	62	Branca
12	57	Branca
13	61	Branca

ANEXO 7
DADOS CLÍNICOS DO GRUPO CONTROLES DA HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA

IDENTIFICAÇÃO CONTROLES HISTOMORFOMETRIA	IDADE	ANOS DE MENOPAUSA
1	64	14
2	60	25
3	51	10
4	58	9
5	70	34
6	67	10
7	70	20
8	66	14
9	49	2
10	66	21
11	64	15
12	63	12
13	63	14
14	56	6
15	58	3
16	62	11
17	74	19
18	51	3
19	52	21
20	52	16
21	49	4
22	66	14
23	49	4
24	71	28
25	51	1
26	53	1
27	47	12
28	68	23
29	63	14
30	60	27
31	54	3
32	60	7
33	65	13

ANEXO 8

PARÂMETROS ESTRUTURAIS E ESTÁTICOS DE REMODELAÇÃO DE OSSO TRABECULAR DOS CONTROLES AMERICANOS E BRASILEIROS

PARÂMETROS	CONTROLES AMERICANOS (n=33)	CONTROLES BRASILEIROS (n=11)	VALOR DE p
BV/TV %	21,2±4,6	21,0±6,2	0,93
Ct. Wi (µm)	762±240	816±97	0,41
OS.BS %	10,7±4,9	11,5±8,1	0,70
ES.BS %	4,1±1,5	3,7±0,8	0,52
O.Wi (N.º de camadas)	4,2±1,0	3,9±2,4	0,56

NOTA: Valores são expressos em média±DP.

ANEXO 9
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ANEXO 10
ARTIGOS PUBLICADOS