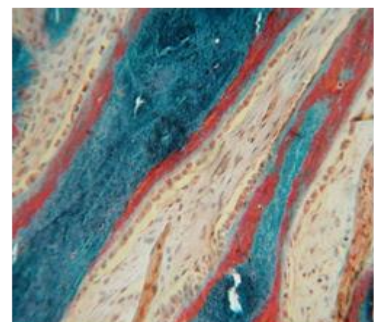
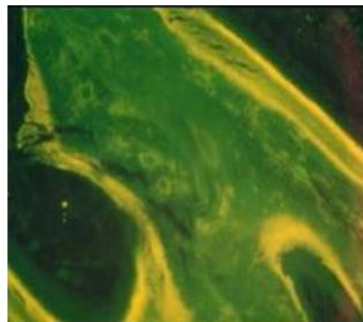
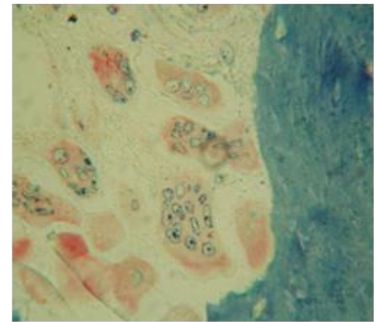
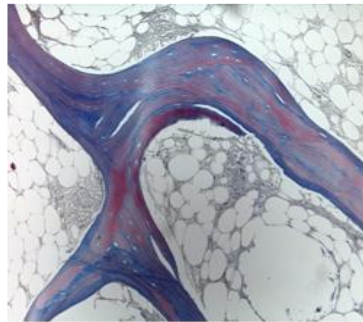
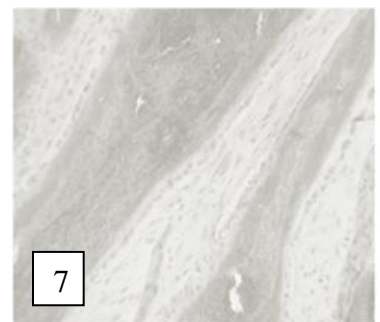
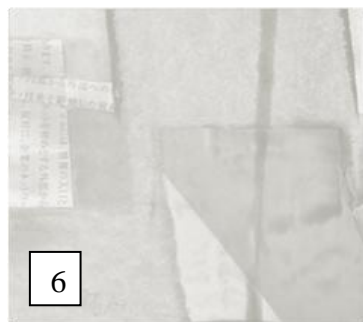
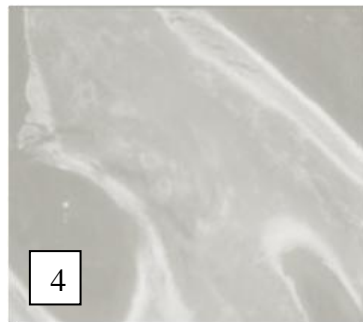
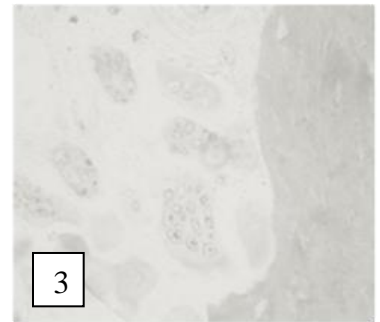
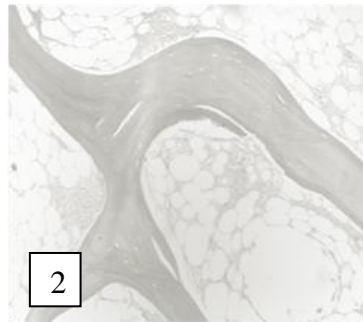


Patologia óssea do insuficiente renal crónico: Desafio clínico-biológico

Caracterização da osteodistrofia renal e efeitos da biocompatibilidade de membranas de hemodiálise, na remodelação óssea

Aníbal Ferreira





- 1,5 e 6: Cristina Ortiz, pinturas e colagens, “fusiones y procesos”, coleção pessoal (A.F.)
2: biopsia óssea observada na luz polarizada
3: biopsia óssea com coloração para a fosfatase ácida
4: biopsia óssea com marcações pela tetraciclina (fluorescência)
7: biopsia óssea corada pelo método de tricrómio de goldner

Manuel Aníbal Antunes Ferreira

**Patologia óssea do insuficiente renal crónico: desafio clínico-
biológico**

Caracterização da osteodistrofia renal e efeitos da biocompatibilidade de
membranas de hemodiálise, na remodelação óssea

Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa
Lisboa, 2012

Manuel Aníbal Antunes Ferreira

Patologia óssea do insuficiente renal crónico: desafio clínico-biológico

Caracterização da osteodistrofia renal e efeitos da biocompatibilidade de membranas de hemodiálise na remodelação óssea

Dissertação de candidatura ao grau de
Doutor em Medicina apresentada à
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa

Orientador:

Professor Doutor Fernando Eduardo Barbosa Nolasco
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa

Tese elaborada de acordo com o Decreto-Lei nº 216/92, de 13 de Outubro de 1992

Autorização de Publicação: A reprodução dos artigos e tabelas publicadas foi objeto de autorização expressa, dos respetivos editores

Dissertação escrita segundo o acordo ortográfico em vigor

ÍNDICE

	Página
Dedicatória e agradecimentos	11
Prefácio	25
1. Introdução	33
1.1. Bibliografia capítulo 1	35
2. Objetivos do estudo	37
3. Diagnóstico “não invasivo” da osteodistrofia renal (ODR)	41
3.1. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea	45
3.1.1. Cálcio	47
3.1.2. Fósforo	49
3.1.3. “Fibroblast growth factor-23”	50
3.1.4. Vitamina D	57
3.1.5. Paratormona	61
3.1.6. Expressão do recetor PTH-PTHrP (manuscritos 1, 2 e 3)	71
3.1.7. Isoforma óssea da fosfatase alcalina e formação óssea (manuscritos 4 e 5)	103
3.1.8. Outros marcadores séricos da formação óssea	120
3.1.8.1. Osteocalcina	120
3.1.8.2. Propeptido carboxiterminal do procologénio tipo I-PICP	122
3.1.9. Piridinolina, desoxipiridinolina e reabsorção óssea (manuscrito 6)	123
3.1.10. Outros marcadores séricos da reabsorção óssea	134
3.1.10.1. Telopectido do colagénio tipo I – ICTP	134
3.1.10.2. Fosfatase ácida resistente ao ácido tártrico (TRAP)	135
3.1.11. Aluminemia, depósitos ósseos de alumínio e terapêutica com desferroxamina (manuscrito 7)	136

	Página
3.1.12. Limitações do diagnóstico não invasivo da osteodistrofia renal	141
3.2. Bibliografia capítulo 3	144
4. Diagnóstico invasivo da osteodistrofia renal	163
4.1. Técnica da biopsia óssea com histomorfometria	177
4.1.1. Histomorfometria óssea e definição dos diagnósticos histológicos	178
4.1.1.1. Doença óssea de elevada remodelação	182
4.1.1.2. Doença óssea de baixa remodelação	187
4.1.1.2.1. Doença óssea adinâmica	188
4.1.1.2.2. Doença adinâmica com osteoclasia	192
4.1.1.2.3. Osteomalácia	193
4.1.1.3. Osteodistrofia renal de tipo misto	195
4.1.2. Histomorfometria óssea no diagnóstico diferencial da ODR (manuscrito 8)	197
4.1.3. A nova classificação KDIGO da osteodistrofia renal: TMV	213
4.1.4. Otimização da coloração dos osteoclastos pela técnica da fosfatase ácida (manuscrito 9)	216
4.1.5. Caracterização dos depósitos de alumínio na superfície trabecular	225
4.1.6. Caracterização dos depósitos de ferro na superfície trabecular	229
4.2. Resultados do diagnóstico invasivo da ODR nos doentes Portugueses	231
4.2.1. Comparação com população ibero-americana (manuscrito 10)	231
4.2.2. Evolução da prevalência dos depósitos ósseos de alumínio	238
4.2.3. Avaliação prospetiva da ODR após transplantação renal (manuscrito 11)	238
4.3. Histomorfometria óssea na validação de “novas terapêuticas” da osteodistrofia renal	249

	Página
4.3.1. Carbonato de lantânio versus carbonato de cálcio (manuscrito 12)	251
4.3.2. Cloridrato de sevelamer versus carbonato de cálcio (manuscrito 13)	259
4.4. Proposta de indicações para a realização de biopsia óssea	275
4.5. Bibliografia capítulo 4	277
5. Citoquinas / fatores de crescimento na osteodistrofia renal e efeitos da biocompatibilidade de membranas de hemodiálise, na remodelação óssea	289
5.1. Beta-2-microglobulina, remodelação óssea e membranas de hemodiálise (manuscrito 14)	291
5.2. Papel de citoquinas na remodelação óssea (manuscrito 15)	306
5.3. Efeitos do tipo de membrana de hemodiálise na osteodistrofia renal (manuscrito 16);	319
5.4. Efeito da técnica de hemodiálise nos níveis séricos do fator de necrose tumoral alfa (manuscrito 17);	334
5.5. Citoquinas, marcadores bioquímicos e histomorfometria óssea: avaliação integrada no diagnóstico não invasivo da ODR em hemodialisados (manuscrito 18)	339
5.6. Bibliografia capítulo 5.	355
6. Carência em 25-hidroxivitamina D no insuficiente renal crônico	365
6.1. Insuficiência em vitamina D nos doentes com insuficiência renal crónica	368
6.2. Deficiência em 25-hidroxivitamina D em doentes Hemodialisados	378
6.3. Deficiência em 25-hidroxivitamina D e inflamação	382
6.4. Deficiência em 25-hidroxi-vitamina D e disfunção cardiovascular (manuscrito 19)	383
6.5. Deficiência em 25-hidroxi-vitamina D e mortalidade	399

	Página
6.6. Efeitos da suplementação com colecalciferol no doente urémico (manuscrito 20)	402
6.7. Bibliografia capítulo 6	418
7. Discussão global	427
7.1. Bibliografia capítulo 7	458
8. Comentários finais e perspectivas de investigações futuras	469
8.1. Bibliografia capítulo 8	472
9. Resumos	473
9.1. Resumo	473
9.2. Abstract	477
10. Chave de abreviaturas utilizadas	481

Aos meus pais

À Helena

Ao Bernardo e à Catarina

Aos meus doentes

Agradecimentos

Fernando Nolasco Para além do orientador da presente tese, tem sido um dos meus principais modelos de nefrologista nas vertentes assistencial, pedagógica e de investigação clínica. Ao longo de mais de 20 anos, tenho tido o privilégio de ser alvo das suas críticas, do seu estímulo e da sua enorme capacidade para valorizar e otimizar as capacidades dos seus colaboradores, entre os quais me incluo. Sublinho a sua exigência e rigor profissional, mas acima de tudo agradeço a sua amizade e a confiança que sempre demonstrou no meu projeto de investigação.

investigação e pela longa e profunda amizade de mais de duas décadas.

António Sousa Guerreiro

Pelo exemplo de rigor, exigência e capacidade de motivação, temperadas por uma invulgar diplomacia. Estou-lhe grato pelo seu apoio enquanto professor e dirigente da nossa Faculdade, bem como pela profunda amizade que desenvolvemos.

Carina Ferreira

Uma das mais jovens, mas igualmente mais talentosas e promissoras nefrologistas do nosso grupo de investigação clínica. Responsável pelo acompanhamento de diversos doentes que integrámos nos nossos estudos, quer em ambiente hospitalar quer extra-hospitalar.

Caroline Morieux

Com quem aprendi, no Hôpital Lariboisière em Paris, toda a técnica da histomorfometria óssea, bem como de hibridização *in situ*, aplicada à doença óssea.

Célia Gil

Graças ao seu rigor, às suas qualidades de trabalho excepcionais e sagacidade clínica, contribuiu significativamente para que eu pudesse dedicar mais tempo e atenção a projetos de investigação clínica. É um grande privilégio contar com a sua colaboração, mas sobretudo partilhar uma profunda amizade.

Cristina Jorge

É um dos pilares da nossa equipa, há mais de dezassete anos, a quem agradeço o suporte, o entusiasmo e o apoio na atividade clínica extra-hospitalar. O seu espírito crítico e a sua frontalidade têm sido estímulos de grande

relevância nas diversas linhas de investigação que desenvolvemos.

Cristina Ortiz

Pela amizade e qualidades artísticas, ilustradas, por exemplo, nos quadros que integram a capa desta tese.

Emília Arranhado

Pelo entusiasmo com que se envolveu em vários dos meus projetos de investigação e pelo rigor na execução dos mesmos.

Fernanda Carvalho

Por abrir o laboratório de morfologia renal à área da osteodistrofia. Partilhou comigo os seus conhecimentos, o espaço físico e as suas colaboradoras. Um exemplo único de capacidade de ensinar, multiplicar talentos e cultivar a humildade dos sábios.

Fernanda Gomes

A quem devo grande parte da organização e dos resultados do centro de hemodiálise extra-hospitalar que coordeno (Nephrocare – Vila Franca de Xira) e que foi palco de vários projetos de investigação clínica que realizei.

Fernando Carrera

Com quem aprendi a escrever artigos científicos e que me “abriu as portas” a diversos grupos de investigadores da doença óssea e metabólica, particularmente das escolas espanhola e latino-americana.

Helena Adegas

Pelo suporte, apoio, cumplicidade e alteridade inerentes a uma “vida a dois” com mais de 33 anos de duração. Partilhámos e enfrentámos juntos os bons e maus momentos tendo-se agigantado sempre nos últimos. Tem sido a principal impulsionadora dos meus projetos de investigação,

proporcionando-me o tempo, a disponibilidade e o suporte familiar. Na fase final teve ainda a amabilidade de fazer a revisão gráfica da presente dissertação.

Inês Aires

Tem sido uma companheira sempre presente, disponível e empreendedora, na atividade clínica hospitalar e extra-hospitalar, com quem partilho uma longa amizade. Recentemente lidera a nossa linha de investigação sobre vitamina D nativa em doentes transplantados, que continuaremos a aprofundar.

Jaime Moreira

Foi um dos meus Diretores do Serviço de Nefrologia, que manteve o apoio às minhas linhas de investigação clínica.

João Frazão

Pelo apoio e estreita colaboração em múltiplos projetos conjuntos de investigação clínica, que permitiram potenciar as capacidades do nosso grupo de investigadores. O prestígio internacional que lhe é amplamente reconhecido, na área da osteodistrofia renal, contribuiu para dar mais visibilidade aos resultados dos estudos de que somos coautores. Usufruímos ainda dos seus comentários e de múltiplas discussões clínicas, que nos permitiram valorizar os nossos projetos de investigação.

João Sousa

Pela amizade de mais de três décadas, fortalecida por um percurso profissional e extraprofissional de grande proximidade e cumplicidade.

Jorge Cannata-Andia

Um verdadeiro amigo da nefrologia portuguesa e catalisador de vários grupos de investigadores da área da osteodistrofia renal, ibéricos e latino-

americanos, entre os quais nos incluímos. Lembro-me que foi na sequência da primeira conferência em que o ouvi, que tomei a decisão de orientar a minha investigação clínica para a área da osteodistrofia renal. É para mim um grande privilégio poder contar com o seu apoio e amizade. Graças a ele, e ao seu entusiasmo, desenvolvemos vários projetos de colaboração, na última década.

João Ribeiro Santos

Enquanto Diretor do Serviço de Nefrologia, manteve o apoio à minha atividade clínica e de investigação na área da osteodistrofia renal.

José Cortez

Por possibilitar a nossa colaboração científica com o laboratório “Dr. Fernando Teixeira”.

Levy Guerra

Esteve presente, com o seu estímulo e o seu testemunho, em várias fases da minha vida profissional, incluindo o meu estágio em Paris, no Hôpital Necker. Sempre reconheci nele a sabedoria dum mestre, que infelizmente não pude ter mais tempo e mais perto de mim.

Marco Mendes

Um dos mais jovens e dedicados colaboradores da nossa equipa, que com o seu excelente trabalho quotidiano, hospitalar e extra-hospitalar, contribui para me libertar para tarefas de investigação.

Marco Paulino

Pela amizade, disponibilidade e suporte, em diversos aspetos da minha atividade profissional e extraprofissional.

Maria de Lurdes Caseiro

Pelo seu apoio e profissionalismo, partilhado há mais de uma década.

- Maria do Céu Saraiva
- Pelo entusiasmo para abraçar novos projetos de investigação e pela disponibilidade do seu laboratório e da sua equipa para colaborar connosco.
- Maria João Galvão
- Pela sua amizade, dedicação e por ser o verdadeiro pilar técnico da osteodistrofia renal no nosso hospital. Foi com a Maria João que desenvolvi todo o projeto de diagnóstico invasivo da doença óssea metabólica, em Portugal. É ela a responsável pela técnica de preparação das lâminas das biópsias ósseas e pela organização do laboratório de osteodistrofia renal. Tem participado, ativamente, na formação de outros técnicos de anatomia patológica, nesta área, provenientes de múltiplos hospitais portugueses. Atingiu um elevado reconhecimento nacional e internacional, na área da osteodistrofia renal.
- Maria Luísa Mariñoso
- Pelas discussões de casos clínicos e de biópsias ósseas, no Hospital Del Mar em Barcelona.
- Marie Christine de Vernejoul
- Abriu-me as portas do seu laboratório, em Paris, no Hôpital Lariboisière. Foi com a sua equipa que aprendi a fazer biópsias ósseas, durante um estágio de 3 meses, bem como toda a técnica de preparação dos fragmentos ósseos até à interpretação final das lâminas. O seu prestígio e a dimensão da sua unidade de investigação (INSERM 349) bem como a sua capacidade de ensinar e motivar, foram fundamentais para a minha formação. Com ela tive a oportunidade de ler e discutir mais de três centenas de biópsias ósseas.

Marília Borges	Pela colaboração em diversos doseamentos bioquímicos efetuados no laboratório do “Dr. Fernando Teixeira”.
Natália Gonçalves	Pela colaboração na coordenação dos projetos realizados no centro de hemodiálise, “Dialverca”.
Nuno Adegas	Pelo apoio na realização das fotos da capa deste manuscrito.
Pablo Ureña	Pela acutilância de investigação, rigor da análise dos resultados e capacidade de produção científica. Tive a sorte de trabalhar com ele imediatamente após o seu regresso dos EUA, onde tinha integrado a equipa responsável pela sequenciação do recetor do cálcio, o que foi para mim muito estimulante. Foi ainda com ele que em 1993 e 1994 aprendi a realizar estudos no modelo animal de rato urémico (após realizarmos uma nefrectomia de 5/6) e a desenvolver diversas técnicas de biologia molecular, aplicadas à doença óssea e do metabolismo mineral.
Patrícia Matias	Pela invulgar capacidade de investigação clínica, os profundos conhecimentos em estatística aplicada à medicina e pela elegância e rigor que caracterizam os seus manuscritos. Tem sido das principais impulsionadoras dos estudos sobre vitamina D, hiperfosfatemia e hiperparatiroidismo secundário, realizados pelo nosso grupo. É mais um pilar do nosso grupo de investigadores, com quem tenho o privilégio de partilhar uma longa e profunda amizade.

Paula de Jesus	Pelo apoio direto e indireto a vários dos nossos projetos de investigação e à divulgação dos respetivos resultados.
Paulo Felicíssimo	Pela ajuda aquando da realização das primeiras biopsias ósseas em Portugal.
Pedro Ponce	Pela amizade e confiança, demonstradas ao longo de quase duas décadas de colaboração.
Regula Muller	Pela eficiência e rigor na coordenação do maior ensaio multicêntrico realizado até à atualidade, com dupla biopsia óssea, para estudo da eficácia e segurança terapêutica da utilização de captadores de fósforo.
Reimão Pinto	Pelas discussões entusiasmantes de diversos casos clínicos de hiperparatiroidismo secundário e da doença óssea metabólica, após transplantação renal.
Sergio Serrano Figueras	Pela discussão conjunta de diversos casos clínicos e leitura de múltiplas biopsias ósseas, durante um estágio de curta duração no “Hospital Del Mar”, em Barcelona.
Teresa Adragão	Pela realização conjunta de vários estudos de colaboração, bem como pela discussão estimulante de diversos temas da osteodistrofia renal. É uma investigadora de renome internacional na área da osteodistrofia renal, que muito tem contribuído para a valorização de diversas investigações nacionais nesta área, entre as quais as nossas.
Tiago Amaral	Pelo acompanhamento nefrológico de doentes integrados em diversos estudos clínicos, com particular relevância na clínica “Dialverca”.

Tilman Drüeke

Pela forma calorosa, estimulante e motivadora como me acolheu, num estágio de longa duração, em 1993-1994, na unidade de investigação do INSERM Unité 90, em Paris. A sua produção científica, o acesso direto aos grandes centros de investigação mundiais e as parcerias que foi desenvolvendo com quase todos os seus discípulos, caracterizam um verdadeiro mestre e embaixador da nefrologia contemporânea.

Vanda Jorgetti

A cooperação desinteressada e a sagacidade de muitos comentários e apreciações em relação aos nossos projetos, transformam-na numa verdadeira “irmã brasileira” com quem aprendemos muito em todas as oportunidades.

Ao apresentar os resultados de um projeto de investigação multifacetado, com quase duas décadas de execução, e realizado em diversos palcos nacionais e internacionais, corro o risco de não agradecer a alguns dos meus amigos e colaboradores, que de forma direta ou indireta contribuíram para a sua realização.

Antecipo o meu pedido de desculpas por essa falha involuntária.

Não posso, no entanto, deixar de enumerar os meus colegas que, no Serviço de Nefrologia do Hospital Curry Cabral me ajudam, na minha atividade assistencial e, desse modo, me permitem ter mais disponibilidade para as vertentes pedagógica e de investigação clínica: Ana Vila Lobos, Cecília Silva, Dulce Carvalho, Fernando Caeiro, Francisco Remédio, Francisco Ribeiro, Guida Menezes, Helena Viana, Isabel Pataca, Joaquim Calado, Leonor Fortes, Margarida Domingos, Marília Possante, Nuno Rodrigues e Vasco Fernandes. Uma referência ainda para aqueles que já não estando a exercer funções no Serviço de Nefrologia do Hospital Curry Cabral, me ajudaram, no passado, na execução das minhas investigações: João Cruz, João Paulo Travassos, Joaquim Bordalo, José Lopes da Cruz e Sílvia Ribeiro.

De igual modo, desejo agradecer aos meus colegas, que ainda não referi, dos centros de hemodiálise “Nephrocare Vila Franca de Xira” e “Dialverca”, pelo elevado profissionalismo, exigência e sucesso com que desenvolveram e executaram, em colaboração comigo, muitos dos estudos clínicos apresentados nesta dissertação, nomeadamente: Ana Cruz, Ana Pidal, Ana Raimundo, Augusta Fernandes, Eugénia Silva, Nazaré Santos, Romeu Teixeira e Rui Andrade.

Agradeço aos meus alunos a acutilância e o estímulo proporcionado pelas suas dúvidas e comentários, bem como a todos os meus doentes e respetivas famílias, pela disponibilidade demonstrada para participar em diversos estudos clínicos, cujos resultados são apresentados ao longo da presente dissertação.

Finalmente, não posso deixar de agradecer à minha família, e de um modo particular à minha mulher e aos meus filhos, o apoio incondicional que sempre deram aos meus projetos de investigação e à elaboração desta tese.

Prefácio

Nas últimas duas décadas o estudo da doença óssea e metabólica ganhou um protagonismo surpreendente, inimaginável quando iniciámos os nossos primeiros passos de investigação clínica, nesta área. Desenvolveram-se novas abordagens com grande relevância científica e assistencial, suportadas por projetos de investigação básica, animal e clínica.

As universidades e escolas médicas Norte Americanas, da América do Sul, de Espanha e de França, têm sido das que mais se distinguiram, na área da osteodistrofia renal, surpreendendo-nos, em quase todos os congressos e publicações científicas prestigiadas, com novas descobertas, novos mediadores / ativadores / inibidores de diferentes processos fisiopatológicos, ou novas abordagens terapêuticas.

Nefrologistas prestigiados, de reconhecido mérito internacional, como Eduardo Slatopolsky, Jack Coburn, Isidro Salusky, Jorge Cannata-Andía, Tilman Drüeke, Vanda Jorgetti, Mariano Rodriguez, bem como os portugueses João Frazão e Teresa Adragão, têm contribuído de forma vincada, para a manutenção da relevância dada à osteodistrofia renal.

Tivemos o privilégio de trabalhar com alguns deles, fazer estudos em colaboração com outros e, em muitos casos, estabelecer longas e frutuosas relações de amizade.

Sentimos frequentemente, que existe um “*código de reconhecimento e de colaboração*” muito vincado no grupo de nefrologistas, que integram o que frequentemente chamamos de “*the bone people*”. Especulamos que a existência deste código talvez se deva à partilha do interesse e do estudo de um tecido (ósseo), fundamental para a sustentação e defesa do indivíduo, que só aparentemente é um órgão rígido e pouco interessante.

Pelo contrário, como o demonstra a história recente da osteodistrofia renal e das perturbações do metabolismo fosfo-cálcico, estamos em presença de um tecido que participa diretamente em muitas funções sistémicas, está no centro de equilíbrio de muitos outros sistemas orgânicos e condiciona morbidade e mortalidade relevantes.

Nesta dissertação foram utilizados resultados contidos nos seguintes trabalhos pessoais ou de colaboração, já publicados:

Artigos originais em revistas internacionais

Down-regulation of the PTH/PTHrP receptor in uremia

Pablo Ureña, Michael Mannstadt, Milan Hruby, **Aníbal Ferreira**, Gino V. Segre and Tilman Drüeke.

J Bone Min Metab.1994;12:S87-S9

Parathyroidectomy does not prevent the renal PTH/PTHrP receptor down regulation in uremic rats

Pablo Ureña, Michael Mannstadt, Milan Hruby, **Aníbal Ferreira**, François Schmitt, Caroline Silve, Raymond Ardaillou, Bernard Lacour, Abdul-Badi Abou-Samra, Gino V. Segre and Tilman Drüeke.

Kidney Int 1995;47:1797-1805.

Serum pyridinoline as a specific marker of collagen breakdown and bone metabolism in hemodialysis patients

Pablo Ureña, **Aníbal Ferreira**, Viola T. Kung, Caroline Morieux, Pierre Simon, Kim S. Ang, Jean Claude Souberbielle, Gino V. Segre, Tilman B. Drüeke and Marie Christine de Vernejoul.

J Bone Min Res 1995;10(6):932-939.

Relationship between serum β 2-microglobulin, bone histology and dialysis membranes in uraemic patients.

Aníbal Ferreira, Pablo Ureña, Kim S. Ang, Pierre Simon, Caroline Morieux, Marie Christine de Vernejoul, Tilman B. Drüeke.

Nephrol Dial Transplant 1995;10:1701-1707

Plasma total versus bone alkaline phosphatase as markers of bone turnover in hemodialysis patients

Pablo Ureña, Milan Hruby, **Aníbal Ferreira**, Kim S. Ang, Marie Christine de Vernejoul.
J Am Soc Nephrol 1996;7:506-512.

PTH/PTHrP receptor mRNA is down-regulated in epiphyseal cartilage growth plate of uremic rats

Pablo Ureña, **Aníbal Ferreira**, Caroline Morieux, Tilman Drüeke, Marie Christine de Vernejoul.
Nephrol Dial Transplant 1996;2008-2016.

Potential role of cytokines in renal osteodystrophy

Ferreira A., Simon P., Drüeke T.B., Descamps-Latscha B.
Nephrol Dial Transplant 1996;11:399-400.

Epidemiology of Renal Osteodystrophy in Iberoamerica

J Bernardino Diaz López, Vanda Jorgetti, Hena Caorsi, **Aníbal Ferreira**, Alfonso Palma, Primitiva Menendez, Inés Olaizola, Silvia Ribeiro, Carlos Jarava, Eleonora Moreira, Jorge Cannata.
Nephrol Dial Transplant 1998;13:41-45

Use of a desferrioxamine “microdose” to chelate aluminum in hemodialysis patients

C Jorge, C Gil, M Possante, MC Catarino, A Cruz, R Andrade, R Teixeira, N Santos; **A Ferreira**
Clin Nephrol 1999;5:335-6.

Different patterns of renal osteodystrophy in Iberoamerica

Jorgetti,V.; Palma,A.; Ribeiro,S.; **Ferreira,A.**; Douthat,W.; López,B.D.; Caorsi,H.;
Menendez,P.; Olaizola,I.
Am J Med Sci 2000;320:76-80.

Renal Osteodistrophy: Histological Evaluation After Renal Tansplantation

L.Martins, J. Querós, **A. Ferreira**, A. C. Henriques, A M. Sarmiento, M. C. Pereira, and S.
Guimarães.
Transplantation Proceedings2000; 32: 2599-2601.

Effect of type of dialysis membrane on bone in haemodialysis patients

Ferreira,A.; Ghazali,A.; Galvão,J.; Souberbielle,J-C.; Jehle,P.M.; Mohan,S.;
Descamps-Latscha,B.; Oprisiu,R.; Fournier,A.; Drüeke,T.B.
Nephrol Dial Transplant 2001; 16: 1230-1238

A multicenter study on the effects of lanthanum carbonate (Fosrenol) and Calcium Carbonate on renal bone disease in dialysis patients.

Patrick C. D'Haese, Goce B Spasovski, Aleksander Sikole, Alastair Hutchison, Tony J
Freemont, Silvie Sulkova, Charles Swanpoel, Svetlana Pejanovic, Llubica Djukanovic,
Alessandro Balducci, Giorgio Coen, Waldysaw Sulowicz, **Aníbal Ferreira**, Armando
Torres, Slobodan Curic, Milan Popovic, Nada Dimkovic and Marc E de Broe.
Kidney International, 2003, vol. 63: S73-S78

On-line haemodiafiltration decreases serum TNF alpha levels in haemodialysis patients

Célia Gil, Carlos Lucas, Cristina Possante, Cristina Jorge, Fernanda Gomes, Maria
Candeias, Helena Lages, Emília Arranhado, **Aníbal Ferreira.**
Nephrol Dial Transplant 2003; 18:447-448

Bone alkaline phosphatase besides intact parathyroid hormone in hemodialysis patients – any advantage?

Cristina Jorge, Célia Gil, Marília Possante, Eugénia Silva, Rui Andrade, Nazaré Santos, Ana Cruz, Romeu Teixeira, **Aníbal Ferreira**
Nephron Clin Pract 2005;101:c122-c127

Effects of sevelamer hydrochloride and calcium carbonate on renal osteodystrophy in hemodialysis patients

Ferreira,A.; Frazão,J.M.; Monier-Faugere,M-C.; Gil,C.; Galvão,J.; Oliveira,C.; Baldaia,J.; Rodrigues,I.; Santos,C.; Ribeiro,S; Hoenger,R.M.; Duggal,A.; Malluche,H.H.
J Am Soc Nephrol 2008;19:405-412

Current management of secondary hyperparathyroidism: a multicenter observational study (COSMOS)

Cannata-Andía,J.B.; Fernández-Martín,J.L.; Zoccali,C; London,G.M.; Locatelli,F.; Ketteler,M.; **Ferreira,A.**; Covic,A.; Floege,J.; Górriz,J.L.; Rutkowski,B.; Memmos,D.E.; Verbeelen,D.; Tielemans,C.; Teplan,V.; Bos,W.J.; Nagy,J.; Ktamar,R.; Golssmith,D.J.; Martin,P.Y.; Wüthrich,R.P.; Pavlovic,D.; Benedik,M.
J Nephrol 2008;21:290-298

Evaluation of bone remodeling in hemodialysis patients: serum biochemistry, circulating cytokines and bone histomorphometry

Ferreira,A.; Saraiva,M.; Behets,G.; Macedo,A.; Galvão,M.; D'Haese,P.; Drüeke,T.B.
J Nephrol 2009;22:783-783

25-hydroxyvitamin D3, arterial calcifications and cardiovascular risk markers in haemodialysis patients

Matias,P.J.; Ferreira,C.; Jorge,C.; Borges,M.; Aires,I.; Amaral,T.; Gil,C.; Cortez,J.; **Ferreira,A.**

Nephrol Dial Transplant 2009;24:611-618

Femoral bone mineral density reflects histologically determined cortical bone volume in hemodialysis patients

Adragão,T.; Herberth,J.; Monier-Faugere,M-C.; Branscum,A.J.; **Ferreira,A.**;

Frazão,J.M.; Malluche,H.H.

Osteoporos Int Published on line: 25 June 2009;

Low bone volume: a risk factor for coronary calcifications in hemodialysis patients

Adragão,T.; Herberth,J.; Monier-Faugere,M-C.; Branscum,A.J.; **Ferreira,A.**;

Frazão,J.M.; Dias Curto,J.; Malluche,H.H.

Clin J Am Soc Nephrol 2009;4:450-455

Cholecalciferol supplementation in hemodialysis patients: effects on mineral metabolism, inflammation, and cardiac dimension parameters

Matias,P.J.; Jorge,C.; Ferreira,C.; Borges,M.; Aires,I.; Amaral,T.; Gil,C.; Cortez,J.; **Ferreira,A.**

Clin J Am Soc Nephrol 2010;5:905-911

Optimization of the tartrate-resistant acid phosphatase detection by histochemical method

Galvão,M.J.; Santos,A.R.; Ribeiro,M.D.; **Ferreira,A.**; Nolasco,F.

Eur J Histochem 2011;55:1-4

Trabalho realizado nas seguintes instituições

Serviço de Nefrologia do Hospital de Curry Cabral, Lisboa

INSERM Unité 90 , Hôpital Necker, Paris

INSERM Unité 349, Hôpital Lariboisière, Paris

1. Introdução

Os doentes com insuficiência renal apresentam alterações ósseas e do metabolismo mineral, desde os estádios iniciais de desenvolvimento da doença nefrológica (1; 2).

Ao longo da evolução da doença renal, observam-se diferentes mecanismos etiopatogénicos, que se vão traduzir não apenas em diversos quadros de desequilíbrio osteo-articular, mas também no envolvimento de outros órgãos e sistemas, nomeadamente o cardiovascular e o endocrinológico (3).

As calcificações vasculares e das válvulas cardíacas, passaram a surgir como um dos vértices da doença óssea e metabólica, observada na insuficiência renal crónica.

Nestas circunstâncias, o interesse crescente dos nefrologistas e de muitos grupos de investigação, por esta patologia, deve-se à associação das perturbações do metabolismo mineral com o aumento da morbilidade e mortalidade global e de causa cardiovascular, no doente urémico.

A descoberta, nos últimos anos, de novos mediadores e de novos mecanismos de ativação e inibição do metabolismo fosfo-cálcico, que abordaremos detalhadamente nos diversos capítulos desta dissertação, contribuiu para um marcado estímulo para o aprofundamento desta área da nefrologia, incluindo a elaboração de “*guidelines*” internacionais de atuação no diagnóstico e intervenção terapêutica (4).

Também a necessidade de uma rigorosa avaliação da eficácia e segurança associadas à utilização de novos fármacos (por exemplo novos captadores do fósforo, calciméticos ou análogos da vitamina D), bem como a relevância de quantificar os respetivos efeitos na remodelação óssea, condicionaram o renascimento da importância da realização de biopsias ósseas de osso não descalcificado (5; 6).

Na sequência da publicação das “*guidelines*” KDIGO (“*kidney disease: improving general outcomes*”), o termo de osteodistrofia renal passou a ser utilizado, exclusivamente, para descrever as alterações estruturais e celulares, observadas em biopsias ósseas de osso não descalcificado, de doentes urémicos (7; 4).

Nestes doentes a remodelação óssea pode estar aumentada, traduzindo a expressão óssea do hiperparatiroidismo secundário, ou, pelo contrário, muito deprimida. Neste último caso o quadro corresponde, nas suas formas mais graves, ao denominado “osso adinâmico”, o qual resulta, maioritariamente de causas iatrogénicas (8; 9; 10).

O diagnóstico de osso adinâmico ou de acentuada redução da remodelação óssea, tem sido encontrado, com prevalência crescente, nos doentes urémicos, ao longo dos últimos 15 anos (11). Os nossos trabalhos contribuíram para um melhor entendimento de alguns fatores que explicam o crescente aumento deste diagnóstico, que evidenciámos em cerca de metade dos doentes que biopsámos nos últimos anos (12; 13; 14).

Pelo contrário os diagnósticos de osteomalácia e de osteodistrofia renal do tipo misto, nos quais predomina um compromisso da mineralização óssea, são cada vez mais raros, quer na nossa casuística, quer na dos outros centros internacionais dedicados ao estudo da osteodistrofia renal (11).

Nos capítulos seguintes desta dissertação são, apresentados os resultados das nossas investigações referentes a cada um dos objetivos inicialmente definidos, bem como os manuscritos a que essas investigações deram origem.

Em cada um dos capítulos integrámos uma discussão do respetivo tema, ancorada nos nossos resultados, e nos de outros autores com trabalhos na mesma área.

Finalmente, é apresentada uma discussão global da tese, no qual são integrados, de forma crítica, os resultados da nossa investigação.

1.1. Bibliografia capítulo 1

1. *Mechanisms of disease: renal osteodystrophy*. **Hruska,K.A.; Teitelbaum,S.L.** 1995, N Eng J Med, Vol. 333, pp. 163-174.
2. *Development of renal bone disease*. **Ferreira, A.** 2006, Eur J Clin Invest, Vol. 36, pp. 2-12.
3. *Cardiovascular risk in chronic kidney disease (CKD): the CKD-mineral bone disorder (CKD-MBD)*. **Hruska,K.A.; Choi,E.T.; Memon,I.; Davis,T.K.; Mathew,S.** 2010, Pediatr Nephrol, Vol. 25, pp. 769-778.
4. *KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention and treatment of chronic kidney disease - mineral and bone disorder (CKD-MBD)*. Suppl 113, 2009, Kidney Int, Vol. 76, pp. S1-S130.
5. *Bone histomorphometry in renal osteodystrophy*. **Ott,S.M.** 2, 2009, Semin Nephrol, Vol. 29, pp. 122-132.
6. *Diagnosis of renal osteodystrophy: when and how to use biochemical markers and non-invasive methods; when one biopsy is needed*. **Ferreira,A.** 2000, Nephrol Dial Transplant, Vol. 15, pp. 8-14.
7. *Definition, evaluation and classification of renal osteodystrophy: A position statement from Kidney Disease: Improving General Outcome (KDIGO)*. **Moe,S.M.; Drüeke,T.; Cunningham,J.; Goodman,W.G.; Martin,K.; Olgaard,K.; Ott,S.; Sprague,S.; Lameire,N.; Eknoyan,G.** 2006, Kidney Int, Vol. 69, pp. 1945-1953.
8. *Risk of adynamic bone disease in dialysed patients*. **Malluche,H.; Faugere,M.C.** 1992, Kidney Int, Vol. 42, pp. S62-S67.
9. *High prevalence of low bone turnover and occurrence of osteomalacia after kidney transplantation*. **Monier-Faugere,M-C.; Mawad,H.; Qi,Q.; Friedler,R.; Malluche,H.H.** 2000, J Am Soc Nephrol, Vol. 11, pp. 1093-1099.
10. *Hypokinetic azotemic osteodystrophy*. **Cannata-Andía,J.** 1998, Kidney Int, Vol. 54, pp. 1000-1016.
11. *Trends in renal osteodystrophy: a survey from 1983 to 1995 in a total of 2248 patients*. **Monier-Faugere,M-C.; Malluche,H.** S-3, 1996, Nephrol Dial Transplant, Vol. 11, pp. S111-S120.
12. *Effects of sevelamer hydrochloride and calcium carbonate on renal osteodystrophy in hemodialysis patients*. **Ferreira,A.; Frazão,J.M.; Monier-Faugere,M-C.; Gil,C.; Galvão,J.; Oliveira,C.; Baldaia,J.; Rodrigues,I.; Santos,C.; Ribeiro,S; Hoenger,R.M.; Duggal,A.; Malluche,H.H.** 2008, J Am Soc Nephrol, Vol. 19, pp. 405-412.

13. *Evaluation of bone remodeling in hemodialysis patients: serum biochemistry, circulating cytokines and bone histomorphometry.* **Ferreira,A.; Saraiva,M.; Behets,G.; Macedo,A.; Galvão,M.; D'Haese,P.; Drüeke,T.B.** 6, 2009, J Nephrol, Vol. 22, pp. 783-793.

14. *Low bone volume: a risk factor for coronary calcifications in hemodialysis patients.* **Adragão,T.; Herberth,J.; Monier-Faugere,M-C.; Branscum,A.J.; Ferreira,A.; Frazão,J.M.; Dias Curto,J.; Malluche,H.H.** 2009, Clin J Am Soc Nephrol, Vol. 4, pp. 450-455.

2. Objetivos do estudo

2.1. Montagem da técnica de biopsia óssea e diagnóstico invasivo da ODR, em Portugal.

Tendo em conta que em Portugal esta técnica não era ainda realizada, e que a mesma era (e ainda é) considerada o método mais fiável e reprodutível de diagnosticar a doença óssea e metabólica no doente urémico, este foi o nosso primeiro objetivo. Nesse sentido, fizemos estágios de longa duração no Hôpital Lariboisière e no Hôpital Necker, em Paris, e posteriormente montámos esta técnica no Serviço de Nefrologia do Hospital Curry Cabral. Ao atingirmos mais de 500 biopsias ósseas realizadas e interpretadas no nosso laboratório, estamos entre os 5 centros mundiais de histomorfomertria, em atividade, com mais biopsias ósseas realizadas em doentes urémicos.

2.2. Caracterizar as limitações dos marcadores bioquímicos da remodelação óssea, existentes aquando do início do projeto.

Suspeitávamos que os marcadores não invasivos da osteodistrofia renal apresentavam uma baixa sensibilidade e especificidade. Interessava-nos avaliar a capacidade discriminativa destes marcadores em doentes com diferentes graus de remodelação óssea e diferentes exposições ao alumínio (metal que, aquando do início das nossas investigações, ainda estava frequentemente presente na superfície trabecular dos doentes que biopsámos).

2.3. Validar novos marcadores bioquímicos da remodelação óssea, no doente urémico.

Face às limitações, baixa sensibilidade e especificidade dos marcadores não invasivos da remodelação óssea, pretendemos avaliar a utilidade de novos marcadores bioquímicos da remodelação óssea. Estes novos marcadores,

resultantes da degradação das cadeias de colagénio, começaram por ser utilizados na investigação de doenças ósseas fora do quadro urémico, como era o caso da osteoporose pós menopausica, da osteoporose senil ou das lesões osteolíticas de natureza tumoral. A maioria destas determinações eram feitas na urina, o que nos criou um desafio acrescido, visto que tivemos de desenvolver e aferir as técnicas de doseamento destes marcadores no plasma, (tendo em conta que quase todos os nossos doentes eram oligo-anúricos, integrados em programa de diálise).

2.4. Identificar citoquinas e factores de crescimento implicados na remodelação óssea no doente urémico.

Tendo em conta que os as linhagens celulares dos osteoblastos e dos osteoclastos têm a capacidade de se influenciar mutuamente, induzindo inibição / estimulação / diferenciação, assumimos que, em grande parte, este “diálogo” entre estas células ósseas pudesse ser mediado por citoquinas e factores de crescimento, com conhecidos efeitos (“in vitro”) nas células ósseas. Interessou-nos, predominantemente, identificar em circulação, no sangue periférico dos nossos doentes anúricos, níveis circulantes de citoquinas e/ou respetivos recetores solúveis. Damos particular atenção às citoquinas que apresentam maior estabilidade e semi-vida mais longa em circulação (como, por exemplo, a interleucina 6).

2.5. Avaliar os eventuais efeitos da permeabilidade e biocompatibilidade de membranas de diálise, e das diferentes técnicas depurativas renais, nos níveis séricos das citoquinas envolvidas na remodelação óssea.

Na sequência dos nossos resultados referentes ao objetivo anterior, e tendo em conta que encontrámos diferenças significativas nos níveis circulantes de diversas citoquinas com ação pro-inflamatória, decidimos investigar se a utilização de diferentes membranas (com diferentes graus de permeabilidade, de ultrafiltração e de adsorção) poderia conduzir a diferentes resultados de remodelação óssea a médio / longo prazo. Para além das características das

membranas de diálise, interessou-nos avaliar o hipotético efeito de técnicas depurativas com um grau muito elevado de convecção (como a hemodiafiltração *on-line*) nos níveis circulantes destas citocinas.

2.6. Caracterização das modificações na remodelação óssea e na mineralização do tecido osteóide, induzidas por novas alternativas terapêuticas da ODR.

A utilização de novas terapêuticas da ODR e do metabolismo ósseo e mineral no doente urémico implicou a realização de vários estudos, muitos deles com dupla biopsia óssea. Esta foi uma área a que dedicámos particular atenção, tanto mais que, ao longo da nossa investigação, em Lisboa e em Paris, tivemos a possibilidade de testar e investigar novos fármacos e novas associações de fármacos no tratamento da ODR.

2.7. Despiste de eventual carência em calcidiol, nos doentes urémicos, caracterização do respetivo quadro clínico e dos efeitos da suplementação com colecalciferol.

Os nossos resultados vieram confirmar a suspeita da elevada prevalência de deficiência, ou pelo menos insuficiência na maior parte dos doentes com IRC em diálise (estádio 5d). Pretendemos ainda investigar eventuais associações entre deficiência em vitamina D nativa e fatores de risco cardiovascular. O passo seguinte da nossa investigação nesta área seria, logicamente, tentar corrigir a deficiência / insuficiência em vitamina D nativa, através da suplementação. Foi o que fizemos numa vasta população de doentes prevalentes em hemodiálise e que nunca tinham sido expostos a esta terapêutica. Mais interessantes foram ainda os resultados obtidos com a suplementação com vitamina D nativa oral (colecalciferol), que vieram a reverter parte dos fatores de risco cardiovascular. Mais recentemente, estendemos esta nossa linha de investigação aos doentes transplantados, por considerarmos que são um excelente modelo de insuficiência renal crónica, monitorizada de forma sistematizada e padronizada.

2.8. Contributo para a elaboração e revisão crítica de “*guidelines*” internacionais de diagnóstico e terapêutica da ODR.

Face aos nossos resultados e ao desenvolvimento, de forma consistente, de uma linha de investigação clínica na área da osteodistrofia renal, tivemos a honra de ser convidados para co-autores dos Guidelines da ERA-EDTA da ODR, (Publicados na *Nephrology Dialysis and Transplantation* em 2000), bem como de integrar o grupo de investigadores da KDIGO especializado no diagnóstico invasivo (mediante realização de biopsias ósseas) da ODR.

3. Diagnóstico não invasivo da doença óssea e metabólica no doente urémico

O esqueleto ósseo humano tem uma tripla função: sustentação mecânica, proteção de órgãos vitais e reservatório metabólico de iões (particularmente dos iões cálcio e fósforo). É constituído por dois componentes: a matriz orgânica (também denominada tecido osteóide) e o componente inorgânico.

O tecido osteóide representa cerca de um terço da massa óssea total normal, sendo predominantemente constituído por colagénio tipo I, e por pequenas quantidades de proteoglicanos, lípidos e diversas proteínas não-colagénicas como a fibronectina, a osteonectina e a osteocalcina (1; 2).

O componente inorgânico do osso é formado, predominantemente, por cristais de hidroxiapatite. Cerca de 15% da massa óssea de um adulto normal sofre remodelação anualmente.

Em condições normais, o ciclo de remodelação óssea de uma unidade metabólica óssea (“BMU”) tem a duração aproximada de 6 meses, a que corresponde uma fase de reabsorção (cerca de 1 mês de duração), seguida de uma fase de formação, mais longa (4 a 5 meses).

Este processo dinâmico (aparentemente fundamental para a resolução de microfraturas espontâneas e para a adaptação esquelética às variações de eixos e do centro de gravidade corporal) é mediado pela ação dos osteoblastos e dos osteoclastos.

Após este ciclo de formação/reabsorção, a unidade metabólica óssea entra num período quiescente, o qual tem uma duração de 2 a 5 anos (1).

Tendo em conta que no tecido ósseo se encontram, respetivamente, cerca de 85% a 99% do conteúdo total de fósforo e de cálcio do corpo humano, facilmente se perspetiva a necessidade de caracterizar a remodelação óssea, em múltiplas patologias.

No doente urémico, atendendo à perda progressiva de função renal, bem como à limitação da participação dos rins no controlo e equilíbrio do metabolismo fosfo-cálcico, a avaliação da formação e reabsorção óssea são particularmente relevantes.

De igual modo, a obtenção de informação referente ao volume ósseo (total, cortical e trabecular), e a exclusão dum significativo compromisso da mineralização, poderão estar indicadas (3; 4) como analisaremos no capítulo 4.

Estes 3 principais eixos de informação do metabolismo ósseo e mineral no doente urémico (remodelação óssea, volume ósseo e compromisso da mineralização) vão condicionar diferentes atitudes preventivas e terapêuticas.

O primeiro destes parâmetros (remodelação óssea) pode, na maioria dos casos, ser avaliado através da quantificação de diversos marcadores séricos não invasivos, específicos da formação e/ou reabsorção óssea.

No entanto, nalguns casos individuais, estes resultados são contraditórios ou não são suficientemente esclarecedores, justificando a realização de uma investigação invasiva (5).

Na população em geral, no âmbito da medicina preventiva e saúde pública, bem como noutras patologias sistémicas, o volume ósseo é frequentemente caracterizado com base em métodos indiretos de imagem, como a densitometria óssea e a tomografia axial computadorizada (nomeadamente a tomografia quantitativa micro computadorizada) (6).

No entanto, no doente urémico, qualquer destes métodos apresenta limitações importantes, não permitindo distinguir entre a densidade óssea cortical e densidade óssea trabecular, nem eliminar os frequentes artefactos impostos pela presença de calcificações extra-esqueléticas (7).

Apesar destas limitações, recentemente, tivemos a oportunidade de descrever uma elevada concordância entre os resultados referentes à avaliação da densidade óssea do colo do fémur, em 32 doentes hemodialisados, e os resultados do volume ósseo cortical (que predomina nesta zona do esqueleto), avaliado por histomorfometria (8).

O mesmo não se verificou no que respeita à relação entre o volume ósseo trabecular avaliado na biopsia óssea e a densidade óssea vertebral (predomínio de osso trabecular) nos mesmos doentes.

Outros autores descreveram uma clara concordância entre a redução da densidade óssea do fémur e a incidência de doença óssea de baixa remodelação. Numa

população de doentes hemodialisados brasileiros, a redução da densidade óssea do fémur associou-se ao diagnóstico histológico de doença óssea adinâmica, ou de osteomalácia (embora parte destes resultados possam ser explicados por intoxicação alumínica ou deficiente nutrição) (9).

A redução da densidade óssea do colo do fémur em doentes urémicos, associou-se ainda a maior mortalidade (sobretudo cardiovascular), numa avaliação prospetiva, de 3 anos e meio de duração (10).

Finalmente, para excluir um compromisso da mineralização, apenas nos podemos basear no diagnóstico invasivo, através da realização de biópsia óssea de osso não descalcificado.

Na verdade, não existe atualmente qualquer método imagiológico ou marcador bioquímico que nos permita fazer o diagnóstico de osteomalácia, pelo que temos sempre de recorrer à avaliação histológica óssea, quando suspeitamos deste diagnóstico (11; 1; 3).

Ao longo deste capítulo, abordaremos as vantagens e limitações do diagnóstico não invasivo do metabolismo ósseo e mineral no doente urémico, tendo como base alguns dos nossos trabalhos publicados, sobre este tema.

As principais limitações dos marcadores bioquímicos de remodelação óssea, que identificámos desde o começo da nossa investigação, no início da década de 90, resultavam da baixa especificidade e sensibilidade de todos os marcadores então utilizados, para caracterizar, de forma não invasiva, a atividade osteoblástica e osteoclástica.

Curiosamente, como veremos ao longo deste capítulo, passados mais de 15 anos, algumas das limitações destes marcadores de remodelação óssea, então descritas, mantêm-se presentes e foram até mais claramente identificadas.

No entanto, importa reconhecer que novos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no metabolismo mineral do doente urémico, e novas proteínas e mediadores foram identificados, nestes doentes, ao longo da última década.

Como principais desafios, na área do diagnóstico não invasivo da doença óssea metabólica, que claramente identificámos, aquando do início da nossa investigação clínica, salientamos:

- a resposta heterogénea, óssea e da cartilagem, a níveis semelhantes de paratormona, ou precisamente o contrário (níveis circulantes semelhantes de paratormona associavam-se, frequentemente, a diagnósticos histológicos antagónicos, no que respeita à remodelação óssea);
- a necessidade de identificar outros marcadores séricos alternativos e com melhor correlação com os achados histológicos, face àquela baixa especificidade e sensibilidade da paratormona, no diagnóstico do tipo de osteodistrofia renal;
- a vantagem de associar diferentes marcadores de forma a aumentar significativamente os índices preditivos positivos e negativos, dos marcadores bioquímicos da remodelação óssea, no diagnóstico da osteodistrofia renal;
- a necessidade de identificar novos mediadores sistémicos, que atuam no sistema ósseo e no equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea. No que respeita a esta última, face ao curto período de tempo dos osteoclastos em fase de reabsorção óssea, e à escassez destas células ativadas no osso normal ou de baixa remodelação, a identificação de marcadores específicos da reabsorção óssea tem sido particularmente desafiante;
- a caracterização destes marcadores invasivos, no que respeita ao seu papel no estabelecimento e perpetuação da osteodistrofia renal, bem como no condicionamento de diferentes alternativas terapêuticas;
- a necessidade de avaliar os hipotéticos efeitos da intoxicação ou sobrecarga alumínica, nos níveis circulantes, de muitos dos marcadores bioquímicos da remodelação óssea.

Foi o desafio de responder a estas questões que orientou as nossas investigações neste tema, as quais conduziram a resultados publicados ou apresentados em reuniões científicas nacionais e internacionais, e que discutiremos ao longo dos próximos subcapítulos.

3.1. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea

As alterações nos níveis séricos dos marcadores de remodelação óssea, mais frequentemente utilizados na clínica, surgem, na maioria dos casos, quando o débito do filtrado glomerular está reduzido a menos de 60 ml/minuto.

No entanto, em fases mais precoces da insuficiência renal crónica (estádio 2, com DFG entre 60 e 90 ml/min), já é possível evidenciar um aumento dos níveis séricos de FGF-23 (12; 13; 14) e, em estádios mais avançados de insuficiência renal, uma redução significativa dos níveis circulantes de 25(OH)-vitamina D e de 1,25(OH)₂-vitamina D (15; 16; 17; 18).

Os níveis séricos de paratormona, na ausência de qualquer intervenção terapêutica, vão evoluir em paralelo com os do FGF-23 e “em espelho” (ou inversamente), com os de 25(OH)₂-vitamina D e de 1,25(OH)₂-vitamina D.

Estes perfis de evolução refletem o efeito inibidor da 1,25(OH)₂-vitamina D na síntese e libertação de paratormona, bem como a redução de síntese de 1,25(OH)₂-vitamina D induzida por níveis elevados de FGF-23 (12; 13; 19).

O marcador sérico ideal da remodelação óssea deveria ter origem exclusiva no osso e refletir a atividade esquelética.

Este marcador teria de correlacionar-se com os dados histomorfométricos, com os resultados da cinética do cálcio (rádio-marcado), e traduzir as modificações no volume ósseo (20; 21).

Não existe, atualmente, nenhum marcador bioquímico da remodelação óssea com estas características e potencialidades.

Infelizmente, quer as alterações iónicas quer as modificações dos níveis séricos dos diferentes marcadores do metabolismo ósseo apresentam, frequentemente, uma reduzida especificidade e/ou sensibilidade e uma deficiente correlação com os achados histológicos.

Nos últimos anos, no diagnóstico da ODR, foram avaliados novos marcadores da remodelação óssea constituídos, quer por enzimas libertadas pelas células ativadas

(osteoblastos e osteoclastos) quer por fragmentos das moléculas de procolagénio tipo I e de colagénio tipo I.

Como veremos nos capítulos seguintes, a interpretação conjunta de vários destes parâmetros e a utilização de marcadores mais específicos da função que pretendemos estudar (formação versus reabsorção óssea) constituem a melhor forma de progredir no diagnóstico não invasivo da doença óssea e metabólica, no doente urémico.

Os diferentes marcadores bioquímicos da atividade óssea contribuem para a definição de grupos de doentes com diferentes graus de remodelação óssea. Mais relevante é, em nossa opinião, a interpretação conjunta de vários destes marcadores, ao permitir o acompanhamento prospetivo, de forma dinâmica, da evolução da doença óssea.

No entanto, para o diagnóstico do doente *individual*, os parâmetros bioquímicos não apresentam, em muitos casos, a sensibilidade e a especificidade necessárias para o diagnóstico da doença óssea, nem dão suporte a diferentes intervenções terapêuticas, obrigando à utilização de métodos invasivos.

Como é claramente referido nas recomendações da “KDIGO-kidney disease: improving global outcomes”, é necessário avaliar, de forma prospetiva, e em grandes populações, a sensibilidade e especificidade dos diversos marcadores bioquímicos da remodelação óssea.

Esta linha de investigação constitui uma prioridade, tendo em conta que a esmagadora maioria dos estudos publicados não foram prospetivos, nem aleatorizados, (ou avaliaram populações prevalentes em hemodiálise há longo tempo, com significativa exposição ao alumínio e/ou ao cálcio).

Estamos diretamente envolvidos num estudo colaborativo internacional, patrocinado e coordenado pelo KDIGO, englobando os 5 centros mundiais em atividade, com maior número de biopsias ósseas realizadas, no qual, para além dos dados histomorfométricos das biopsias ósseas, têm sido avaliadas a sensibilidade e a especificidade de diversos marcadores bioquímicos (que discutiremos abaixo), isolados ou em associação, no diagnóstico de osteodistrofia renal.

3.1.1. Cálcio

Na IRC pode observar-se, com frequência, um quadro de hipocalcemia aparentemente secundária à diminuição dos níveis séricos de calcitriol (22; 23), mas provavelmente associada igualmente, nalguns casos, à diminuição de ingestão de cálcio, à retenção de fósforo (nas fases avançadas da IRC) e à resistência à ação periférica da PTH (ver abaixo).

O ião cálcio é o principal regulador da função das paratiróides, sendo a hipocalcemia o estímulo mais potente da secreção de PTH (24). O cálcio exerce os seus efeitos nas células paratiróides através da ligação a um recetor da membrana específico para este ião (24; 25).

A relação entre os níveis de cálcio extracelular e a secreção de PTH exprime-se por uma curva de forma sigmoide. Na IRC esta correlação altera-se, provocando um aumento do “*set point*” de inibição da secreção da PTH pelo cálcio, isto é, está aumentada a concentração plasmática de cálcio necessária para suprimir 50% da secreção máxima de PTH.

A avaliação desta curva sigmoide mostra ainda que a sensibilidade das células paratiróides aos níveis de cálcio extracelular, na urémia, parece ser maior nas situações de hiperparatiroidismo secundário do que noutros diagnósticos histológicos de osteodistrofia renal (24; 26).

No entanto, nem todos os grupos de investigadores estão de acordo quanto às alterações desta curva sigmoide na urémia. Goodman e colaboradores não observaram alterações significativas na relação entre calcemia e libertação da PTH (27; 28), nem variações relevantes do “*set point*” através da utilização de diferentes estudos dinâmicos, *in vivo*, em doentes com diversos graus de hiperparatiroidismo secundário (24; 29).

A hipocalcemia promove a libertação da PTH armazenada nas glândulas paratiróides e induz o aumento da expressão do ARNm da PTH, evidenciando, por este mecanismo, uma ação direta na síntese desta hormona (24; 30).

Frequentemente, nos doentes com IRC, a evolução desde estádios iniciais (fases 1 e 2) para fases mais avançadas (4 e 5) da insuficiência renal (mas ainda em pré-diálise), acompanha-se de evolução dos níveis de calcemia para fora dos limites propostos, primeiramente nos K/DOQI (31) e presentemente nos KDIGO (32).

Numa avaliação de 1836 doentes europeus com vários graus de IRC, acompanhados em consulta de nefrologia e nutrição, verificou-se uma redução na percentagem de doentes com níveis de calcemia normais (de acordo com os propostos nos K/DOQI) de 90,7% para 55%, nos doentes com IRC fase 3 versus fase 5, respetivamente (33).

A maioria dos doentes com IRC, em estádios avançados (fases 4 e 5), não previamente tratados, apresenta tendência para desenvolver hipocalcemia, secundária à deficiência em vitamina D ativa, a qual vai condicionar uma significativa redução da absorção intestinal de cálcio.

Pelo contrário, o desenvolvimento de hipercalcemia, observada com crescente frequência nos doentes dialisados, obriga a uma investigação diagnóstica imediata e intervenção terapêutica agressiva.

Entre as causas mais relevantes da hipercalcemia observada nestes doentes contam-se: 1) o hiperparatiroidismo secundário grave com predomínio da reabsorção óssea; 2) a doença óssea adinâmica (sobretudo se associada a depósitos ósseos de alumínio), acompanhada de bloqueio da incorporação de cálcio no osso; 3) a terapêutica com calcitriol ou outros derivados da vitamina D; ou ainda 4) o excesso de administração de cálcio sob a forma de carbonato ou acetato de cálcio ou através da utilização de dialisantes com elevada concentração deste ião (34).

Finalmente, outras causas de hipercalcemia deverão ainda ser excluídas, nomeadamente a imobilização prolongada, as doenças malignas associadas a aumento da reabsorção óssea ou à produção ectópica de PTH/PTHrP, ou a presença de doenças granulomatosas como a sarcoidose e a tuberculose (associadas à produção extra-renal de calcitriol).

3.1.2. Fósforo

Os níveis séricos de fósforo encontram-se normais ou mesmo diminuídos nas fases iniciais da IRC, ao contrário do “classicamente” defendido pela teoria de "trade off" de Bricker (35).

A normofosfatemia (ou mesmo hipofosfatemia) observada nos estádios iniciais da IRC (estádios 2 e 3) é de causa multifactorial, nomeadamente: 1) efeito fosfatúrico exercido pelo FGF-23 nos túbulos renais (14); 2) efeito fosfatúrico mediado pela ação dos níveis elevados de iPTH e 3) à diminuição da reabsorção intestinal de fósforo, secundária à deficiência absoluta ou relativa de calcitriol (36; 37; 38; 39).

Desde as fases iniciais da IRC, esta deficiência em calcitriol conduz ainda ao desenvolvimento de um quadro de hiperparatiroidismo secundário que condiciona um aumento da fosfatúria e uma diminuição da fosfatemia (por ação da PTH nos nefrónios ainda funcionantes).

É apenas nas fases mais tardias da evolução da IRC que se observa um aumento da fosfatemia, a qual tem tendência a agravar-se, na ausência de intervenção terapêutica, mesmo após a utilização de prótese dialítica (40).

A retenção de fósforo e a hiperfosfatemia associam-se, classicamente, ao desenvolvimento da ODR e, nomeadamente, ao desencadear de um quadro de hiperparatiroidismo secundário (35; 41).

A restrição de fósforo na dieta permite reduzir a elevação dos níveis séricos de iPTH, e diminuir, ou mesmo prevenir, o desenvolvimento do hiperparatiroidismo secundário (42).

A hiperfosfatemia condiciona o aumento da secreção de PTH através de diversos mecanismos: 1) a hiperfosfatemia pode diminuir, de forma direta, os níveis de cálcio ionizado o que conduz à estimulação da secreção de PTH (43); 2) a hiperfosfatemia reduz a atividade da 1α -hidroxilase renal, levando à diminuição da síntese de calcitriol e consequentemente à diminuição do retro controlo negativo desta hormona sobre as células das glândulas paratiróides (44), sendo grande parte deste efeito mediado pelo aumento dos níveis circulantes de FGF-23 (ver abaixo) (45); e, finalmente, 3) o fósforo

pode aumentar a expressão do ARNm da pré-pro-PTH independentemente do calcitriol e do cálcio (46) e estimular a libertação de PTH de forma direta e independentemente dos níveis de calcitriol e de cálcio plasmático (47; 48).

A hiperfosfatemia associou-se a um aumento ARNm da PTH (49). De acordo com os resultados de Silver e colaboradores, este efeito é pós *transcricional*, e provavelmente deve-se a uma maior estabilidade do ARNm da PTH, na presença de hiperfosfatemia (50).

O fósforo parece ainda exercer um efeito direto na hiperplasia das células paratiróides, mediante a diminuição do ARNm e da própria tradução proteica do p21. Este último é um inibidor da quinase dependente da ciclina e conseqüentemente um inibidor da replicação celular. No modelo animal de urémia a hiperfosfatemia associou-se a uma diminuição do p21 e a um aumento da expressão do “transforming growth factor alpha” TGF- α , o qual induziu um aumento do “proliferating cell nuclear antigen” PCNA aparentemente específico do tecido paratiroide (51).

3.1.3. Fibroblast growth factor 23 (FGF-23), Klotho e esclerostina

O “fibroblast growth factor” FGF-23 é uma fosfatidina, (ou hormona fosfatúrica), produzida predominantemente nos osteócitos (e, em menor quantidade, nos osteoblastos), diretamente envolvida na eliminação urinária de fósforo, e no controlo da síntese e do metabolismo de vitamina D ativa (45; 52).

O FGF-23 é uma proteína de 227 aminoácidos (a que corresponde um peso molecular de 25 kilodalton), que foi identificada através da análise dum conjunto de proteínas com efeito fosfatúrico inapropriado, produzidas por tumores associados a osteomalácia hipofosfatemica (53).

Para além do esqueleto, que é a fonte de quase todo o FGF-23 circulante, esta proteína é ainda sintetizada pelo núcleo ventro-lateral do tálamo, no timo e nos nódulos linfáticos, onde parece exercer efeitos locais, ainda desconhecidos (52).

O FGF-23 reduz a reabsorção de fósforo pelas células dos tubos contornados proximais, através da internalização e consequente redução da expressão dos co-transportadores dependente de fósforo Npt2a e Npt2c, presentes na bordadura em escova da membrana apical destas células (53; 54).

Por este motivo, as patologias que cursam com aumento do FGF-23 (como por exemplo a osteomalácia tumoral, o raquitismo hipofosfatémico ligado ao cromossoma X e o raquitismo hipofosfatémico autossómico dominante) caracterizam-se por hipofosfatemia severa e hiperfosfatúria desadequada (53).

Em voluntários saudáveis, a sobrecarga de fósforo na dieta não induziu aumento dos níveis séricos de FGF-23, ao contrário do que se observa sistematicamente nos doentes com insuficiência renal crónica (55).

Na uremia verifica-se que os níveis circulantes de FGF-23 aumentam de forma progressiva à medida que a IRC se agrava (56; 57; 58).

Esta elevação pode ter várias causas, algumas delas associadas entre si, nomeadamente: tentativa de compensação da hiperfosfatemia (a mais relevante), retenção de FGF-23, ou ser secundária a terapêutica com vitamina D (14; 45).

Em resposta a uma sobrecarga de fósforo ou de $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$, observa-se uma estimulação na síntese de FGF-23 pelos osteócitos e pelos osteoblastos, o qual inibe a reabsorção de fósforo no tubo contornado proximal (aumentando a fosfatúria) e parece inibir a síntese e libertação de PTH (59) (ainda que este último efeito não seja universalmente encontrado em diferentes estudos) (60; 59).

A $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ e o fósforo regulam o FGF-23 de forma autónoma. Isto é evidenciado pelo desenvolvimento duma rápida e acentuada elevação dos níveis séricos de FGF-23, em resposta a uma dieta hiperfosfatémica, num modelo animal que não expressa o recetor da vitamina D (61).

O estímulo mais potente e mais rápido para o aumento da expressão do FGF-23 in vivo e in vitro (com aumento dos respetivos níveis séricos) é a $1,25(\text{OH})_2\text{-D}_3$, a qual induz uma resposta ao fim de 3 a 4 horas (62).

O aumento dos níveis de FGF-23 acompanha-se de aumento da expressão dos recetores para o cálcio e para a vitamina D, nas células paratiróides, o que vai contribuir para uma redução dos níveis séricos de PTH (59; 60).

No entanto, nos doentes hemodialisados, observa-se uma resistência das células paratiróides à ação do FGF-23, o que parece dever-se à diminuição da expressão dum recetor de membrana específico (FGFR1) e de um co-fator necessário (proteína Kloto) à sua ação, nestas células (63; 64) (ver discussão abaixo).

A identificação do FGF-23, como proteína sintetizada predominantemente pelos osteócitos (e em menor quantidade pelos osteoblastos em repouso), veio colocar estas células (com um papel até então desconhecido), no centro do controlo do metabolismo fosfo-cálcico e da osteodistrofia renal (65; 19).

Por métodos de imunohistoquímica em osso não descalcificado, de doentes com diferentes graus de insuficiência renal, foi possível demonstrar que os osteócitos expressam, para além de FGF-23, duas outras proteínas aparentemente envolvidas nos processos de síntese e de mineralização óssea: a DMP1 (“dentin matrix protein 1”) e a MEPE (“matrix extracellular phosphoglycoprotein”) (66).

Os doentes urémicos apresentam um marcado aumento da expressão de FGF-23 nos osteócitos, predominantemente nos localizados mais à periferia da trabécula óssea.

O mesmo não se observa nos osteoblastos, onde a expressão de FGF-23 aparece significativamente aumentada nos doentes urémicos, mas com intensidade independente do grau de insuficiência renal.

O agravamento da função renal acompanha-se de um aumento exponencial dos níveis séricos de FGF-23, (particularmente evidentes em doentes dialisados e anúricos, nos quais, estes níveis chegam a ser 600 a 1000 vezes o limite superior do normal) (67).

Estes resultados parecem apontar para um aumento da síntese de FGF-23, desde estádios muito precoces da insuficiência renal, mas para um provável mecanismo de retenção, nos estádios mais avançados da doença (66; 67).

Também a expressão da DMP1 surge aumentada nos osteócitos dos doentes urémicos, ao contrário da MEPE que não mostrou modificações em relação ao grupo controlo. As expressões de FGF-23 e de DMP1 correlacionaram-se negativamente com

o volume osteóide, o que poderá indicar uma função destas proteínas no processo de mineralização óssea do osso trabecular (66).

Tal como acima referimos, o FGF-23 atua nas células alvo, nomeadamente nas células tubulares renais e paratiróides, mediante a ligação a um recetor específico (FGFR1-fibroblast growth factor receptor 1). Esta ligação apenas se torna funcional, na presença da proteína “Kloto”, a qual constitui um corecetor, necessário à transformação do recetor inespecífico [FGFR1(IIIc)] para todos os FGF, no recetor FGFR1, específico do FGF-23 (68; 69).

Tendo em conta que o recetor inespecífico para todos os FGF tem uma distribuição sistémica, em múltiplos tecidos, a especificidade das diferentes ações do FGF-23, é definida pela distribuição da Kloto (60; 68).

As patologias que cursam sem expressão desta proteína, mimetizam, funcionalmente, as deficiências em FGF-23 (68).

Os gene da Klotho codifica 2 formas diferentes desta proteína: a forma transmembranária (mKloto-membrane bound Klotho com 130 Kd) e a forma livre (sKloto-secreted Klotho com 80 Kd) (70). A porção extracelular da forma transmembranária pode sofrer clivagem e este fragmento surgir também em circulação (a que corresponde a designação de cKloto-cut Klotho) (71).

O FGF-23 parece inibir a mineralização óssea (52), o que poderá resultar de uma ação direta, provavelmente amplificada pela redução dos níveis de vitamina D ativa, (por redução da síntese e, simultaneamente, aumento do metabolismo desta vitamina) (72; 19).

Num estudo realizado em 227 doentes, não diabéticos, com IRC ligeira a moderada, os níveis de FGF-23 foram bons preditores da gravidade da insuficiência renal e correlacionaram-se, positivamente, com os níveis séricos de fósforo e de paratormona intacta (12).

Num estudo de Ureña-Torres e colaboradores, em doentes integrados em programa regular de hemodiálise, os níveis séricos de FGF-23, apesar de estarem muito aumentados e de apresentarem uma forte correlação positiva com os níveis de fósforo

pré-diálise, não mostraram qualquer correlação significativa com os níveis de PTH, de vitamina D ou com marcadores da formação e da reabsorção óssea (67).

Tendo em conta que, neste estudo, os níveis de FGF-23 não variaram entre o início e o final da diálise, poderá admitir-se que resultados diferentes poderiam ter sido obtidos, caso tivessem sido usadas técnicas de hemodiálise mais convectivas, (que permitissem a remoção e/ou adsorção de parte desta proteína circulante).

A elevação dos níveis séricos de FGF-23, condiciona um aumento da excreção fracional de fósforo, e parece ser o marcador sérico do metabolismo fosfo-cálcico, mais precocemente alterado, no quadro da doença óssea e metabólica do doente urémico (60; 57).

A elevada correlação entre as determinações do FGF-23 intacto e do fragmento C-terminal exclui, aparentemente, a necessidade de efetuar as duas determinações em separado (73).

Curiosamente, a molécula intacta não mostrou vantagens discriminatórias (em comparação com a c-terminal) nas correlações com os níveis de fósforo, cálcio, iPTH, 25(OH) vitamina D3 e 1,25(OH)₂ vitamina D3, numa população de 77 doentes em programa regular de diálise (62 em hemodiálise e 15 em diálise peritoneal) (73).

Embora a maioria das determinações dos níveis séricos de FGF-23 tenham, até agora, sido obtidas no contexto de protocolos de investigação, é provável que a curto/médio prazo constituam mais um marcador não invasivo de utilidade clínica, na caracterização do metabolismo fosfo-cálcico, no doente urémico.

Por este motivo, faz sentido discuti-lo neste capítulo, tendo em conta o seu potencial como futuro indicador / mediador bioquímico envolvido na remodelação óssea.

Nas fases iniciais da IRC, a elevação do FGF-23 é mais precoce e mais pronunciada que o aumento dos níveis circulantes de iPTH. Para este resultado contribui, muito provavelmente, o efeito de retro controlo negativo, exercido pelo FGF-23 na síntese de iPTH pelas glândulas paratiróides (74; 60).

No entanto, à medida que a IRC se agrava, os níveis de 1,25(OH)₂ vitamina D3 estão mais reduzidos devido à ação do FGF-23 (que diminui a síntese e aumenta o

catabolismo desta vitamina). Nesta fase reduz-se o retro controlo negativo da 1,25(OH)₂ vitamina D₃ sobre as células paratiróides, observando-se elevação progressiva da iPTH (75).

Deste modo, nas fases de IRC ligeira a moderada o aumento do FGF-23 contribui geralmente para a redução dos níveis de iPTH, enquanto nas fases de IRC mais grave, a elevação exponencial dos níveis de FGF-23 acompanha-se, habitualmente, de elevação dos níveis de iPTH, de causa multifatorial (redução da 1,25(OH)₂ vitamina D₃, redução do coreceptor Klotho nas células paratiróides e hiperfosfatemia).

O FGF-23 surge ainda, direta e indiretamente, envolvido no “diálogo” entre as células participantes na remodelação e mineralização óssea e as estruturas do sistema cardiovascular (76; 58).

Na grande maioria dos estudos, níveis séricos mais elevados de FGF-23 têm sido associados a aumento da morbidade e mortalidade em hemodialisados (77; 13; 65; 78; 79; 80; 81; 82; 83).

Esta associação poderá resultar do agravamento da hipertrofia ventricular e dos cardiomiócitos (78; 79), da doença coronária (84), e das calcificações cardiovasculares (85), todas elas associadas positivamente a níveis séricos mais elevados de FGF-23.

Os mecanismos fisiopatológicos que justificam este aumento da morbimortalidade associada a níveis circulantes elevados de FGF-23, são variados:

- 1) Estímulo da enzima de conversão da angiotensina com ativação do eixo renina-angiotensina (86);
- 2) Inibição da produção de óxido nítrico (87; 81);
- 3) Redução da expressão da Klotho no tecido renal a qual é potenciada pela deficiência em vitamina D (88).

No entanto, são necessários estudos prospetivos aleatorizados, a longo prazo, incluindo com recurso a biopsias ósseas e a avaliação de critérios validados de patologia cardiovascular, para podermos identificar o FGF-23 como um fator independente de morbidade e mortalidade nos doentes urémicos (e para excluir que não é, apenas, mais um marcador da hiperfosfatemia).

Outro mediador que foi recentemente envolvido na fisiopatologia do metabolismo ósseo e mineral é a esclerostina. Apesar dos seus mecanismos de ação não estarem ainda completamente esclarecidos, a esclerostina parece exercer os seus efeitos através da ligação ao recetor de membrana LRP5/6 “(LDL-recetor-related protein 5 and 6”.

Desta ligação resulta uma inibição da via de ativação celular *Wnt*, que induz uma aumento da degradação da β -catenina e, conseqüentemente, uma diminuição da síntese de matriz proteica (89).

A esclerostina é uma proteína sintetizada pelos osteócitos e pelos condrócitos, (em resultado da expressão do gene *SOST*), que foi igualmente envolvida nos processos fisiopatológicos observados na osteodistrofia renal (90).

As principais ações da esclerostina vão no sentido da redução da formação óssea. A síntese e libertação de esclerostina pelos osteócitos vai induzir uma redução da ativação e proliferação dos osteoblastos, bem como um aumento da apoptose destas células (91).

Em concordância com esta ação, estão os resultados de Cejka e colaboradores, que identificaram uma relação inversa entre a esclerostina e a PTH intacta, bem como uma correlação igualmente negativa entre a esclerostina e os 3 parâmetros histomorfométricos mais relevantes da formação óssea: a taxa de formação óssea (BFR-bone formation rate), a frequência de ativação e a superfície osteoblástica (92).

Valores baixos de esclerostina apresentaram um índice preditor positivo no diagnóstico de doença óssea de elevada remodelação, superior aos dos níveis elevados de iPTH. Pelo contrário, os níveis de iPTH apresentaram um índice preditivo negativo mais elevado, no diagnóstico de doença óssea de elevada remodelação.

Infelizmente, como discutiremos ao longo dos próximos subcapítulos, continuamos sem ter marcadores não invasivos, que permitam fazer a distinção entre doença óssea adinâmica e remodelação óssea normal.

Também a esclerostina não mostrou vantagens acrescidas neste diagnóstico diferencial (92).

3.1.4. Vitamina D

Na espécie humana, a vitamina D obtém-se a partir da exposição à luz solar e através da dieta.

A radiação ultravioleta tipo β (com um comprimento de onda entre 290 e 315 nm), penetra na pele e transforma o 7-desidrocolesterol em pré-vitamina D3 a qual, por sua vez, se transforma, rapidamente, em vitamina D3 (93).

A partir da dieta obtém-se vitamina D2 (ou ergocalciferol, de origem vegetal) e vitamina D3 (ou colecalciferol, de origem animal). A maioria dos alimentos suplementados em vitamina D, têm adicionada a forma D3 (93; 94; 95).

O ergocalciferol e o colecalciferol têm uma vida média em circulação inferior a 24 horas, sendo metabolizadas no fígado, por ação da 25-D-hidroxilase, em 25(OH)-D2 (ou ercalcidiol) e 25(OH)-D3 (ou calcidiol), as quais são medidas no soro conjuntamente, e globalmente designadas por 25-(OH) vitamina D (96).

A vida média da 25-(OH) vitamina D é de aproximadamente 3 semanas, constituindo a sua determinação a melhor forma de caracterizar os níveis de vitamina D de um indivíduo (97; 98).

O método mais sensível e específico para determinar a 25-(OH) vitamina D é a cromatografia líquida de elevada rentabilidade (HPLC-“high performance liquid chromatography”) (96).

No entanto, tendo em conta que este método é moroso, muito dependente do observador e de elevado custo, tem sido substituído, com sucesso e excelente concordância nos resultados, por métodos semiautomáticos (rádioimunoensaio) e totalmente automáticos (quimiluminescência) (99; 100).

Ao longo dos últimos anos, tem sido dado particular relevo ao papel da 25-(OH) vitamina D, em diversos processos fisiológicos envolvendo múltiplos sistemas, bem como na mediação ou amplificação de variados processos patológicos (101; 102).

Estes processos mediados ou condicionados pela 25-(OH) vitamina D, foram igualmente avaliados por nós, numa população de doentes hemodialisados, sendo os resultados desta investigação detalhadamente descritos no capítulo 6.

Os níveis séricos ideais de 25-(OH) vitamina D situam-se num intervalo entre 30 e 60 ng/ml. Níveis séricos entre 15 e 30 ng/ml correspondem a insuficiência, e abaixo de 15 ng/ml traduzem deficiência nesta vitamina (103; 31).

A população com IRC também se caracteriza, muito frequentemente, por insuficiência ou deficiência em 25-OH vitamina D3. De acordo com as orientações dos K-DOQI a deficiência em calcidiol deve ser corrigida desde os estádios precoces da IRC (104).

O calcidiol [25(OH)-D3] é o substrato da forma mais ativa da vitamina D que é o calcitriol [1,25(OH)₂-D3]. Ao contrário do que, até recentemente, se pensava, a hidroxilação na posição 1 não se realiza apenas no rim, mas aparentemente em muitas outras células alvo da vitamina D (101).

Deste modo os níveis reduzidos de calcidiol parecem ter uma relevância significativa e independente, nos doentes urémicos e na morbilidade associada aos quadros de HPTH 2°.

Níveis séricos diminuídos de calcidiol induziram hipertrofia ventricular esquerda, e ativação do sistema renina-angiotensina, num modelo animal “*knockout mice*” para o recetor da vitamina D (104; 105).

A deficiência em vitamina D foi associada a risco aumentado de calcificações vasculares nos doentes urémicos, bem como a maior rigidez arterial (104; 106). Curiosamente as correlações negativas entre os níveis de calcitriol e calcificações vasculares, e entre os níveis de calcidiol e calcificações vasculares, observadas em hemodialisados, foram muito mais evidentes em relação a esta última forma de vitamina D (104; 106).

Num estudo prospetivo, com avaliação de 223 doentes hemodialisados no mesmo centro de diálise, e tratados de acordo com os “K-DOQI guidelines” tivemos a oportunidade de documentar que apenas 20,6 % e 4,5% dos doentes tinham níveis séricos normais de [25(OH)-D3] e de [1,25(OH)₂-D3], respetivamente (107).

Na nossa avaliação, os níveis séricos de 25-OH-D3 correlacionaram-se negativamente com a idade, com marcadores de inflamação, de desnutrição e com a presença de diabetes (107) (ver capítulo 6).

Numa avaliação efetuada em 419 transplantados numa unidade Canadiana, apenas 24,5% dos doentes apresentava níveis séricos de [25(OH)-D3] normais. Em análise univariada, os níveis de [25(OH)-D3] e de albuminemia nestes doentes, associaram-se, negativamente, e de forma significativa, com os níveis séricos de paratormona intacta (108).

É importante ter presente que a maioria dos nossos doentes transplantados apresentam IRC e frequentemente desenvolvem quadros de hiperparatiroidismo secundário de grau variável.

Igualmente em 462 doentes diabéticos tipo 2, com insuficiência renal de grau variável (estádios 2 a 4), a insuficiência em [25(OH)-D3], observada na grande maioria dos doentes, associou-se a positivamente e de forma independente, à presença de doença cardiovascular (102).

Exatamente no mesmo sentido apontam os nossos resultados, obtidos numa população de doentes prevalentes em programa regular de hemodiálise.

Num estudo prospetivo, com uma duração de 4 anos, acabámos de evidenciar que níveis de deficiência em [25(OH)-D3] (inferiores a 15 ng/mL) se associaram a um aumento significativo da mortalidade global e da mortalidade de causa cardiovascular, em comparação com os doentes que apresentavam valores basais superiores a 15 ng/mL.

Esta diferença foi significativa e mantida, desde os primeiros 12 meses de duração do estudo, e não se modificou pelo fato dos doentes terem sido sujeitos a suplementação com colecalciferol (109). Os resultados e implicações deste estudo serão discutidos nos capítulos 6 e 7.

A maioria dos doentes com IRC ligeira (em fase 2, com débito do filtrado glomerular de 60 a 90 mL/min) apresenta já deficiência, ou pelo menos insuficiência, em [1,25(OH)₂-D3] (calcitriol). Nos estádios mais graves da IRC esta deficiência acentua-se de forma progressiva (15; 97).

A deficiente síntese renal de calcitriol, de forma relativa ou absoluta, é apontada como um dos fatores de maior relevância no desencadeamento dos processos patológicos que conduzem à doença óssea de elevada remodelação, na urémia.

Embora a etiologia desta deficiente produção de calcitriol seja multifatorial e não esteja completamente esclarecida, ela parece resultar, predominantemente, do efeito inibitório do FGF-23, mediante a inibição da 1- α hidroxilase renal (reduzindo a síntese de calcitriol) e, simultaneamente, da estimulação da 24-hidroxilase (aumentando a degradação do calcitriol).

Também a diminuição da massa renal funcionante (56), bem como o aumento da concentração de fósforo intracelular, nas células do epitélio tubular renal (23), têm sido apontados como fatores etiopatogénicos da deficiência em calcitriol.

O calcitriol é o principal estímulo da reabsorção intestinal de cálcio, promove a libertação de cálcio ósseo e exerce um efeito de retro controlo negativo sobre a síntese e libertação de PTH (110). Estimula ainda a absorção intestinal de fósforo, podendo, por esse motivo, induzir ou agravar um quadro de hiperfosfatemia (18).

Na ausência de quaisquer intervenções terapêuticas, o doente urémico, (ao contrário do que se observa noutras patologias do metabolismo mineral que cursam com hipocalcemia), apresenta a regulação do eixo PTH-calcitriol perturbada: os níveis plasmáticos de FGF-23 e de PTH, encontram-se habitualmente elevados, e os níveis séricos de calcitriol estão caracteristicamente diminuídos, desde fases iniciais da evolução da IRC (24; 111; 112).

Deste modo, a alteração óssea e do metabolismo mineral mais típica da IRC, nos casos em que não houve qualquer intervenção terapêutica prévia, é a doença óssea de elevada remodelação, habitualmente designada por osteíte fibrosa (quando se sublinha os achados histológicos) ou por hiperparatiroidismo secundário (dando destaque à etiopatogenia subjacente, predominante).

Em resumo, tal como foi expresso nas propostas do KDOQI (“*Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*”) (31) e, mais recentemente, nas do KDIGO (“*Kidney Disease Improving General Outcomes*”) (32), a determinação dos níveis séricos de vitamina D [e especialmente da 25(OH)-vitamina D] está indicada nos doentes urémicos, para diagnosticar e corrigir a frequente insuficiência/deficiência (106; 113).

Esta determinação é ainda relevante, no contexto da presente discussão, para o diagnóstico não invasivo da ODR, tendo em conta que a deficiência em vitamina D se pode associar a compromisso significativo da mineralização óssea e a redução do volume ósseo total (cortical e/ou trabecular), sendo, por este mecanismo, uma das principais causas do hiperparatiroidismo secundário (36; 114; 16; 115).

3.1.5. Paratormona

O doseamento da paratormona (PTH) constitui um das ferramentas mais relevantes para o diagnóstico não invasivo da ODR, tendo em conta o papel central desenvolvido pelas glândulas paratiróides, a correlação entre os níveis circulantes de PTH e a remodelação óssea observada na avaliação histológica, e ainda pela generalização e longa experiência na determinação dos níveis, séricos ou plasmáticos, desta hormona (116; 117; 118; 119).

Infelizmente, como veremos ao longo deste capítulo e do próximo (capítulo 4 – diagnóstico invasivo da ODR), os níveis de PTH apresentam baixa sensibilidade e especificidade no diagnóstico dos diversos tipos de doença óssea metabólica.

Esta limitação é particularmente evidente quando tentamos optar por decisões terapêuticas a aplicar em doentes específicos, tendo como suporte, apenas, os níveis de PTH (120).

Conscientes destas dificuldades, sentimo-nos particularmente estimulados em eleger esta como uma das nossas principais linhas de investigação, tentando otimizar as informações fornecidas pelos níveis de PTH, em conjugação com outros marcadores não invasivos da remodelação óssea.

Os níveis séricos (ou plasmáticos) de PTH elevam-se desde estádios precoces (habitualmente estágio 3) do desenvolvimento da IRC, tendo tendência a aumentar, caso não haja intervenção terapêutica, à medida que se instala um quadro de hiperparatiroidismo secundário (121).

Pelo menos desde o estágio 2 da IRC, pode ser documentada uma diminuição dos níveis séricos de calcitriol, e um aumento “em espelho”, ainda que ligeiramente atrasado no tempo, dos níveis de paratormona (121; 111; 122).

E, ainda mais precocemente que estas alterações, observa-se uma elevação significativa dos níveis de FGF-23, a qual vai ser responsável, em grande medida, (direta e indiretamente), pelo aumento da PTH circulante, e pela redução dos níveis séricos de calcitriol, acima referidos (12; 55).

O recente reconhecimento deste papel do FGF-23, desde estádios iniciais da IRC, permite-nos atualizar e completar a teoria de “*trade off*” apresentada por Bricker, à comunidade científica nefrológica há cerca de meio século (19).

Os quadros de HPTH 2º cursam, habitualmente, com níveis séricos elevados de paratormona, traduzindo a estimulação das glândulas paratiróides.

A hiperplasia das células paratiróides, que caracteriza o HPTH 2º, é de etiologia multifatorial, nomeadamente: 1) retenção de fósforo; 2) aumento dos níveis circulantes de FGF-23; 3) diminuição dos níveis séricos de vitamina D; 4) diminuição dos níveis séricos de cálcio ionizado; 5) diminuição da expressão dos recetores de vitamina D e dos recetores de cálcio nas células paratiróides; 6) resistência à ação periférica da PTH mediada pela menor expressão tecidual dos respetivos recetores; e 7) diminuição da expressão da klotho e dos recetores do FGF-23 nas células das glândulas paratiróides.

Estes fatores surgem interdependentes e correlacionados entre si, constituindo, frequentemente, verdadeiros “ciclos viciosos”, que conduzem ao agravamento progressivo do HPTH 2º.

Importa sublinhar que, níveis séricos elevados de PTH não significam, necessariamente, a presença de “osteíte fibrosa quística”, nem mesmo hiperremodelação óssea.

Os níveis séricos de paratormona devem ser interpretados de forma dinâmica, tendo em conta os diversos fatores, (muitos deles de curto prazo), que influenciam a síntese e a libertação de paratormona para a circulação, bem como dos mecanismos envolvidos no metabolismo desta hormona.

Pelo contrário, as modificações na remodelação óssea são sempre de evolução mais lenta, e a resposta é desfasada no tempo, em relação às variações dos níveis circulantes de PTH.

Estes aspetos fisiopatológicos são claramente reconhecidos nas últimas orientações da KDIGO (96) que, (ao contrário das antigas propostas pelas KDOQI) (31) valorizam mais a tendência de evolução dos níveis de PTH, que os respetivos valores absolutos.

Para além da resistência periférica à PTH, existem muitos outros fatores que podem impedir, ou pelo menos limitar, a informação proporcionada pelos níveis circulantes de PTH, nomeadamente: ritmo circadiano da PTH, efeito da dieta, idade, sexo, menopausa, terapêutica hormonal substitutiva na menopausa, insuficiência hepática, intoxicação por metais, grau de insuficiência renal e da função renal residual, método laboratorial de doseamento da PTH utilizado, níveis de vitamina D nativa e de vitamina D ativa, tipo de diálise (duração, eficácia, grau de convecção, tipo de dialisador), etc. (120; 119; 123).

Tendo em conta a resistência periférica à ação da PTH, bem como os dados histomorfométricos de biopsias ósseas realizadas em doentes com IRC, os níveis alvo propostos pelos KDOQI “*guidelines*”, para esta população, situavam-se entre 150 e 300 pg/mL de PTH intacta (ver abaixo) (31).

Foi dentro destes valores limite, que com maior frequência, (sobretudo nos manuscritos publicados durante a década de 90), os doentes apresentavam histologia óssea normal ou com menores alterações histológicas (124).

Os níveis séricos de iPTH, embora constituindo um bom marcador da remodelação óssea nos doentes dialisados, não permitiram separar a atividade de formação da atividade de reabsorção óssea, tendo surgido sempre correlacionados, com maior significado estatístico, com a superfície osteoblástica quando comparada com a superfície osteoclástica (ver capítulo 4).

Em análises de grandes populações de doentes ou na avaliação de múltiplos resultados agregados, os níveis circulantes de PTH correlacionam-se habitualmente com a remodelação óssea, observada em biopsias ósseas de doentes sujeitos a hemodiálise e a DPCA.

No mesmo sentido, em resultados agregados, a evolução dos níveis desta hormona acompanhou, da forma esperada, as intervenções terapêuticas (por exemplo: redução da PTH sérica a níveis vestigiais após paratiroidectomia total eficaz; elevação progressiva após terapêutica da intoxicação alumínica com desferroxamina, etc.) (125; 126) (127).

Níveis diminuídos de PTH são habitualmente observados em circulação, nos doentes com doença óssea adinâmica ou com extensos depósitos de alumínio na frente de mineralização óssea (ver capítulo 4).

No que respeita aos doentes com diagnóstico histológico de osteomalácia (progressivamente mais raros) os níveis séricos de PTH apresentam variações de mais difícil justificação e interpretação (128; 126).

Pelo contrário, o diagnóstico de HPTH 2º num doente específico, baseado apenas num valor isolado de PTH, pode ser particularmente difícil, como pudemos demonstrar recentemente, num ensaio aleatorizado com dupla biopsia óssea, no qual cerca de 1/3 dos doentes com PTH normal ou elevada (acima dos 150 pg/ml proposto nos “*K-DOQI guidelines*” para a população IRC em estágio 5) apresentavam osso adinâmico (129) (ver discussão pormenorizada no capítulo 4).

Até ao início dos anos 90, assistiu-se a uma acentuada dificuldade na interpretação dos níveis séricos da PTH nos doentes urémicos, face à elevada variabilidade, intra-ensaio e inter-ensaio, das respetivas determinações.

A reduzida consistência e reprodutibilidade destes doseamentos devia-se à utilização de anticorpos para a porção C-terminal ou para a região média da molécula da PTH (cujos fragmentos se acumulam no quadro da IRC dando origem a reações cruzadas) (125).

Na década de 90, mediante a utilização de um duplo anticorpo contra a molécula de PTH, passou a determinar-se a denominada paratormona intacta (iPTH) por método imunométrico de 2ª geração (130; 131).

Assumiu-se que, com este método e mediante a utilização do duplo anticorpo, se excluía a interferência dos fragmentos da PTH, aparentemente inativos, na determinação dos níveis desta hormona (125).

No entanto, o método laboratorial de determinação dos níveis séricos de PTH interfere significativamente nos resultados obtidos, tendo motivado acesa discussão da comunidade nefrológica ao longo dos últimos anos.

Há mais de uma década, Brossard e colaboradores (132) demonstraram que o método imunométrico de 2ª geração, para determinação da denominada PTH intacta, ainda reagia com alguns fragmentos da PTH, nomeadamente das porções média e C-terminal da molécula.

De entre os diversos fragmentos da PTH que reagem com os métodos imunométricos de 2ª geração ganham particular relevo, no quadro urémico, a acumulação de fragmentos C-terminal, nomeadamente o 7-84 PTH.

Este fragmento 7-84 da PTH parece ter alguns efeitos antagónicos aos da PTH 1-84, e a sua acumulação resulta do aumento da secreção pelas glândulas paratiróides e da diminuição de excreção renal. O fragmento 7-84 parece induzir hipocalcemia, exercendo os seus efeitos através da ligação a um recetor específico para todos os fragmentos PTH-C terminais (133; 134).

Os diferentes doseamentos da PTH intacta, por método imunométrico de 2ª geração, mostraram ainda uma elevada variabilidade de -44.9% a +123% quando comparados com o ensaio da “*Allegro*”, o mais frequentemente utilizado, na determinação da denominada PTH intacta (118). Foi com base nos resultados laboratoriais obtidos com a utilização deste ensaio, que foram definidos os valores alvo para a PTH propostos nos KDOQI (31).

Esta variabilidade tão acentuada ilustra a necessidade de aplicar fatores de correção e, frequentemente, impossibilita a comparação dos resultados obtidos com ensaios de diferentes laboratórios.

Mais recentemente, o mesmo grupo do Prof. Souberbielle evidenciou que a definição de valores de PTH normais, com base na determinação numa população saudável e sem carência em vitamina D nativa, é mais adequada que a consideração dos limites de normalidade propostos pelos fabricantes dos respetivos ensaios (119).

Os doseamentos de PTH intacta são ainda afetados pelo meio em que são efetuados, tendo-se observado maior estabilidade e menor variabilidade nas

determinações efetuadas no soro, em comparação com as determinações no plasma (EDTA ou citratado) (135). Por este motivo, deve ser dada preferência às determinações no soro.

Perante a dificuldade na interpretação destes resultados e, nomeadamente, após o reconhecimento de que mesmo com os ensaios de 2ª geração continuava a observar-se interferência dos fragmentos da molécula de PTH, foi desenvolvido um ensaio imunoradiométrico denominado de 3ª geração.

Neste método de doseamento da PTH, são utilizados anticorpos específicos para os 3 primeiros aminoácidos da extremidade N-terminal da PTH. Por este método passou a dosear-se a chamada “*whole PTH*”, “PTH bio-intacta” ou “PTH bio-activa” (136).

Apesar destes métodos imunoradiométricos de 3ª geração ainda não estarem disponíveis em muitos centros clínicos, ao longo dos últimos anos vários autores têm defendido as vantagens da utilização destes ensaios laboratoriais na caracterização da atividade paratiroide nos doentes urémicos.

No entanto, os níveis de PTH medidos por métodos imunoradiométricos de 3ª geração ainda carecem de validação clínica e histológica, tendo em conta que os estudos histomorfométricos publicados, e as propostas de “*guidelines*”, se basearam em métodos imunométricos de 2ª geração.

Na comparação da determinação dos níveis de PTH através de oito métodos de segunda geração e dois de terceira geração efetuada recentemente pelo grupo de Jean-Claude Souberbielle, a que já fizemos referência, mais importante que a geração do método utilizado foi a definição de valores normais para cada ensaio (119).

Nesta elegante investigação, comparando os dois ensaios que apresentavam os valores absolutos mais alto e mais baixo de PTH, verificou-se uma discordância de diagnóstico em 56,4% dos casos (se fossem aplicadas as propostas KQOQI), de 36,2% (se fossem aplicados os intervalos KDIGO), mas de apenas 16,1% (se fossem aplicados os intervalos KDIGO mas tendo como padrão os valores laboratoriais de uma população não doente, sem carência em vitamina D, com doseamentos simultâneos nesse laboratório) (119).

Estes resultados sublinham a importância de serem utilizados como valores normais de determinado laboratório, os que resultam da quantificação dos níveis de PTH (seja por método de 2ª ou de 3ª geração), numa população normal suplementada em vitamina D nativa, efetuada nesse mesmo laboratório.

Uma conclusão mais convincente, sobre quais os níveis de PTH, medidos por métodos imunoradiométricos de 3ª geração, que serão adequados a uma remodelação óssea normal, apenas poderá ser obtida a partir da avaliação simultânea de um grande número de biopsias ósseas e dos diferentes marcadores não invasivos da remodelação óssea (incluindo as diferentes proteínas e fragmentos da PTH).

Este é, precisamente, um dos projetos em curso no KDIGO (*Kidney Diseases Improving Global Outcomes*), no qual temos estado envolvidos nos últimos anos.

Nesta iniciativa, muito ambiciosa, do KDIGO foram reavaliadas cerca de 800 biopsias ósseas realizadas no nosso Serviço de Nefrologia do Hospital Curry Cabral, no Brasil, nos EUA, na Turquia e na Venezuela.

Os resultados histomorfométricos de 612 destas 800 biopsias ósseas, provenientes destes 5 centros internacionais, para as quais existiam soros colhidos simultaneamente com os fragmentos ósseos, (e conservados por um período inferior a 10 anos entre -20 e -80°C) foram correlacionados com resultados dos doseamentos de diversos marcadores da remodelação óssea. Estes últimos foram medidos centralmente, no laboratório Nordic Bioscience (Dinamarca) e incluíram: paratormona intacta (*intact PTH* de 2ª geração, determinada pelo método de quimioluminescência, com um ensaio do laboratório Roche); a “whole PTH” ou PTH de 3ª geração (com um ensaio do laboratório Scantibodies); a fosfatase alcalina óssea, medida por imunoensaio (do laboratório Quidel); e o Propeptido do Procolagénio tipo I (medido por método de quimiluminescência com o ensaio do laboratório Roche).

Pretendemos, numa primeira análise, comparar a capacidade discriminatória dos alvos da PTH (2ª versus 3ª geração) em função dos objetivos definidos pelos K/DOQI, versus os definidos nos objetivos KDIGO. A remodelação óssea foi avaliada pela taxa de formação óssea (“*bone formation rate*”) e pela “frequência de ativação” (“*activation frequency*”).

Verificámos que os níveis de PTH de 2ª geração inferiores versus superiores a 150 pg/ml (propostos nos K/DOQI), apresentavam uma baixa sensibilidade (68,5%) e ainda mais baixa especificidade (61,2%) no diagnóstico de baixa remodelação versus “não baixa” (isto é, normal ou elevada) remodelação óssea.

Deste modo, os níveis de PTH intacta (2ª geração) apresentaram, na nossa análise, um reduzido valor preditivo positivo (71%) e ainda menor valor preditivo negativo (57,7%), no diagnóstico de doença óssea adinâmica (137).

No que respeita aos limites superiores de PTH de 2ª geração, definidos nos K/DOQI (300 pg/ml), para o diagnóstico de doença óssea de elevada remodelação, também encontrámos uma sensibilidade de apenas 58% e uma especificidade de 77,7% no diagnóstico diferencial das situações de remodelação óssea normal ou baixa. Isto é, valores de PTH de 2ª geração apresentaram um valor preditivo positivo de doença óssea de elevada remodelação de apenas 34,8%, embora o valor preditivo negativo tenha sido de 90%.

Quando passámos a considerar os novos objetivos KDIGO para a PTH de 2ª geração (entre 2 e 9 vezes o limite superior do normal, para o ensaio de doseamento da PTH utilizado), verificámos resultados sobreponíveis aos dos limites K/DOQI, na discriminação entre doença óssea adinâmica versus remodelação óssea normal ou elevada.

Já no que respeita ao diagnóstico de doença óssea de elevada remodelação, os limites da KDIGO para a PTH de 2ª geração (superior a 9 vezes o limite superior do normal), apresentaram uma elevada especificidade (85,8% a que correspondeu um valor preditivo negativo de 86,9%), mas com uma sensibilidade dececionante, de 37% (correspondendo-lhe um valor preditivo positivo de apenas 34,9%).

Pela primeira vez, tivemos oportunidade de testar, simultaneamente, os níveis de PTH de 3ª geração (“Whole PTH”) e os novos critérios KDIGO, numa vasta população de doentes sujeitos a histomorfometria óssea.

Os nossos resultados mostraram que se observa apenas um aumento marginal, e provavelmente sem qualquer significado clínico, na sensibilidade (73,5% versus 65,7%) no diagnóstico de doença óssea de baixa remodelação e na especificidade (de 86,9% para 87,9%) no diagnóstico de doença óssea de elevada remodelação, quando se passa

dos doseamentos de PTH de 2ª para 3ª geração (de acordo com os valores alvo definidos pelos objetivos KDIGO) (137).

Considerando os valores de PTH intacta (de 2ª geração) como uma variável contínua, a área sob a curva (análises de curva ROC), mostrou valores otimizados de corte para o diagnóstico de remodelação baixa versus não baixa de 104 pg/ml e para o diagnóstico de elevada versus não elevada remodelação de 243 pg/ml.

A correlação entre os doseamentos de PTH de 2ª versus os de 3ª geração (*intact PTH versus whole PTH*), que fizemos no laboratório central, foi excelente ($r=0,926$; $p<0,0001$).

Por este motivo e face aos resultados sobreponíveis que encontramos, nas correlações com os parâmetros histomorfométricos da formação e da reabsorção óssea, não nos parece que se justifique, na grande maioria dos casos, a utilização de métodos mais laboriosos e dispendiosos, de doseamento da PTH de 3ª geração (138). Esta foi uma conclusão relevante da nossa investigação, que discutiremos no capítulo 7.

Nesta mesma população efetuámos um outro estudo original, no qual utilizámos, pela primeira vez, a nova classificação da osteodistrofia renal proposta pela KDIGO.

Os 612 doentes biopsados foram caracterizados em função da nova classificação TMV (T=Turnover; M=Mineralization; V=Volume) da KDIGO. Verificámos que 33% dos doentes tinham um diagnóstico de baixo volume (V), baixa remodelação (T) e normal mineralização. Este foi o grupo mais numeroso, a que correspondia o diagnóstico de doença adinâmica na anterior classificação (138).

De salientar que, nesta população, 24,4% dos doentes tinham remodelação óssea normal, 30,9% um volume ósseo total normal e que apenas 16,% dos doentes apresentavam compromisso da mineralização óssea.

Concluimos que a nova classificação TMV da KDIGO permitiu classificar todas as lesões encontradas de forma válida, claramente discriminativa e muito mais informativa, que as avaliações clássicas da osteodistrofia renal.

No entanto, nenhum dos marcadores de remodelação óssea estudados permitiu o diagnóstico de um compromisso da mineralização, nem foi útil no rastreio da doença óssea de baixa remodelação, no doente urémico (139).

Apenas níveis séricos muito baixos de fosfatase alcalina óssea (inferiores ao percentil 75 do normal) foram úteis como indicador preditivo positivo de doença óssea adinâmica.

Pelo contrário, todos os marcadores bioquímicos foram úteis no rastreio da doença óssea de alta remodelação, com valores de corte de PTH de 2ª geração 5 vezes acima do limite superior do normal, PTH de 3ª geração 4 vezes acima do limite superior do normal, fosfatase alcalina óssea 1,75 vezes acima do limite superior do normal e Propeptido do Procolagénio tipo I 10 vezes acima do limite superior do normal.

No entanto, embora tenham sido todos úteis no rastreio da doença óssea de elevada remodelação (tendo associado um elevado índice preditivo negativo), nenhum foi útil no diagnóstico de doença óssea de elevada remodelação (índice preditivo positivo muito baixo) (139).

O uso do rácio entre a PTH 1-84/PTH 7-84 tem sido defendido por Malluche e colaboradores, com base em resultados histomorfométricos de doentes com IRC em diversos estádios de evolução, e particularmente nos nunca tratados (“doentes *naive*”) com vitamina D (140).

Para estes autores, a utilização deste rácio foi particularmente sensível no diagnóstico de doença adinâmica versus doença óssea de elevada remodelação, em doentes urémicos melanodermicos (141).

No entanto, 2 outros estudos, também com histomorfometria óssea, não conseguiram confirmar a vantagem da utilização dos métodos de 3ª geração, nem do rácio PTH 1-84 / PTH 7-84 no diagnóstico do tipo de osteodistrofia renal subjacente (142; 143).

Mais recentemente, Monier-Faugere e colaboradores encontraram uma associação oposta do calcitriol versus paricalcitol sobre o rácio PTH 1-84 / PTH 7-84 em doentes com IRC em fase 5.

Estes autores descreveram para um nível de PTH intacta semelhante, um nível de PTH bioativa (1-84) mais baixa nos doentes tratados com calcitriol em comparação com os tratados com paricalcitol (144).

Estes resultados referentes ao rácio PTH 1-84 / PTH 7-84, no entanto, necessitam ser confirmados em populações mais vastas, e tratando-se de simples associações, não nos permitem fazer qualquer tipo de considerações fisiopatológicas.

3.1.6. Expressão do recetor PTH-PTHrP (manuscritos 1, 2 e 3)

Uma das limitações mais relevantes, à utilização dos níveis circulantes de PTH, como indicador não invasivo da remodelação óssea, é a resistência periférica à ação desta hormona, documentada em diversos tecidos.

Na nossa investigação documentámos esta resistência e alguns dos seus mecanismos, no tecido ósseo, aquele que constitui um dos principais alvos desta hormona.

O conceito de resistência periférica à ação da PTH, ganhou consistência após a sequenciação do RNAm do recetor da paratormona / paratormona “*related protein*” (PTH/PTHrP), em 1992, pelo grupo de Segre e colaboradores (145).

Esta sequenciação permitiu ao grupo de investigadores liderado pelo Prof. Tilman Drüeke, em Paris, caracterizar a expressão deste recetor em variados tecidos, bem como avaliar a influência de diversos fatores e patologias na expressão do mesmo (146).

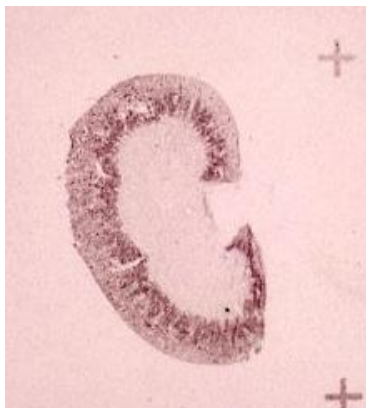
Tivemos a oportunidade integrar esta equipa de investigação e de participar, desde as fases precoces, nos estudos sobre a expressão do gene do recetor da PTH/PTHrP, num modelo experimental de I.R.C., obtido após 6 semanas de nefrectomia de 5/6 (rato Wistar de 12 semanas de vida e 6 semanas de insuficiência renal).

Verificámos que a expressão do ácido ribonucleico mensageiro (ARNm) do gene do recetor da PTH/PTHrP, ao nível do rim, se encontra marcadamente diminuída no quadro da IRC experimental (147), como é evidenciado nas imagens seguintes:



Na imagem renal da direita apresenta-se a expressão do ARNm do recetor da PTH/PTHrP por *hibridização in situ*, no animal normal; na imagem central apresenta-se ao centro a expressão no modelo animal de IRC experimental (onde está claramente diminuída) e, finalmente, a imagem da esquerda (“sense”) corresponde ao controlo negativo.

Nas duas fotos seguintes, é claramente distinta a expressão do recetor da PTH/PTHrP que está diminuída na imagem superior, correspondente ao modelo animal de IRC experimental, em comparação com o animal normal (imagem inferior).



Esta diminuição acompanhou-se, igualmente, da redução de produção de adenosina-monofosfato cíclico (AMPC), pelo extrato de membranas das células renais, após estimulação pela PTH (147).

Estas observações sugerem a diminuição do número de recetores da PTH/PTHrP ou modificações pós-recetor, a nível renal, no quadro da I.R.C. (147).

Down-regulation of the PTH/PTHrP Receptor in Uremia

Pablo Ureña¹, Michael Mannstadt¹, Milan Hruby¹, Aníbal Ferreira¹,
Gino V. Segre², Tilman Drüeke¹

¹INSERM Unité 90 and Département de Néphrologie, Hôpital Necker, Paris, France,

²Endocrine Unit, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, U.S.A.

Abstract:

Resistance to the action of PTH has been well characterized in the setting of chronic renal failure. Most evidence points to post-receptor abnormalities in its pathogenesis. The recent cloning of the PTH/PTHrP receptor (PTH-R) has permitted us to examine whether in a 5/6 nephrectomy rat model (CRF) the expression of the PTH-R gene is modified. First, we have found that the renal PTH-R mRNA expression is markedly decreased in CRF compared to normal rats. Diminished PTH-R transcripts were associated with a lower PTH-induced cAMP production in renal membranes in CRF suggesting a decrease in the PTH-R number or post-receptor modifications. Second, thyroparathyroidectomized (TPTX) rats with normal renal function had no change in the renal PTH-R expression whereas TPTX-CRF rats still showed a decreased renal PTH-R mRNA expression suggesting that high plasma PTH levels were not etiologically important in the observed down-regulation. Despite the renal PTH-R down-regulation, CRF rats had a normal renal handling of calcium. They also had a higher phosphate excretion than control rats. TPTX-CRF rats showed a decrease in renal tubular calcium reabsorption and a phosphate retention when compared with CRF animals with intact parathyroid glands. This suggests that a few available PTH-R in the kidney allow PTH to exert, to a certain extent, its physiological role in this experimental model of uremia. In conclusion, these findings indicate a down-regulation of the renal PTH-R expression in CRF which appears to be independent of parathyroid gland function. The relevance of this phenomenon in the setting of the secondary hyperparathyroidism of uremia remains to be elucidated.

Key words: PTH/PTHrP receptor, uremia, secondary hyperparathyroidism, PTH/PTHrP receptor mRNA expression

The kidney plays a crucial role in maintaining mineral ion and bone homeostasis. The distal parts of the nephron, namely the thick ascending limb of Henle's loop, distal convoluted, and connecting tubules are

the main regulatory sites for the final excretion of calcium, phosphate, and magnesium in the urine. These nephron segments have receptors for several calciotropic hormones such as parathyroid hormone

Address for correspondence: Pablo Ureña, M.D., INSERM Unité 90, Hôpital Necker, 161 rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France

(PTH), calcitonin, and calcitriol. Regarding PTH, the interaction with its tubular receptor(s) results in three major biological effects: an increased tubular calcium reabsorption, an increased renal phosphate excretion, and a stimulation of calcitriol synthesis [1-3].

The cDNA for the rat PTH/PTHrP receptor (PTH-R) has recently been cloned from a rat osteosarcoma cell line (ROS 17/2.8) [4]. This receptor is a member of a new receptor subfamily within the G-protein-linked superfamily together with those for secretin, calcitonin, vasoactive intestinal peptide, glucagon-like peptide-1, growth hormone releasing-peptide, pituitary adenylate cyclase activating peptide, and gastric inhibitory polypeptide [4-8]. All these receptors possess seven putative transmembrane domains and most of them are capable of activating several second messengers, including cAMP, calcium, and inositol trisphosphates. The PTH-R gene is predominantly expressed as a 2.5 kb transcript in the two classical PTH-target organs, kidney and bone [4,9].

In advanced renal failure, in addition to a decrease in intestinal calcium absorption, renal phosphate excretion, and renal calcitriol synthesis, there is a blunted calcemic response to PTH which is probably due to PTH-R down-regulation in bone cells [10]. It has been suggested that these four factors are important in the occurrence of low calcium and calcitriol plasma levels and the subsequent development of secondary hyperparathyroidism.

In recent studies, we have investigated the question of whether the resistance to PTH in the uremic state could also involve a down-regulation of the PTH-R in the kidney, and if so, which might be the factors implicated in such a down-regulation. In a first of two experiments, we found a decrease of the level of the steady-state PTH-R mRNA in the kidney of uremic rats (5/6 nephrectomy) and a diminished PTH-sensitive adenylate cyclase activity [11]. Moreover, the receptor down-regulation in this experimental model was associated with the classical plasma biochemical abnormalities including low calcium and calcitriol, and high phosphate and PTH. The high plasma phosphate concentration was mostly induced by a high phosphate diet (1.2%).

We then asked whether the PTH-R down-regulation could be due to an excess of plasma PTH and whether it could be important in the pathophysiology of hypocalcemia in chronic renal failure. In a second set of experiments, in which animals had a normal phosphate diet (0.9%), we have compared the level of PTH-R mRNA in the kidney of uremic rats having intact parathyroid glands with that of thyroparathyroidectomized uremic rats. We have also assessed its functional status *in vitro* by the determination of PTH-

stimulated cAMP production in crude renal membrane preparations, and *in vivo* by the evaluation of the amount of calcium, phosphate and magnesium excreted in the urine.

We found that blood ionised calcium was significantly lower in thyroparathyroidectomized (TPTX), uremic (CRF), and CRF + TPTX rats than in control animals. Despite a moderate degree of renal insufficiency (creatinine clearance of 250 μ l/min/100 g body weight), plasma phosphorus was lower in CRF and CRF + TPTX rats than in control rats. TPTX animals had highest plasma phosphorus levels. There was no significant difference in total plasma magnesium between the four groups. Plasma (1-34) PTH levels, measured with a specific rat PTH antiserum were significantly higher in CRF (40 pg/ml) than in control rats (20 pg/ml) and significantly lower in TPTX (10 pg/ml) and CRF + TPTX rats (10 pg/ml). Mean plasma calcitriol concentration was three to four times lower in CRF, TPTX, and CRF + TPTX than in control rats.

Twenty-four hr urine volume was two to three times higher in CRF and CRF + TPTX, than in control and TPTX animals, respectively. Fractional urinary excretion of calcium and magnesium were higher in CRF rats than in control rats. They were further increased by thyroparathyroidectomy, five-fold for calcium and two-fold for magnesium. Fractional urinary excretion of phosphate was significantly higher in CRF rats than in control, TPTX, and CRF + TPTX rats.

Basal adenylate cyclase activity was slightly reduced in crude renal membranes from uremic rats as compared with control and TPTX rats. After stimulation by PTH the amount of cAMP produced was reduced by 60 % in uremic rats compared with control rats.

The level of the steady-state PTH-R mRNA in kidney of CRF as well as of CRF + TPTX rats was decreased to approximately 50 % of that of control rats. The level of PTH-R mRNA expression tended to correlate inversely with plasma creatinine concentration, but not with that of plasma iPTH. However, the small number of animals did not allow to reach the level of statistical significance for the relation with plasma creatinine. TPTX rats with intact renal function had no change in the level of renal PTH-R mRNA. There was no significant difference in the renal β -actin gene expression between control and CRF animals.

Our recent studies demonstrate for the first time that the PTH-R mRNA and the PTH-stimulated adenylate cyclase activity are down-regulated in the kidney of uremic rats. The findings of our first study [11] are in agreement with previous observations, demonstrating that a prolonged exposure of cells, tissues or organs to PTH could lead to a subsequent impaired response to that hormone. Such a phenomenon, known as desensitization, has been described for PTH

in many experimental models, including cultured renal cells, bone tumor cells [12-14], vitamin D-deficient humans and animals [15], aged animals [16], and dietary-induced hyperparathyroidism [17]. Moreover, the down-regulation of the renal PTH-R mRNA found in uremic animals extends previous reports in which it had been postulated that most of the desensitization to PTH was due to the loss of receptors on PTH-target cells [18].

Several mechanisms could theoretically be responsible for the renal PTH-R mRNA down-regulation including high plasma PTH levels, low plasma calcitriol concentration, hyperphosphatemia, hypocalcemia, and/or other local or circulating uremic factors.

PTH has been demonstrated to transiently decrease the PTH-R mRNA expression in cultured osteoblast-like cells (ROS 17/2.8) [12]. However, our finding that parathyroidectomy did not prevent the receptor down-regulation in uremic rats suggests that chronically elevated circulating PTH concentrations were not required for the reduced renal PTH-R mRNA level in uremic rats.

It is also unlikely that plasma phosphate concentration plays a major role in the receptor down-regulation. The uremic rats of our second study with moderate renal failure had an even lower plasma phosphate level than control rats. Furthermore, high plasma phosphate was not associated with any change of PTH-R mRNA levels in TPTX rats with intact kidneys. This strengthens our hypothesis that hyperphosphatemia has no influence on the renal PTH-R mRNA. Plasma levels of calcium and magnesium were not significantly different between uremic and control rats, suggesting that the plasma concentration of these cations was not directly implicated in the PTH-R down-regulation.

Circulating calcitriol could be an important factor regulating the PTH-R mRNA expression in the kidney. A recent *in vitro* study in mouse renal distal tubular cells has shown that calcitriol up-regulated the PTH-R mRNA [19]. Moreover, it has been demonstrated that the impaired calcemic response to PTH in humans and animals could be reversed by the administration of calcitriol [20]. Whether the decrease in plasma calcitriol concentration in uremic animals is responsible of the renal PTH-R mRNA down-regulation and whether its correction by exogenous calcitriol administration is able to correct or prevent its down-regulation remains to be clarified.

A change of the activity of local factors secondary to ischemia, inflammation or the induction of compensatory renal hypertrophy could also be involved in the renal receptor down-regulation such as locally produced PTHrP, TNF α , interleukin 1, angiotensin II, and/or other growth factors.

In theory, the downregulation of the renal PTH-R could contribute to the development of the hyperphosphatemia and hypocalcemia observed in CRF by at least two mechanisms. First, this downregulation could directly interfere with the phosphaturic effect of PTH resulting in phosphate retention and indirectly in hypocalcemia, increasing urinary calcium excretion. This hypothesis is however not supported by the results of our second study since we observed that at a relatively moderate degree of renal failure and despite reduction of PTH receptor expression, uremic rats with intact parathyroid glands were normocalcemic and able to save most of the filtered urinary calcium. They also had an increased urinary excretion of phosphate and a tendency to be hypophosphatemic. Second, the renal PTH-R downregulation could lead to a depression of the PTH-stimulated synthesis of 1,25 (OH) $_2$ D $_3$ by the kidney, a subsequent decrease in intestinal calcium absorption and ultimately hypocalcemia. As mentioned before, the potential role of calcitriol in the regulation of the PTH-R expression remains yet to be determined.

Our most recent study also suggests that despite a reduced renal PTH-R mRNA and PTH-stimulated adenylate cyclase activity, the kidney of moderately uremic rats is still capable of responding to high PTH concentrations in a compensatory manner. Uremic rats with intact parathyroid glands and secondary hyperparathyroidism had lower urinary calcium and magnesium excretion and higher phosphate excretion than thyroparathyroidectomized uremic animals.

In conclusion, chronic renal failure in the present experimental rat model is associated with a down-regulation of renal PTH-R mRNA and a decrease in PTH-stimulated adenylate cyclase activity which are not prevented by parathyroidectomy. Neither the observed increase in plasma PTH and phosphate nor the observed decrease in plasma calcium are necessary conditions for the receptor mRNA down-regulation to occur. The relevance of such abnormalities for the pathogenesis of the secondary hyperparathyroidism of long-standing renal failure is probable but their precise place has still to be defined.

References

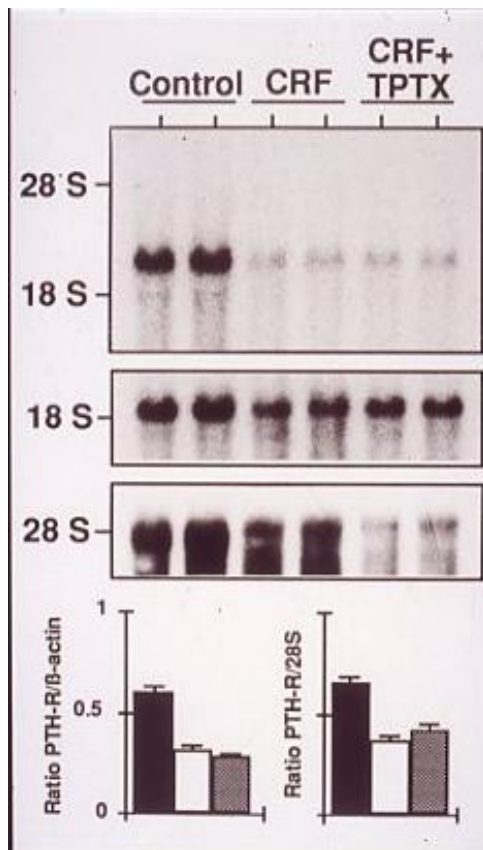
1. Morel F: Sites of hormone action in the mammalian nephron. *Am J Physiol* 240: F159-F164, 1981
2. Kurokawa K: Calcium-regulating hormones and the kidney. *Kidney Int* 32: 760-771, 1987
3. Kurokawa K: The kidney and calcium homeostasis. *Kidney Int* 45: Suppl. 44: S97-S105, 1994
4. Abou-Samra AB, Jüppner H, Force T et al.: Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single recep-

- tor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2732-2736, 1992
5. Jüppner H, Abou-Samra AB, Freeman M et al.: A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* 254: 1024-1027, 1991
 6. Ishihara T, Nakamura S, Kaziro Y et al.: Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the secretin receptor. *EMBO J* 10: 1635-1641, 1991
 7. Goldring SR, Gorn AH, Yamin M et al.: Characterization of the structural and functional properties of cloned calcitonin receptor cDNAs. *Horm Metab Res* 25: 477-480, 1993
 8. Mayo KE: Molecular cloning and expression of a pituitary-specific receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol Endocrinol* 6: 1734-1744, 1992
 9. Ureña P, Kong XF, Abou-Samra AB et al.: Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide (PTHrP) receptor mRNA are widely distributed in rat tissues. *Endocrinology* 133: 617-623, 1993
 10. Massry SG, Coburn JW, Lee DEN et al.: Skeletal resistance to parathyroid hormone in renal failure: studies of 105 human subjects. *Ann Intern Med* 78: 357-364, 1973
 11. Ureña P, Kubrusly M, Mannstadt M et al.: The renal PTH/PTHrP-receptor is down-regulated in rats with chronic renal failure. *Kidney Int* 45: 605-611, 1994
 12. Ureña P, Iida-Klein A, Kong XF et al.: Regulation of the PTH/PTHrP receptor mRNA by glucocorticoids and PTH in ROS 17/2.8 and OK cells. *Endocrinology* 134: 451-456, 1994
 13. Jüppner H, Abou-Samra AB, Uneno S et al.: The parathyroid hormone-like peptide associated with humoral hypercalcemia of malignancy and parathyroid hormone bind to the same receptor on the plasma membrane of ROS 17/2.8 cells. *J Biol Chem* 263: 8557-8560, 1988
 14. Mitchell J, Goldzman D: Mechanisms of homologous and heterologous regulation of parathyroid hormone receptors in the rat osteosarcoma cell line UMR-106. *Endocrinology* 126: 2650-2660, 1990
 15. Mitchell J, Tenenhouse A, Warner M et al.: Parathyroid hormone desensitization in renal membranes of vitamin D-deficient rats is associated with a postreceptor defect. *Endocrinology* 122: 1834-1841, 1988
 16. Hanai H, Brennan DP, Cheng L et al.: Downregulation of parathyroid hormone receptors in renal membrane from aged rats. *Am J Physiol* 259: F444-450, 1990
 17. Tamayo J, Bellorin-Font E, Martin KJ: Effect of dietary-induced hyperparathyroidism on the parathyroid hormone-receptor-adenylate cyclase system of canine kidney. *J Clin Invest* 72: 422-432, 1983
 18. Yamamoto I, Shigeno C, Potts JT et al.: Characterization and agonist-induced down-regulation of parathyroid hormone receptors in clonal rat osteosarcoma cells. *Endocrinology* 122: 1208-1217, 1988
 19. Sneddon WB, Gesek FA, Friedman PA: 1,25(OH)₂ vitamin D₃ up-regulates the expression of the parathyroid hormone receptor in distal convoluted tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 4: 729, 1993
 20. Massry SG, Tuma S, Dua A et al.: Reversal of skeletal resistance to parathyroid hormone in uremia by vitamin D metabolites. Evidence for requirement of 1,25(OH)₂D₃. *J Lab Clin Med* 94: 152-157, 1979

Posteriormente, avaliámos ainda o efeito da tiro-paratireoidectomia (TPTX) na expressão renal do recetor da PTH/PTHrP, em ratos com função renal normal, ou com insuficiência renal crónica induzida por nefrectomia de 5/6.

Mediante a realização de tiro-paratireoidectomia e/ou nefrectomia de 5/6, criámos 4 grupos de animais: 1) ratos com função renal normal (grupo controlo, sujeitos apenas a cirurgias de simulação); 2) grupo sujeito a nefrectomia de 5/6 (IRC); 3) grupo sujeito a tiro-paratireoidectomia (TPTX); e 4) grupo sujeito a tiro-paratireoidectomia e nefrectomia de 5/6 (TPTX+IRC).

Neste estudo, confirmámos, pela técnica de *Northern Blot*, a diminuição da expressão do ARNm do recetor da PTH/PTHrP e a redução da atividade da adenilciclase sensível à PTH, (nas membranas das células renais), nos grupos de animais com insuficiência renal: IRC e TPTX+IRC, como é claramente demonstrado na figura seguinte:



Pelo contrário, os animais sujeitos apenas a tiro-paratireoidectomia, mas sem insuficiência renal (grupo TPTX), não apresentavam estas alterações (148).

Desta investigação, concluímos que a tiro-paratireoidectomia não evita a diminuição da expressão do ARNm do recetor da PTH/PTHrP ao nível do rim, num modelo animal de insuficiência renal crónica, e que esta diminuição da expressão do recetor também não parece ser induzida pelos níveis séricos elevados de PTH.

Mostrámos ainda que, apesar da diminuição da expressão do ARNm do recetor da PTH/PTHrP, e da redução da resposta à PTH da adenilciclase nas células renais dos animais com I.R.C., a PTH é ainda capaz de controlar o metabolismo iónico renal, através do recetor restante no tecido renal residual (148).

Em resumo, nos dois manuscritos acima apresentados, demonstrámos a diminuição da expressão do recetor da PTH/PTHrP no tecido renal, num modelo animal de insuficiência renal crónica.

Esta diminuição, não é induzida pelos níveis elevados de PTH nem de fósforo, e não é influenciada pela tiro-paratiroidectomia.

Provavelmente outros fatores modulam a expressão deste recetor, na urémia, justificando-se a avaliação, por exemplo, dos eventuais efeitos da vitamina D e do FGF-23 (149; 45; 66).

Esta é uma linha de investigação que nos parece particularmente promissora, tendo em conta que a redução da Klotho e o aumento do FGF-23 circulante precedem a elevação dos níveis séricos de PTH, no doente urémico (150; 19).

Bover e colaboradores descreveram, igualmente, uma provável resistência esquelética à ação da PTH num modelo animal de IRC, mas apenas baseados nos níveis de calcemia e fosfatemia após infusão de PTH (1-34 a.a.) e sem qualquer avaliação da expressão do recetor da PTH/PTHrP. Neste estudo, os animais sujeitos a dieta mais rica em fósforo ou com maior gravidade de IRC, apresentaram uma menor resposta calcémica à infusão de PTH (1-34 a.a.) (151).

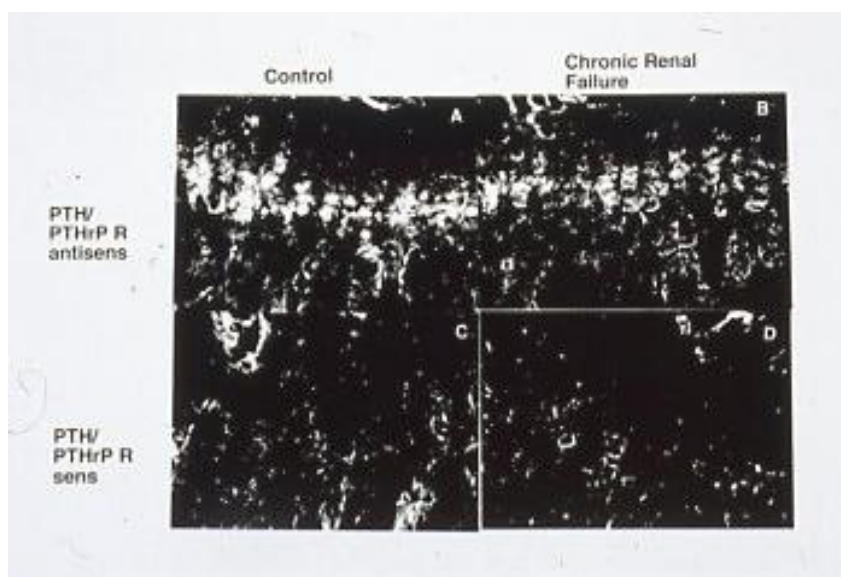
Os condrócitos expressam, igualmente, o recetor da PTH/PTHrP, predominantemente ao nível da cartilagem de crescimento, como tivemos oportunidade de demonstrar nos condrócitos hipertrofiados, nos condrócitos maduros (expressão nitidamente mais acentuada) e nos condrócitos em repouso (152).

Estes nossos resultados foram confirmados, três anos mais tarde, por Ben-Bassat e colaboradores, num modelo aviário de raquitismo (153).

Na nossa investigação, utilizámos um modelo animal de IRC (ratos Wistar adultos, de 14 a 16 semanas de vida, sujeitos a nefrectomia de 5/6), no qual tivemos a oportunidade de demonstrar a diminuição da expressão do ARNm do recetor da PTH/PTHrP, por técnica de *hibridização in situ*, na cartilagem de crescimento do fémur e da tíbia.

Na figura seguinte é clara a diminuição da expressão do ARNm do recetor da PTH/PTHrP na tíbia dum animal com IRC (apresentada no quadrante superior direito)

em comparação com o animal sem IRC (controlo) apresentado no quadrante superior esquerdo. Os quadrantes inferiores representam os controlos negativos (“sense”) da técnica de *hibridização in situ*.

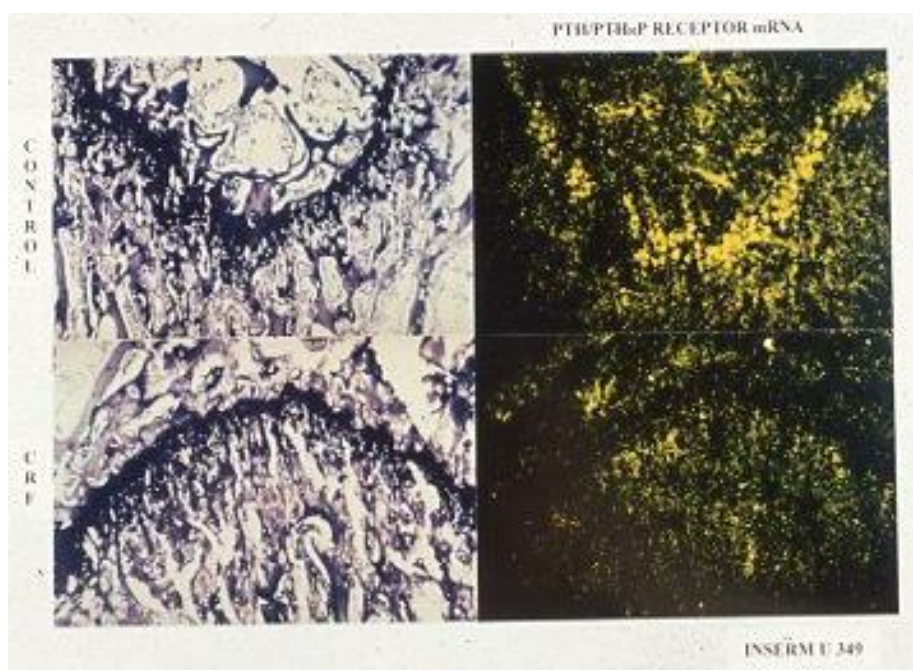


Esta diminuição da expressão do recetor, que foi por nós quantificada, acompanhou-se da redução da espessura da cartilagem de crescimento e de um menor número de condrócitos maduros, ao nível da camada intermédia da cartilagem de crescimento. Estes resultados são claramente demonstrados na figura seguinte, na qual se compara a cartilagem de crescimento de um animal controlo, sem IRC, apresentada à esquerda (coloração pelo azul de toluidina; ampliação de 10 x), com a de um animal do grupo IRC, apresentada à direita.



Como discutimos no manuscrito que publicámos com estes resultados, e evidenciámos na análise de “northern blot” de cada animal, observou-se o mesmo resultado (redução da expressão do RNAm do recetor da PTH/PTHrP) de forma uniforme e semelhante em todos os animais de cada grupo em análise.

Se integrarmos as imagens das cartilagens de crescimento das tíbias do grupo controlo (ambos os quadrantes superiores da figura abaixo) com os do modelo animal de IRC (ambos os quadrantes inferiores) e analisarmos o aspeto da espessura da cartilagem de crescimento corada pelo azul de toluidina (quadrantes da esquerda) com a imagem obtida por hibridização *in situ* (quadrantes da direita), obtemos a seguinte imagem:



Na foto apresentada acima confirma-se a redução da expressão do ARNm do recetor da PTH/PTHrP no modelo animal de rato urémico, a qual surge associada a diminuição da espessura da cartilagem de crescimento.

A redução da espessura da cartilagem de crescimento e, especificamente, a redução do número de condrócitos maduros que expressam o recetor da PTH/PTHrP, poderá justificar, pelo menos em grande parte, o atraso, e mesmo o compromisso do crescimento, observado no quadro urémico.

Este atraso de crescimento compromete o desenvolvimento esquelético e ponderal nas crianças com IRC.

São vários os fatores que podem participar neste quadro de atraso de crescimento, nomeadamente: a deficiente nutrição, a acidose metabólica, a insuficiente absorção intestinal de cálcio, níveis baixos de hormona de crescimento (somatomedina) e deficiência de vitamina D.

Com base nos nossos resultados no modelo animal, a resistência esquelética à ação da PTH, mediada pela redução da expressão do recetor da PTH/PTHrP nos condrócitos maduros (condicionando redução de espessura da placa de crescimento) também será um fator determinante deste atraso de crescimento observada na urémia (152).

Original Article

PTH/PTHrP receptor mRNA is down-regulated in epiphyseal cartilage growth plate of uraemic rats

Pablo Ureña¹, Anibal Ferreira^{1,2}, Caroline Morieux², Tilman Drüeke¹ and Marie Christine de Vernejoul²

¹INSERM Unité 90, Hôpital Necker, Paris and ²INSERM Unité 349, Hôpital Lariboisière, Paris, France

Abstract PTH/PTHrP receptor mRNA is down-regulated in epiphyseal cartilage growth plate of uraemic rats. Growth retardation, hypocalcaemia, hyperphosphataemia, and skeletal resistance to the action of PTH are well known features of advanced chronic renal failure (CRF). It has been suggested that the downregulation of renal and skeletal PTH receptors (PTH/PTHrP-R) could play an important role in the occurrence of these abnormalities. In the present study, four uraemic (4 weeks after 5/6 nephrectomy) and four control (sham-operated) rats were analysed for PTH/PTHrP-R mRNA expression at the proximal femoral and tibial growth plates by *in situ* hybridization. Uraemic rats had plasma biochemical abnormalities of advanced CRF including high creatinine, phosphate, and PTH, and low calcium and calcitriol levels. The femoral and tibial bones of uraemic animals were shorter in length than those of control rats, and had reduced width and cellularity of the epiphyseal cartilage growth plate. Mean (\pm SD) tibia growth plate width was 152 ± 30 μ m in uraemic rats, compared with 170 ± 35 μ m in control rats. The difference was mostly due to a marked reduction of the zone expressing PTH/PTHrP-R (mature chondrocytes) which was 30 ± 5 μ m in tibias from uraemic versus 44 ± 10 μ m in tibias from control rats. The hybridization signals of PTH/PTHrP-R per individual cell were quantified on dark field images using a computer-assisted image analysis system. The number of grains in PTH/PTHrP-R positive cells was also decreased in uraemic rats, 103 ± 13 compared with 123 ± 14 arbitrary units (dark pixel density)/cell in control rats ($P < 0.005$). In conclusion, these data indicate that rats with severe CRF and secondary hyperparathyroidism have reduced epiphyseal cartilage PTH/PTHrP-R mRNA expression. This alteration may be relevant in the pathogenesis of growth retardation in uraemia.

Key words: PTH receptor; chondrocyte; hypocalcaemia; hyperphosphataemia; secondary hyperparathyroidism; growth retardation

Introduction

Parathyroid hormone (PTH) regulates plasma calcium and phosphate concentrations through its action on bone and renal cells [1,2]. In the kidney, PTH increases calcium reabsorption, stimulates phosphate excretion, and activates the synthesis of calcitriol. In bone, PTH produces a spectrum of effects which are time and dose dependent. These include catabolic effects by stimulating the release of calcium and phosphate through an increase of osteoclast-mediated bone resorption [2,3]; anabolic effects by stimulating the proliferation and differentiation of osteoblast and chondrocyte cells, thereby leading to new bone formation, especially when administered intermittently [4,5]; and an antianabolic effect by inhibiting collagen synthesis [6].

PTH exerts these actions after binding to a specific high-affinity G protein-coupled receptor located on bone and renal cells. The same receptor also serves for PTH-related peptide (PTHrP), the molecule responsible for most of the humoral hypercalcaemias of malignancies [7–9]. Its activation by either ligand results in the stimulation of several intracellular second messengers, including cAMP, calcium, and inositol trisphosphates [7,8] which in turn activate the cascade of protein kinases involved in the biological actions of PTH and PTHrP. The magnitude of the kidney and bone responses to these peptides depends on the number of receptors available at the cell surface. This number is known to be subject to a constant adjustment in response to changes in the cellular and hormonal environments [9].

With the progressive loss of renal function in kidney diseases, PTH actions as well as mineral ion and bone homeostasis become progressively disturbed. For instance, growth retardation, hypocalcaemia, hyperphosphataemia, and skeletal resistance to the action of PTH, are well known features of advanced chronic

Correspondence and offprint requests to: Marie Christine de Vernejoul MD, INSERM Unité 349, Biologie Cellulaire et Moléculaire de l'Os et du Cartilage, Centre Viggo Petersen, Hôpital Lariboisière, 6 rue Guy Patin, 75010, Paris, France.

renal failure (CRF) [10–14]. We have recently suggested that down-regulation of the PTH/PTHrP-R in kidney and in femoral bone of uraemic rats [15,16] could be implicated in the pathophysiology of these abnormalities.

Growth retardation in uraemia is now recognized as a multifactorial disorder. It is thought to be due to a perturbation of the secretion of various growth factors, to the altered binding of growth factors to plasma binding proteins, and/or a resistance to their action at the level of skeletal target cells [10,17–19]. It is interesting to note that the administration of pharmacological doses of recombinant human growth hormone (rhGH) in uraemic children significantly improved longitudinal growth but failed to completely normalize it [18–20]. Moreover, growing children with severe secondary hyperparathyroidism are those who will have the shortest stature and will be the less responsive to rhGH therapy suggesting an inhibitory effect of secondary hyperparathyroidism on bone growth [20].

The present study was designed to investigate whether the growth retardation observed in uraemic rats might have any relation with secondary hyperparathyroidism and in particular with the level of expression of the PTH/PTHrP-R mRNA in the epiphyseal cartilage of long bones. The expression of the receptor mRNA was analysed by a quantitative *in situ* hybridization technique. In addition, a comparison of radiographic and several histomorphometric data was performed between control and uraemic rats.

Methods

Animals

Male 12–14 week-old Wistar AF rats (IFFA CREDO, Lyon, France) weighing 250 to 300 g were fed ad libitum with a phosphate-rich diet containing 1.2% P, 0.6% Ca, 16% casein, and 2000 IU/kg vitamin D₃ in order to create severe secondary hyperparathyroidism. Animals were allowed free access to food and deionized water.

Creation of chronic renal failure

Chronic renal failure was created in 19 rats by a standard two-step operation [21]. Animals were anaesthetized by pentobarbital given *i.p.* During the first surgery, two-thirds of the left kidney was removed by cutting off both poles after decapsulation, and complete haemostasis was obtained by electrocoagulation. Seven days later, total right nephrectomy was performed. Twenty-three rats of same gender and age, fed with normal diet, underwent sham operation and were considered as the control group. Four representative animals were taken from each group of rats for analysis of cartilage growth plate PTH/PTHrP-R expression.

Blood biochemistry

Four weeks after surgery, animals were anaesthetized by injection of pentobarbital *i.p.*, and before sacrifice a blood sample was obtained by aortic puncture. The blood was

centrifuged at 3000 g for 20 min and the plasma recovered and stored at –50°C until assays were performed. Plasma total calcium, phosphorus, protein, urea, and creatinine were determined by standard laboratory methods performed on a multiparametric analyser (Hitachi 717 analyser, Boehringer Mannheim, Germany). Plasma immunoreactive parathyroid hormone (iPTH) was measured with a rat PTH (IRMA) kit (Immutopics, Inc., CA, USA) [22] recognizing the N-terminal region of the hormone. Mean plasma iPTH (\pm SEM) measured in 12 normal rats was 43.8 ± 21.6 pg/ml, the lowest and the highest values were 15 and 88 pg/ml, respectively [12]. Plasma calcitriol was measured by radioreceptor assay (Nichols Institute, San Juan Capistrano, CA, USA) using calf thymus receptor according to the method of Hollis [23].

Tibial and femoral radiography

Standard X-ray radiography was taken of removed tibiae and femurs from control and uraemic rats.

Tissue preparation

Following anaesthesia and blood sampling, a partial exanguination was obtained by aortic puncture. Then the aorta was catheterized, the left femoral vein sectioned, and each animal perfused with 20 ml of freshly prepared sterile 1 × phosphate buffer saline (PBS), and 20 ml of 4% paraformaldehyde (PFA)-PBS (pH 7.4). Tibias and femurs were removed from both control and CRF rats, fixed in 4% PFA-5% sucrose/PBS for 24 h at 4°C, and decalcified by incubation in a solution containing 20% EDTA-4% PFA, 2 weeks at 4°C. After several washes with 5% sucrose/PBS, samples were kept in 5% sucrose/PBS at 4°C. Immediately before sectioning, tissues were dipped into 30% sucrose/PBS until they sank, preincubated with OCT compound (Tissue-Tek, Miles Laboratories, Elkhardt, IN, USA), and then frozen with liquid nitrogen. Frozen section (5 μ m) were prepared by standard histological procedures using a Frigocut 2700 microtome/cryostat (Leica, Germany). Sections were mounted on glass slides precoated with VectaBond (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

In situ hybridization

In situ hybridization was performed as previously described in tibiae and femurs of both groups, normal and CRF rats [24]. In brief, sections were postfixed with freshly prepared 4% PFA-PBS for 15 min. After washing with PBS, they were digested with 2 μ g/ml of proteinase K in PBS for 15 min at 37°C and the digestion was inactivated by reincubating the sections in 4% PFA-PBS for 10 min, sequentially washing with PBS, and 10 min incubation in 0.2 N HCl. Sections were again washed with PBS, acetylated with 0.25% acetic anhydride in the presence of 0.1 M triethanolamine (pH 8.0) for 10 min, dehydrated with increasing concentrations of ethanol, and air dried.

Hybridizations were performed in a humidified chamber in a solution containing 50% formamide, 10% dextran sulfate, 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA (pH 8.0), 1 × Denhardt's solution, 600 mM NaCl, 10 mM dithiothreitol, 0.25% sodium dodecyl sulfate, 200 μ g/ml yeast transfer RNA, and 1 × 10⁶ cpm of the corresponding radiolabeled rat PTH/PTHrP-R riboprobe for 18 h at 55°C. Sense and antisense ³⁵S-labeled rat PTH/PTHrP-R RNAs were synthe-

sized from linearized plasmids containing the PTH/PTHrP-R insert. The insert was a 1.8 kb, *Bam*HI–*Nor*I fragment of the rat PTH/PTHrP-R cDNA subcloned in the pcDNA 1 plasmid, GenBank accession number M77184 [8]. The synthesis of riboprobes was performed using the Gemini Transcription Kit (Promega, Madison, WI) and ³⁵S-UTP was purchased from Amersham (Arlington Heights, IL, USA). After hybridization, sections were sequentially washed briefly with 5 × SSC at 50°C, 50% formamide + 2 × SSC at 50°C, and 10 mM Tris–HCl (pH 7.6) + 500 mM NaCl + 1 mM EDTA (TNE) at 37°C, and treated with 10 µg/ml RNase A in TNE (37°C for 30 min). After the wash with TNE, sections were incubated once with 2 × SSC (50°C for 20 min) and twice with 0.2 × SSC (50°C for 20 min), dehydrated with increasing concentrations of ethanol, and air dried. The slides were exposed to X-ray films (Hyperfilm β-max, Amersham, Arlington Heights, IL, USA), and autoradiographs obtained after 2–5 days exposure. For emulsion autoradiographs, the slides were dipped into NTB-2 (Eastman Kodak, New Haven, CT, USA) and stored at 4°C for the time estimated from the intensity of the hybridization signal on the X-ray film. After development, sections were counterstained with a diluted solution of toluidine blue (1 ml of 1% toluidine blue, pH 2.8, in 200 ml of distilled H₂O) for 5 min and then mounted.

Measurement of the growth plate

The total width of the proximal tibia and femur growth plates and of each cartilage zone were measured on toluidine blue counterstained slides using a semi-automatic image analyzer (Biocom, Les Ulis, France) coupled with a light microscope. The cartilage growth plate was arbitrarily divided into three zones: zone 2 corresponding to chondrocytes expressing the higher number of black grains or PTH/PTHrP-R mRNA (maturing chondrocytes), zone 1 from the epiphysis to zone 2 (resting and proliferating chondrocytes), and zone 3 from zone 2 to endochondral bone (hypertrophic chondrocytes) [25] (Fig. 3).

Quantitation of the *in situ* hybridization signal per cell

Dark field emulsion images magnified 100-fold were used for the quantitation of the intensity of PTH/PTHrP-R mRNA hybridization signal and using a previously computer-assisted validated method [25]. Thirty to 80 chondrocytes from each of the three cartilage zones described above in each of the four animals of both groups and in three independent experiments were analysed. Five tibia cartilage growth plates (from three control and two uraemic rats) hybridized with the ³⁵S-labeled PTH/PTHrP receptor sense riboprobe were used as negative control or background.

The images were recorded as their light field equivalent using a charge-coupled device videocamera (Hamamatsu C2400), which allows conversion, and a computer (MacIntosh Ix) equipped with Optilab software (Graphtek). All slides hybridized on the same day and with the same probe were recorded under identical microscope lighting and camera settings. Each recorded slide was given a coded number to allow unbiased blind analysis and stored on 44-megabyte disk cartridges. After recall, the hybridization signals appeared on the monitor as black grains, which sometimes looked confluent in PTH/PTHrP-R mRNA-rich areas. Since the ³⁵S-sensitized emulsion generated very homogeneous grains with surfaces of 2–5 pixels, the computer was

instructed to count only perfectly black pixels (level 0 on a black-to-white scale of 0–256). Values are referred to as 'dark pixel density' (dpd) and expressed in arbitrary units (AU). Reproducibility of the method was assessed by analyses of selected slides performed by at least two operators who obtained remarkably similar AU values.

Statistical analysis

Results have been expressed as mean ± SD and statistical significance determined by the unpaired Student's *t*-test or ANOVA test, as appropriate. *P* values < 0.05 were considered significant.

Results

Plasma biochemistry

Table 1 shows the biochemical results obtained at the moment of sacrifice. Uraemic rats had greater (mean ± SD) plasma creatinine than control rats, 278 ± 147 vs 46 ± 3 µM, respectively. They also had greater plasma phosphorus and iPTH, 5.61 ± 1.44 vs 2.96 ± 0.32 mM, and 633 ± 254 vs 31 ± 8 pg/ml, respectively. Plasma total calcium and calcitriol were significantly lower in uraemic than in control rats, 2.24 ± 0.24 vs 2.65 ± 0.02 mM, and 23.5 ± 12.4 vs 78.3 ± 9.9 pg/ml, respectively. Plasma total alkaline phosphatases were significantly lower in uraemic animals than in control: 96 ± 10 vs 208 ± 14 IU/l. For the same age, CRF rats had significantly lower body weight than control rats, 311 ± 25 vs 409 ± 9 g, respectively.

Tibial and femoral radiography and autoradiography

Figure 1 shows a standard X-ray radiography of tibias and femurs of control and uraemic rats. Uraemic rats had significantly shorter tibias and femurs than control rats, 37.5 ± 0.04 vs 40.6 ± 0.04 mm (*P* < 0.0001), and 35.0 ± 0.05 vs 36.8 ± 0.06 mm, respectively. Figure 2 depicts an illustrative autoradiographic film of PTH/PTHrP-R mRNA expression in the tibia of a control and a CRF rat. It suggests that the level of expression

Table 1. Biochemical parameters obtained at the moment of sacrifice

	Control (<i>n</i> = 4)	Chronic renal failure (<i>n</i> = 4)
Weight	409 ± 9	311 ± 25*
Plasma creatinine (µM)	46 ± 3	278 ± 147*
Plasma urea (mM)	6.8 ± 0.2	34.3 ± 16.6*
Plasma total protein (g/l)	56 ± 2	50 ± 7 ^b
Plasma total calcium (mM)	2.65 ± 0.02	2.24 ± 0.24*
Plasma phosphorus (mM)	2.96 ± 0.32	5.61 ± 1.44*
Plasma total alkaline phosphatases (IU/l)	208 ± 14	96 ± 10*
Plasma iPTH (pg/ml)	31 ± 8	633 ± 254*
Plasma calcitriol (pg/ml)	78.3 ± 9.9	23.5 ± 12.4*

**P* < 0.001; ^b*P* < 0.05; iPTH, rat immunoreactive parathyroid hormone. Results are expressed as mean ± SD.

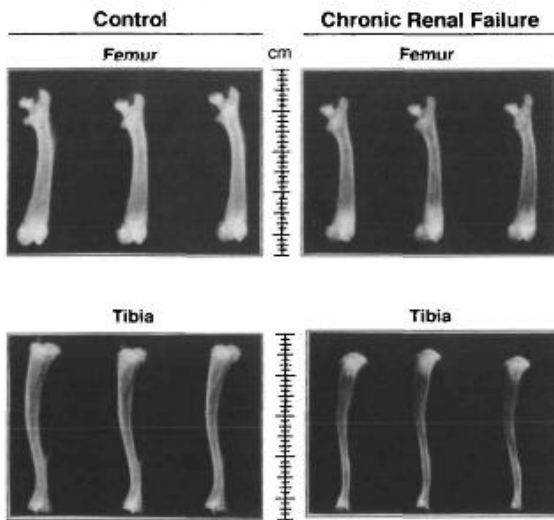


Fig. 1. Standard X-ray film radiography of the femur and the tibia of three sham-operated (control) rats and three uraemic rats (chronic renal failure).

was reduced in the tibial growth plate of the uraemic rat. The quantitative analysis described below confirmed the lower expression of the PTH/PTHrP-R mRNA in uraemic animals.

Measurement of the growth plate

In situ hybridization slides counterstained with toluidine blue showed that the PTH/PTHrP-R mRNA was expressed, as recently described [25], in mature chondrocytes on the tibial growth plate. Figure 3 shows the arbitrary division of the proximal tibial cartilage growth plate according to previous reports and based on the expression of the PTH/PTHrP-R mRNA. The

total length of the whole tibia cartilage growth plate was significantly shorter in uraemic than in control rats, 152 ± 30 vs $170 \pm 35 \mu\text{m}$ ($P < 0.0001$), respectively (Figs 3 and 4). This diminution was mostly (80–90%) due a decrease in the length of zone 2 where the expression of the signal for PTH/PTHrP-R mRNA was high (maturing chondrocytes). There was no significant difference in the length of zone 1 (resting and proliferating chondrocytes), and zone 3 (hypertrophic chondrocytes) between the two groups (Fig. 4).

Quantitation of the in situ hybridization signal per cell

Quantitative analysis of the PTH/PTHrP-R mRNA expression per cell on dark field images was also performed in the three different zones of the cartilage growth plate (Fig. 5). It can be noted that the number of grains in resting and proliferating (zone 1), and in hypertrophic chondrocytes (zone 3) was not different than the number of grains in the chondrocyte cells of the sections hybridized with the sense riboprobe (Fig. 6). This suggests the absence of a significant PTH/PTHrP-R expression in these cells, at least using *in situ* hybridization. The results showed that the number of grains/cell was significantly decreased in mature chondrocytes of uraemic rats compared with control rats, 103 ± 13 vs 123 ± 14 AU (dark pixel density), respectively, $P < 0.0001$ (Figs 5 and 6).

Discussion

The present study demonstrates first, that the length of long bones and the thickness of proximal cartilage growth plates were reduced in uraemic rats. Eighty to ninety per cent of the reduction in the cartilage growth plate was due to a decrease in the height of mature chondrocyte columns expressing the PTH/PTHrP-R mRNA. It demonstrates second, that the PTH/PTHrP-R mRNA was down-regulated in mature chon-

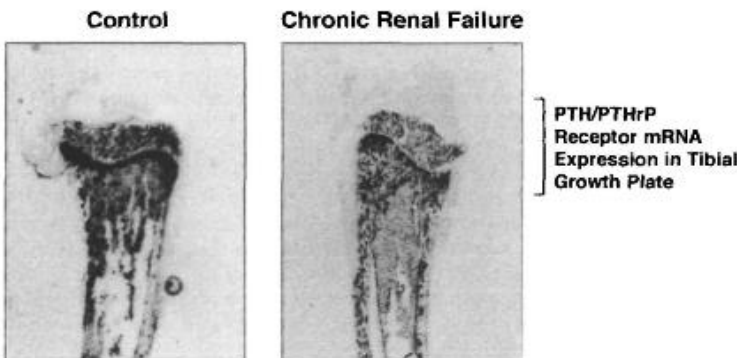


Fig. 2. Illustrative autoradiograph showing the PTH/PTHrP receptor mRNA expression in the tibia growth plate of control (sham operated) and uraemic (chronic renal failure). Frozen decalcified sections of both tibias were hybridized with ^{35}S -labeled rat PTH/PTHrP receptor antisense riboprobe. The signals were detected by X-ray film autoradiography after exposure at room temperature without intensifying screen for 5 days.

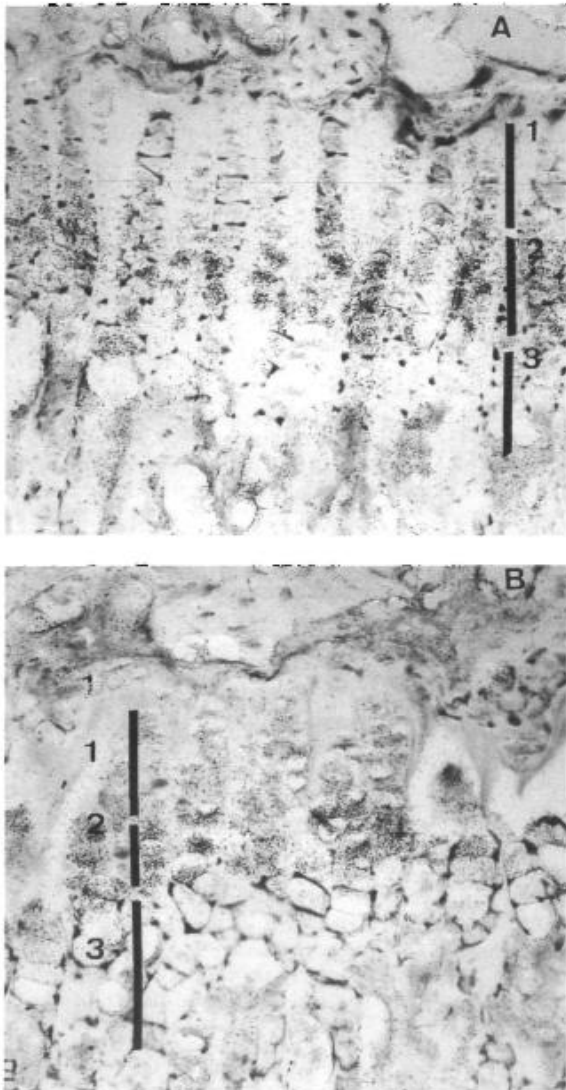


Fig. 3. Light microscopy of the tibia growth plate of a control rat (A), and a uraemic rat (B) (magnification, $\times 100$). Frozen decalcified sections of both tibias were hybridized with ^{35}S -labeled rat PTH/PTHrP receptor antisense. The signals were detected by emulsion autoradiography and the sections counterstained with toluidine blue. The tibial cartilage growth plate was arbitrarily divided in three zones: zone 2 corresponding to chondrocytes expressing the higher number of black grains (maturing chondrocytes), zone 1 from the epiphyseal cartilage to zone 2 (resting and proliferating chondrocytes), and zone 3 from zone 2 to endochondral bone (hypertrophic chondrocytes).

drocyte cells of the proximal epiphyseal growth plate of tibia and femur of uraemic rats.

Both phenomena, the decrease in the number of mature chondrocytes expressing the PTH/PTHrP-R mRNA and the number of PTH/PTHrP-R mRNA per

cell, were responsible for the overall PTH/PTHrP-R mRNA downregulation in the cartilage growth plate. Based on the histomorphometric hybridization data, we deduced that there were 20–30% less mature chondrocytes and ~ 15 –20% less PTH/PTHrP-R mRNA per cell (number of grains) in the cartilage growth plate of uraemic rats.

Several hypotheses may be proposed concerning the mechanisms by which PTH/PTHrP-R downregulation in mature chondrocytes as well as in whole bone [16] might lead to bone growth impairment. First, it has been established that PTH and PTHrP regulate the proliferation and differentiation of chondrocytes as well as cartilage mineralization and endochondral bone formation. Amino-terminal fragments of PTH strongly promote proliferation of foetal growth plate chondrocytes [27,28]. Under physiological conditions, in the growth plate the stem cells undergo ~ 40 –50 cell divisions [31,32] to give rise to ~ 30 hypertrophic chondrocytes per column ($\pm 30 \mu\text{m}$ of linear growth). Obviously, a slower division either of stem cells or the non-stem daughter cells will result in growth retardation. In addition, PTH/PTHrP-R as well as PTHrP have been shown to be expressed in a stage-specific fashion and in different types of chondrocytes [25,31]. PTHrP is expressed in hypertrophic chondrocytes whereas PTH/PTHrP-R is expressed in nonproliferating mature chondrocytes suggesting that PTH/PTHrP-R and its ligand form a paracrine system which may play an essential role in the growth and differentiation of cartilage and in endochondral bone formation. This has recently been demonstrated in an elegant murine model in which the PTHrP gene was disrupted by homologous recombination. It was found that the height of resting and proliferating chondrocyte zones was markedly shortened in the PTHrP deficient mice [30,31]. Thus, it is possible to imagine that the downregulation of the PTH/PTHrP-R mRNA in these cells could cause similar alterations that the deficiency or reduction in PTHrP synthesis causes. It could impede the physiological action of PTHrP and reduce growth plate thickness either by decreasing the division rate of proliferating chondrocytes or by stimulating the differentiation of mature chondrocytes.

Second, it is known that GH is the main modulator of bone growth and that this hormone exerts its actions also through systemically and locally stimulated IGF-I production [33]. GH stimulates the differentiation of precursor cells, while IGF-I stimulates the subsequent limited clonal expansion of the differentiating cells [33]. Systemic administration of IGF-I or high endogenous concentrations of IGF-I produce only small effects on skeletal growth which is compatible with the dual effect theory of GH action, and also argues against a major endocrine role for IGF-I in the regulation of skeletal growth. Rather, it appears that locally produced IGF-I is essential for the stimulatory effect of GH on body growth [33–35]. Similarly, the anabolic skeletal effect of PTH is dependent on a complex interaction between PTH and growth factors including the synthesis of IGF-I [2,36]. Thus a decrease in IGF-I

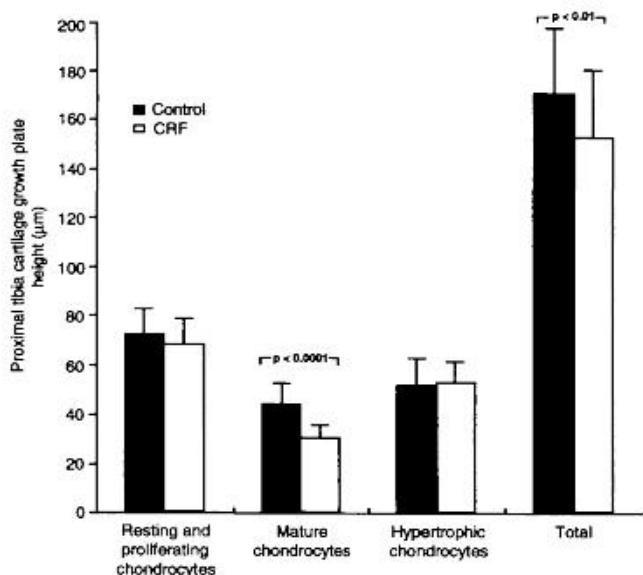


Fig. 4. The length (μm) of the whole tibia cartilage growth plate and the length of each one the three zones, as described in Methods (zone 1: resting and proliferating chondrocytes, zone 2: maturing chondrocytes, and zone 3: hypertrophic chondrocytes), of control and uremic rats are compared. The bars represent the mean \pm SD of 42 and 39 identical cartilage zones measured in four control and four uremic rats, respectively.

production by mature chondrocytes as a consequence of the PTH/PTHrP-R downregulation could also be responsible for the reduced growth plate thickness. Nonetheless, IGF-I appears to play a minor role in normal chondrocyte growth compared to the role of PTHrP. Mutant mice carrying a null mutation of either IGF-I or IGF-I receptor had much less abnormalities in the growth plate and in endochondral bone formation than the mice with ablated PTHrP gene [37,38].

Third, it cannot be excluded in the present study whether malnutrition due to the uremic state could influence the level of expression of PTH/PTHrP receptor mRNA in chondrocyte cells and the skeletal longitudinal growth. Additional experiments with pair-fed animals remain to be performed to clarify this point.

The development of high turnover bone disease in several rat models of moderate and severe chronic renal insufficiency has been well documented. The bones of these animals are thinner, more elastic, and contain less mineral. Histologically, uremic bone presents a substantial increase of resorption, some degree of fibrosis, and impaired bone formation [10,17,39]. In our study, uremic rats had decreased plasma total alkaline phosphatases levels, probably reflecting the chronically impeded bone formation. Hypocalcaemia and hyperphosphataemia were also present in this group of animals. As postulated in previous reports, PTH/PTHrP-R downregulation in skeletal tissues could blunt the skeletal resorptive effect of PTH and contribute to the hypocalcaemia and osteodystrophy of advanced chronic renal failure [12–14]. However,

as we and others have stressed previously, renal PTH/PTHrP-R downregulation [12] and impaired intestinal calcium transport [40] may also contribute to the hypocalcaemia. However, it should be emphasized that the finding of PTH/PTHrP-R downregulation in chondrocytes of the cartilage growth plate does not imply that the receptor is also downregulated in osteoblastic cells lining the trabecular bone surfaces. If this proves to be the case, as we have recently suggested on the basis of results of Northern blot analyses performed on whole bone tissue [16], this would explain the reduced calcaemic response to PTH in renal failure. However, further studies remain to be performed to validate such preliminary findings.

From the data obtained in the present study it is impossible to know whether the PTH/PTHrP-R mRNA downregulation was accompanied by a reduction in receptor protein or receptor function. The expression of receptor mRNA per cell was decreased by ~ 15 – 20% . This does not rule out the possibility that the remaining 80–85% are correctly translated and that the available receptor protein responds efficiently to elevated PTH levels. Accordingly, we have recently demonstrated that in spite of PTH/PTHrP-R downregulation in the kidney of uremic rats, PTH continues to control urinary calcium excretion, at least in cases of mild to moderate degree renal failure [16]. It can also be suggested that the skeletal receptor downregulation may serve as a compensatory mechanism tending to protect skeletal tissue from continually high PTH concentrations.

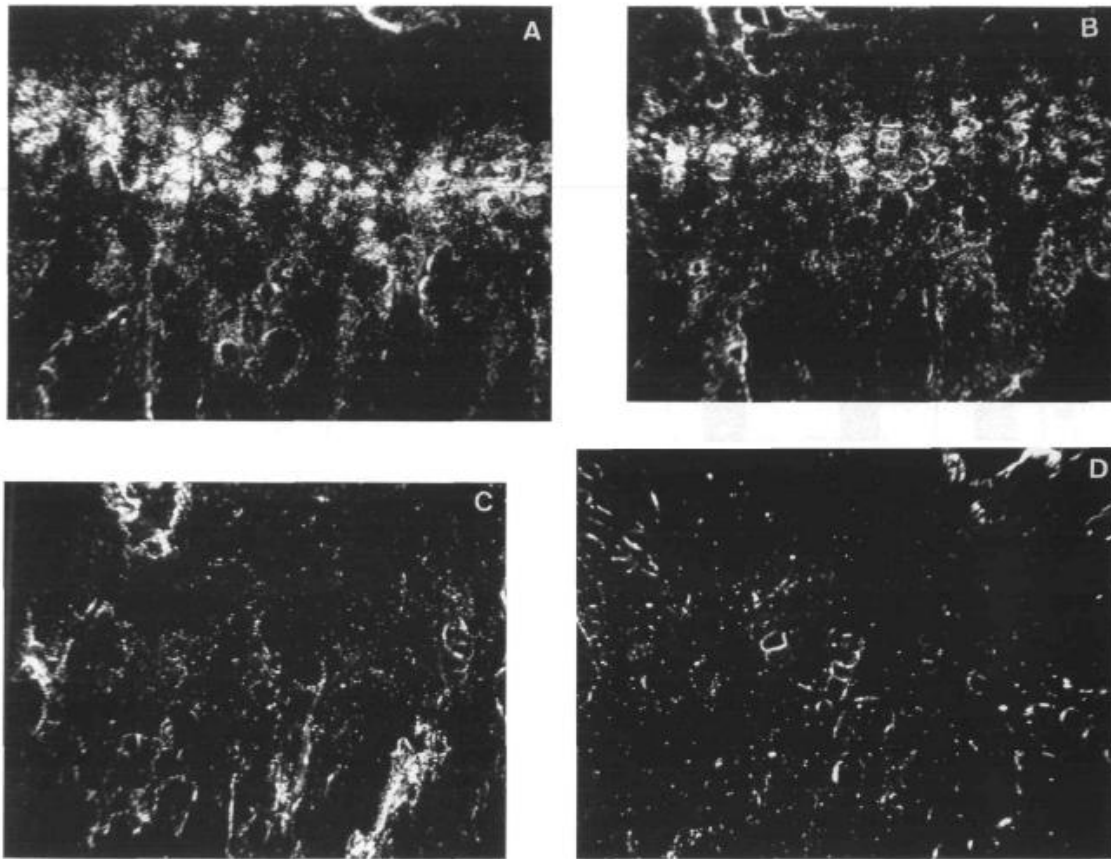


Fig. 5. Dark field images of PTH/PTHrP receptor mRNA expression in the tibia growth plate of a control rat (A and C), and a uraemic rat (B and D) (magnification, $\times 100$). Frozen decalcified sections of tibias were hybridized with either antisense (A and B) or sense (C and D) ^{35}S -labeled PTH/PTHrP receptor riboprobes. The signals were detected by emulsion autoradiography.

Finally, several mechanisms could theoretically account for the decreased expression of the skeletal PTH/PTHrP-R gene including elevated circulating PTH levels, low plasma calcitriol levels, hyperphosphataemia, hypocalcaemia, and/or other factors that are abnormal in the uraemic state. PTH has been demonstrated to decrease the PTH/PTHrP-R mRNA expression in cultured osteoblast-like cells (ROS 17/2.8) [41]. However, in an *in vivo* study, chronically elevated circulating PTH levels were probably necessary, but not sufficient, to account entirely for the reduced renal PTH/PTHrP-R transcript in rats with CRF [16]. Moreover, neither hypocalcaemia nor hyperphosphataemia appeared to play a direct role on the renal PTH/PTHrP-R downregulation of uraemic rats [16]. A potential effect of these factors on the expression of PTH/PTHrP-R mRNA in the skeleton remains to be studied, as must be the effect of correcting plasma calcitriol levels.

In conclusion, the present data indicate that rats with advanced chronic renal failure and secondary

hyperparathyroidism have reduced length of long bones and thickness of proximal cartilage growth plates, associated with a decrease in the number of mature chondrocytes and in their level of PTH/PTHrP-R gene expression. These alterations might be important in the pathogenesis of the growth retardation associated with the uraemic state.

Acknowledgements. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. A part of this work was submitted as an Abstract form for the Seventeenth Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR), September 9–13, 1995, Baltimore, MD, USA. At the time this study was performed, A. Ferreira, M.D., was an exchange post-doctoral fellow financially supported by the Fundação Calouste Gulbenkian. We would like to thank Drs M. Hruby, M. Mannstadt, and G. V. Segre for their contribution. We gratefully acknowledge the contribution of J. L. Samuel and the INSERM U147 for their help with the *in situ* hybridization quantification. We thank the Institut Scientifique Roussel-Uclaf for their support. Dr Ureña's present address is Service de Néphrologie, Clinique de l'Orangerie, Aubervilliers, France.

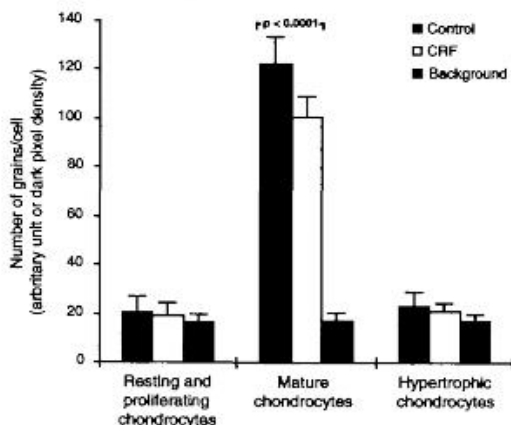


Fig. 6. Tibia frozen decalcified sections were hybridized with anti-sense ^{35}S -labeled PTH/PTHrP receptor antisense riboprobe and the signals detected by emulsion autoradiography. The bars represent the mean \pm SD of the number of grains per cell of 30 different cells from each zone (zone 1: resting and proliferating chondrocytes, zone 2: maturing chondrocytes, and zone 3: hypertrophic chondrocytes) of four control and four uraemic rats. The values are expressed in arbitrary units or dark pixel density (dpd) as described in Methods and are representative of three independent experiments. The number of grains in 30 chondrocytes of five tibia cartilage growth plates (from three control and two uraemic rats) hybridized with the ^{35}S -labeled PTH/PTHrP receptor sense riboprobe were used as negative control or background.

References

- Rosenblatt M, Kronenberg HM, Potts Jr TJ. Parathyroid hormone: physiology, chemistry, biosynthesis, secretion, metabolism, and mode of action. In: Degroot LJ, ed. *Endocrinology*. WB Saunders Co., Philadelphia: 1989: 848
- Canalis E, Hock JM, Raisz LG. Anabolic and catabolic effects of parathyroid hormone on bone and interactions with growth factors. In: *The parathyroid. Basic and Clinical Concepts*. Raven Press, Ltd., New York: 1994: 65–82
- Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption—a hypothesis. *Calcif Tissue Int* 1981; 33: 349–354
- Tams CS, Heersche JNM, Murray TM, Parsons JA. Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action: differential effects of intermittent and continual administration. *Endocrinology* 1982; 110: 506–511
- Howard GA, Bottemiller BL, Turner RT, Rader JT, Baylink DL. Parathyroid hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture: evidence for a coupling mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 3208–3214
- Dietrich JW, Canalis E, Maina DM, Raisz LH. Hormonal control of bone collagen synthesis *in vitro*: effects of parathyroid hormone and calcitonin. *Endocrinology* 1976; 110: 506–511
- Jüppner H, Abou-Samra A-B, Freeman MW, Kong XF, Schipani E, Richards J, Kolakowski LF, Hock J, Potts Jr JT, Kronenberg HM, Segre GV. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science* 1991; 254: 1024–1026
- Abou-Samra A-B, Jüppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani E, Ureña P, Richards J, Bonventre JV, Potts Jr JT, Kronenberg HM, Segre GV. Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2732–2736
- Segre GV. Receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein. In: *The parathyroid. Basic and Clinical Concepts*. Raven Press, Ltd., New York: 1994: 213–229
- Mehls O, Ritz E, Gilli G, Schmidt-Gayk H, Krempien B, Kourist B, Wesch H, Prager P. Skeletal changes and growth in experimental uremia. *Nephron* 1977; 18: 288–300
- Slatopolsky E, Caglar S, Pennell JP, Tagart DB, Canterbury JM, Reiss E. On the pathogenesis of hyperparathyroidism in chronic renal insufficiency in the dog. *J Clin Invest* 1971; 50: 492–499
- Ureña P, Kubrusly M, Mannstadt M, Hruby M, Tan M-MTT, Silve C, Lacour B, Abou-Samra A-B, Segre GV, Drüeke T. The renal PTH/PTHrP receptor is downregulated in rats with chronic renal failure. *Kidney Int* 1994; 45: 605–611
- Massry SG, Coburn JW, Lee Den, Jowsey J, Kleeman CR. Skeletal resistance to parathyroid hormone in renal failure: studies of 105 human subjects. *Ann Intern Med* 1973; 8: 357–364
- Llach F, Massry SG, Singer FR, Furokawa K, Kaye JM, Coburn JW. Skeletal resistance to endogenous parathyroid hormone in patients with early renal failure. A possible cause of secondary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1975; 41: 339–345
- Ureña P, Mannstadt M, Hruby M, Ferreira A, Segre GV, Drüeke T. Downregulation of the PTH/PTHrP receptor in uremia. *J Bone Min Metab* 1994; 12: S87–S90
- Ureña P, Mannstadt M, Hruby M, Ferreira A, Schmitt F, Silve C, Ardaillou R, Lacour B, Abou-Samra A-B, Segre GV, Drüeke T. Parathyroidectomy does not prevent the renal PTH/PTHrP receptor down-regulation in uremic rats. *Kidney Int* 1995; 47: 1795–1805
- Tonshoff B, Eden S, Weiser E, Carlsson B, Robinson I, Blum WF, Mehls O. Reduced hepatic growth hormone (GH) receptor gene expression and increased plasma GH binding protein in experimental uremia. *Kidney Int* 1994; 45: 1085–1092
- Mehls O, Ritz E, Hunziker E-B, Egli P, Heinrich U, Zapf J. Improvement of growth and food utilization by human recombinant growth hormone in uremia. *Kidney Int* 1988; 33: 45–52
- Salusky IB, Goodman WG. Growth hormone and calcitriol as modifiers of bone formation in renal osteodystrophy. *Kidney Int* 1995; 48: 657–665
- Fine RN, Kohaut EC, Brown D, Perlman AJ. Growth after recombinant human growth hormone treatment in children with chronic renal failure: Report of a multicenter randomized double-blind placebo-controlled study. *J Pediatrics* 1994; 124: 374–382
- Gretz N, Meisinger E, Strauch M. Partial nephrectomy and chronic renal failure: the mature rat model. *Contr Nephrol* 1988; 60: 46–55
- Finch JL, Rapp N, Martin KJ, Slatopolsky E. A new sensitive homologous radioimmunoassay for amino-terminal parathyroid hormone in rat. *J Bone Miner Res* 1986; 7: 229–233
- Hollis B. Assay of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D involving a novel single cartridge extraction and purification procedure. *Clin Chem* 1986; 32: 2060–2063
- Lee K, Deeds JD, Chiba S, Un-No M, Bond AT, Segre GV. Parathyroid hormone induces sequential c-fos expression in bone cells *in vivo*: *In situ* localization of its receptor and c-fos messenger ribonucleic acids. *Endocrinology* 1994; 134: 441–450
- Lee K, Deeds JD, Segre GV. Expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor messenger ribonucleic acids during fetal development of rats. *Endocrinology* 1995; 136: 453–463
- Dubus I, Mercadier A, Lucas O, Contard F, Nallet O, Oliviero P, Rappaport L, Samuel J-L. α - β -MHC mRNA quantification in adult cardiomyocytes by *in situ* hybridization: effect of thyroid hormone. *Am J Physiol* 1993; 265: C62–C71
- Loveys LS, Gelb D, Hurwitz SR, Puzas JE, Rosier RN. Effects of parathyroid hormone-related peptide on chick growth plate chondrocytes. *J Orthopaedic Res* 1993; 11: 884–891
- Koike T, Iwamoto M, Shimazu A, Nakashima K, Suzuki F, Kato Y. Potent mitogenic effects of parathyroid hormone (PTH) on embryonic chick and rabbit chondrocytes. *J Clin Invest* 1990; 85: 626–631

29. Kember NF, Walker KVR. Control of bone growth in rats. *Nature* 1971; 229: 428–429
30. Kember NF. Cell population kinetics of bone growth: the first ten years of autoradiographic studies with tritiated thymidine. *Clin Orthop* 1971; 76: 213–230
31. Amizuka N, Warshawsky H, Henderson JE, Goltzman D, Karaplis AC. Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation. *J Cell Biol* 1994; 126: 1611–1623
32. Karaplis AC, Luz A, Glowacki J, Glowacki J, Bronson RT, Tybulewicz VLJ, Kronenberg HM, Mulligan RC. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes & Development* 1994; 8: 277–289
33. Nilsson A, Carlsson B, Isgaard J, Isaksson OGP, Rymo L. Regulation by GH of insulin-like growth factor-I mRNA expression in rat epiphyseal growth plate as studied with *in situ* hybridization. *J Endocrinol* 1990; 125: 67–74
34. Nilsson A, Isgaard J, Lindahl A, Paterson L, Isaksson O. Effects of unilateral arterial infusion of GH and IGF-I on tibial longitudinal bone growth in hypophysectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1987; 40: 91–96
35. Isgaard J, Möller C, Isaksson OGP, Nilsson A, Mathews LS, Norstedt G. Regulation of insulin-like growth factor messenger ribonucleic acid in rat growth plate by growth hormone. *Endocrinology* 1988; 122: 1515–1520
36. Pfeilschifter J, Laukhuf F, Möller-Beckmann B, Blum WF, Pfister T, Ziegler R. Parathyroid hormone increases the concentration of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor beta 1 in rat bone. *J Clin Invest* 1995; 96: 767–774
37. Baker J, Liu J-P, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 1993; 75: 73–82
38. Liu J-P, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor 1 (igf-1) and type 1 IGF receptor (igf1r). *Cell* 1993; 75: 59–72
39. Jablonski G, Klem KH, Attramadal A, Dahl E, Ronningen H, Gautvik KM, Haug E, Gordeladze JO. Surgically induced uremia in rats I: Effect on bone strength and metabolism. *Bioscience Reports* 1993; 3: 275–287
40. Patel S, Hsu CH. Is skeletal response to parathyroid hormone abnormal in experimental renal failure? *J Lab Clin Med* 1988; 112: 387–393
41. Ureña P, Iida-Klein A, Kong XF, Jüppner H, Kronenberg HM, Abou-Samra A-B, Segre GV. Regulation of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor mRNA by glucocorticoids and PTH in ROS 17/2.8 cells and OK cells. *Endocrinology* 1994; 134: 451–456

Received for publication: 12.2.96

Accepted in revised form: 3.6.96

3.1.1. Isoforma óssea da fosfatase alcalina e formação óssea (manuscritos 4 e 5)

A fosfatase alcalina é uma proteína glicosilada produzida no fígado, osso, rim, intestino e placenta (154; 153).

Por este motivo, a fosfatase alcalina (FA) total é um marcador imperfeito da remodelação óssea, sendo necessário ter sempre presente que existem diferentes isoformas desta enzima, para além da óssea (153; 155; 156).

Particularmente frequente é o aumento da isoenzima hepática, que contribui para a elevação da fosfatase alcalina total, sem necessariamente refletir qualquer modificação na formação óssea e nos níveis da isoforma óssea da FA (153; 154; 157; 158).

As isoformas óssea e hepática da fosfatase alcalina representam cerca de 95% da FA total, numa relação habitual de 1:1 entre ambas estas isoformas.

Geralmente as situações de elevada ativação osteoblástica (por exemplo nas fases de crescimento rápido do esqueleto ósseo, na doença de Paget, etc.) acompanham-se de aumento da fosfatase alcalina total.

No entanto, elevações desta enzima também se observam em quadros com deficiente mineralização óssea, nomeadamente na osteomalácia (associada ou não a sobrecarga alumínica) e, em especial, na população pediátrica sujeita a DPCA (153; 127; 126).

A vida média das diferentes isoformas da fosfatase alcalina é modificada pela urémia, pelo que a percentagem de cada uma delas está habitualmente modificada nos doentes com insuficiência renal (153; 159).

No entanto, a isoforma óssea é a que parece depender menos da função renal residual (160).

No osso, a isoforma óssea da FA é produzida pelos osteoblastos e respetivos precursores, participando no processo de mineralização óssea.

Diversos métodos laboriosos tiveram de ser desenvolvidos para determinar os níveis da isoforma óssea da fosfatase alcalina, nomeadamente, a inativação pelo calor, a precipitação com concavalina-A, a inibição mediada por aminoácidos ou ureia, a cromatografia de elevada eficácia e a eletroforese em gel de agarose (161; 159; 162).

A determinação da isoforma óssea, mediante a utilização de anticorpos monoclonais específicos, permitiu o doseamento deste marcador da atividade osteoblástica de forma muito mais simples e reprodutível (163).

No entanto, estes métodos imunológicos parecem sobreavaliar os níveis de isoforma óssea da fosfatase alcalina em 16 a 18%, quando comparados com os métodos (mais laboriosos) da cromatografia de alta eficácia (161; 163).

A própria isoforma óssea da FA apresenta, por sua vez, “sub-isoformas” identificáveis por cromatografia líquida de alta eficácia. Por este método isolaram-se 3 isoformas (B1, B2 e B1/2) (164), ou mesmo 4 isoformas (B/I, B1x, B1 e B2) (165; 166) da isoforma óssea da FA.

Tendo em conta que no osso cortical predomina a isoforma B1 e no osso trabecular a isoforma B2, a determinação separada destas isoformas poderá refletir, de forma mais específica, a formação óssea em cada um destes 2 tipos de tecido ósseo (164).

Tivemos a oportunidade de comparar, pela primeira vez numa população de doentes hemodialisados, a sensibilidade e a especificidade da isoenzima óssea da fosfatase alcalina (determinada mediante a utilização de um método radioimunométrico) e da fosfatase alcalina total, no diagnóstico da osteodistrofia renal (69; 161; 167).

Neste estudo, analisámos simultaneamente diversos marcadores bioquímicos da formação óssea com os parâmetros histomorfométricos estáticos e dinâmicos, obtidos através da realização de biopsia óssea em 42 doentes hemodialisados.

A isoforma óssea da fosfatase alcalina, mostrou maior sensibilidade e especificidade, na separação entre doença óssea de elevada remodelação e doença óssea adinâmica.

Os nossos resultados demonstraram que a isoforma óssea da fosfatase alcalina se correlacionou com diversos parâmetros estáticos e dinâmicos da formação óssea,

nomeadamente com a superfície osteoblástica e com o índice de formação óssea (“BFR”-*bone formation rate*) ($r = 0,91$; $p < 0,0001$) (161; 167).

Valores da isoforma óssea da fosfatase alcalina superiores a 20 ng/mL apresentaram uma sensibilidade de 100% e especificidade igualmente de 100% no diagnóstico de HPTH 2°. A associação destes valores em conjunção com níveis de PTH intacta superiores a 200 pg/ml aumentou a previsibilidade positiva para o diagnóstico de HPTH de 84 para 94% (167).

Resultados globalmente concordantes foram posteriormente confirmados por outros grupos, não apenas em doentes com HPTH 2, como também em doentes com quadros de doença óssea adinâmica (161).

Plasma Total Versus Bone Alkaline Phosphatase as Markers of Bone Turnover in Hemodialysis Patients¹

Pablo Ureña, Milan Hruby, Aníbal Ferreira, Kim S. Ang, and Marie-Christine de Vernejoul²

P. Ureña, Service de Néphrologie et d'Hémodialyse, Clinique de l'Orangerie, Aubervilliers, France

M. Hruby, A. Ferreira, Département de Néphrologie, INSERM Unité 90, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

K.S. Ang, Service de Néphrologie, Centre Hospitalier de Saint-Brieuc, France

M.-C. de Vernejoul, INSERM Unité 349, Hôpital Lariboisière, Paris, France

(J. Am. Soc. Nephrol. 1996; 7:506-512)

ABSTRACT

Plasma total versus bone alkaline phosphatase as markers of bone turnover in hemodialysis patients. Plasma bone-specific alkaline phosphatase (bAP) has been demonstrated to be more reliable than total alkaline phosphatases (tAP) in providing information about bone turnover in patients with metabolic bone diseases. This study surveyed 42 hemodialysis patients who underwent a systematic transiliac bone biopsy for histomorphometry study. Plasma bAP was determined by using a new immunoassay (Tandem-R Ostease[®]; Hybritech, Liège, Belgium). Plasma bAP values were compared with those of two other plasma markers of bone metabolism, namely tAP and intact parathyroid hormone (iPTH), for the correlations with bone histomorphometric parameters. Patients with high-turnover bone disease (HTBD) ($N = 32$) had significantly higher plasma bAP levels than patients with normal or low bone turnover (N/LTBD) ($N = 10$) (66.9 ± 63.5 ng/mL versus 10.8 ± 4.2 ng/mL, respectively). Bone formation and resorption were highly correlated in these patients, and plasma bAP levels were positively correlated with bone resorption parameters, including osteoclast surface ($r = 0.39$, $P < 0.0001$) and osteoclast number/mm² ($r = 0.36$, $P < 0.001$), and with bone formation parameters, osteoblast surface ($r = 0.50$, $P < 0.005$), and bone formation rate ($r = 0.91$, $P < 0.0001$). The bone formation rate was better correlated with plasma bAP levels than with either plasma tAP or iPTH concentrations. Plasma bAP level equal or

higher than 20 ng/mL, either alone or combined with plasma iPTH of 200 pg/mL, had the highest sensitivity, specificity, and predictability values for the diagnosis of high-turnover bone disease, and formally excluded patients with normal or LTBD. In conclusion, plasma bAP can be measured with a reliable immunoassay in hemodialysis patients. It represents a highly sensitive and specific biochemical marker of skeletal remodeling in these patients. Therefore, both serum iPTH and bAP are complementary in diagnoses of the type of renal osteodystrophy.

Key Words: Bone-specific alkaline phosphatase, uremia, hemodialysis, secondary hyperparathyroidism, renal osteodystrophy

Chronic renal failure is often associated with a variety of bone disorders that have generally been defined as renal osteodystrophy. The histopathological spectrum of this entity ranges from conditions characterized by reduced bone formation and/or impaired mineralization, such as aluminum-related bone disease (1), adynamic osteopathy (2), and osteomalacia (3), to those in which the bone turnover is markedly increased, such as secondary hyperparathyroidism (1).

Despite the continuous progress of clinical, laboratory, and radiological techniques in the evaluation and identification of specific bone disorders, the definitive diagnostic and management strategies for many patients still require a transiliac bone biopsy. This biopsy is preferentially performed after tetracycline double labeling, which enables a reliable histomorphometric analysis and assessment of the cellular activity within the bone tissue (1).

During recent years, beside the development of highly precise radioimmunoassays for intact parathyroid hormone (iPTH), several enzymes and matrix proteins, synthesized by osteoblasts and protein fragments released after bone matrix breakdown, have been proposed as plasmatic markers of bone turnover. Among these enzymes, alkaline phosphatases (AP) have been the object of intensive research, and five different tissue-specific forms have already been described, including hepatic, skeletal, renal, intestinal, and placental AP (4-7). This may explain the difficulties encountered in distinguishing the type of AP responsible for the elevations of total alkaline phosphatases (tAP), especially in cases in which tAP were only slightly elevated. Recently, monoclonal antibodies against bone-specific alkaline phosphatases (bAP) and immunoassays for its measurement in the plasma have been utilized (8). It has been shown that when such immunoassays were used, plasma bAP

¹ Received June 5, 1995. Accepted October 10, 1995.

² Correspondence to Dr. M.-C. de Vernejoul, INSERM Unité 349, Biologie Cellulaire et Moléculaire de l'Os et du Cartilage, Centre Viggo Petersen, Hôpital Lariboisière, 6 rue Guy Patin, 75010 Paris, France.

1046-6673/97/03-0506\$03.00/0

Journal of the American Society of Nephrology

Copyright © 1996 by the American Society of Nephrology

levels were more sensitive than tAP levels in patients with osteoporosis, primary hyperparathyroidism, hyperthyroidism, acromegaly, and bone metastasis (8,9). Therefore, plasma bAP measurement should be expected to be more reliable than tAP activity in providing information about bone turnover in hemodialysis patients.

In this study, we have determined the diagnostic value of plasma bAP in the noninvasive evaluation of the degree of bone turnover in hemodialysis patients. Plasma bAP was measured with a new direct immunoradiometric assay (IRMA), recently developed by Hybritech (Tandem-R Ostase®; Liège, Belgium) (8).

METHODS

Patients

Forty-two adult uremic patients, 19 women and 23 men, on maintenance hemodialysis were included in the study presented here after their informed consent was received. Their mean (\pm SD) age was 58 ± 13 yr. Mean duration of hemodialysis treatment was 7.7 ± 5.3 yr. All patients were treated by conventional bicarbonate hemodialysis 4 to 5 h, 3 times each week. Underlying nephropathy types were: nephrosclerosis (four patients), interstitial nephropathy (13 patients), polycystic kidney disease (four patients), chronic glomerulonephritis (11 patients), diabetic nephropathy (one patient), and unknown (nine patients). All patients were oligoanuric (≤ 200 mL/24 h). Plasma levels of hepatic enzymes, serum glutamic-pyruvic transaminase (SGPT), and serum glutamic-oxaloacetic transaminase (SGOT) were within the limits of normal values in all patients. At the time of the study, most of the patients had received either calcitriol or phosphate-binding therapy for different periods of time. None of them had received another bone-affecting treatment, such as corticosteroids, steroids, calcitonin, and bisphosphonates. Thirty-two patients had clinical and biological signs of secondary hyperparathyroidism. There was no evidence for other bone disease such as osteomalacia, aluminum-related bone disease, Paget's disease, and severe osteoporosis.

Biochemistry

Predialysis blood sampling was performed after a 12-h fast 1 to 2 wk before the bone biopsy. Plasma calcium was determined by using atomic absorption spectrometry, and plasma phosphorus was determined by using a Technicon Auto Analyzer. Plasma aluminum (Al) was determined by using atomic absorption spectrometry with a graphite oven. Plasma iPTH was measured by using a commercial radioimmunoassay for intact human PTH 1-84 (Allegro Intact PTH; Nichols Institute, San Juan Capistrano, CA). The range of normal values was between 10 and 65 pg/mL. Plasma tAP were measured by an automated method (normal values, 30 to 90 IU/L). bAP was measured by using a radioimmunoassay (Tandem-R® Ostase®) provided by Hybritech Europe S.A., Belgium (8). The mean \pm SD value obtained in normal adult individuals was 11.8 ± 4.3 ng/mL (range, 4 to 25 ng/mL).

Bone Biopsy and Bone Histomorphometry

Transilliac bone biopsies using the trephine of Bordier-Meunier with an internal diameter of 8 mm were obtained in 42 patients. In 17 patients, the bone biopsy was performed

after tetracycline double labeling (2 days on, 10 days off, 2 days on with 600 mg dimethylchlorotetracycline/day). The bone specimens were fixed for 24 h in methanol, dehydrated, and embedded in methylmethacrylate. Undecalcified sections of 5-micron thickness were made by using a microtome (Model Jung K; Reichert, Heidelberg, Germany). Three non-consecutive sections were stained with toluidine blue and two were stained with a specific histochemical stain for detection of aluminum in bone (aurin tricarboxylic-acid method). Two unstained sections (7-microns thick) were prepared for fluorescence microscopy. Each bone section was read in duplicate, by two different persons who had no knowledge of clinical or biochemical information of the patients. The sections were analyzed quantitatively for static and dynamic parameters of bone formation and bone resorption. Histomorphometric measures were carried out with a semiautomatic image analyzer (Biocom, Les Ulis, France) coupled with a Leitz microscope. Approximately 50 different fields were analyzed for the same bone biopsy. Normal bone histomorphometric values are from de Vernejoul et al. (1). The following bone histomorphometric parameters, expressed according to the standardized nomenclature (10), were measured in trabecular bone: trabecular bone volume (BV/TV), expressed as the percentage of trabecular space; osteoid volume (OV/BV), expressed as the percentage of trabecular bone volume; osteoid surface (OS/BS), expressed as the percentage of trabecular bone surface; osteoblastic surface (Obl. S/BS), expressed as the osteoid surface covered with plump osteoblasts and expressed as the percentage of trabecular bone surface; osteoid thickness (O. Th), expressed in μm ; osteoclast surface (Ocl. S/BS), defined as the fraction of trabecular bone surface covered with osteoclasts; osteoclast number (Ocl. n) per mm^2 of tissue section; and aluminum surface (Al S/BS), defined as the fraction of trabecular bone surface covered by aluminum. The bone dynamic parameters considered were: double labeled surface (d. Lab. S/BS), expressed as the fraction of trabecular bone surface; mineralizing surface (MS/BS), defined as the total extent of double label plus half of the extent of single label and expressed as the fraction of the bone surface; mineral apposition rate (MAR), expressed as $\mu\text{m}/\text{day}$; adjusted apposition rate (Aj. AR) ($\mu\text{m}/\text{day}$); and bone formation rate (BFR) ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ per day), calculated as the mineralization apposition rate multiplied by total labeled surfaces.

Patients were separated into two groups according to type of bone disease. High-turnover bone disease (HTBD), defined as a BFR that was 2 SD higher than the normal value ($0.07 \pm 0.02 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ per day), and normal or low-turnover bone disease (N/LTBD), defined as a BFR in the normal range or lower. Adynamic bone disease (ABD) was considered when the BFR value was 2 SD lower than the normal value. We have previously shown that there is a good correlation between the percentage of osteoblastic surfaces and the percentage of double-labeled surfaces (11). In the cases without dynamic bone parameters, HTBD was diagnosed for Obl. S/BS $\geq 6.0\%$, and Ocl. n ≥ 0.8 per mm^2 (12).

Statistical Analysis

All results are given as the means \pm SD. Statistical analysis was performed by using analysis of variance or unpaired *t* test, as appropriate. The significance of the magnitude of correlation coefficients between biochemical and bone histological parameters was assessed by linear regression analysis. Significance levels are indicated in table and figure legends. Sensitivity, specificity, and predictivity analyses

were performed by using the methods described by Noe (13) and Galen and Gambino (14).

RESULTS

Biochemistry and Bone Histomorphometry

Table 1 shows the comparison of plasma biochemical and bone histomorphometry parameters between patients with HTBD and N/LTBD, respectively. No significant difference was observed for the plasma levels of total calcium, phosphorus, and tAP (Figure 1) between the two groups of patients. However, plasma iPTH, bAP, and aluminum levels were significantly higher in the group of patients with HTBD than in the group of N/LTBD. Values were: iPTH, 773 ± 670 versus 128 ± 149 pg/mL; bAP, 66.9 ± 63.5 versus 10.8 ± 4.2 ng/mL (Figure 2); and aluminum, 1.49 ± 0.72 versus 0.67 ± 0.61, in patients with HTBD and N/LTBD, respectively.

Individual levels of tAP and bAP (Figures 1 and 2) demonstrated that a high number (9 of 10) of patients with N/LTBD had plasma tAP levels that were significantly higher than the upper limit of the normal value, despite the absence of hepatic or intestinal disorder. On the contrary, none of the patients with N/LTBD had plasma bAP levels higher than the normal value. Five patients with HTBD had normal plasma bAP levels. Individual values for plasma iPTH are shown in Figure 3. It can be seen that in the group of patients with HTBD, five of them had iPTH values in the normal range. Eleven out of 32 patients had iPTH levels lower than 400 pg/mL.

Patients with HTBD had a marked increase of bone resorption, as assessed by the increase in osteoclast number and in the trabecular surfaces covered by

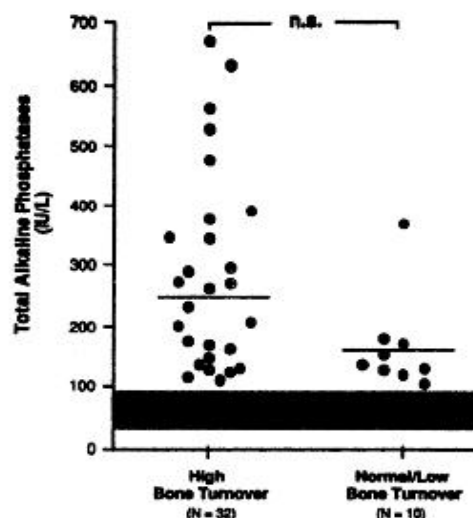


Figure 1. Plasma total alkaline phosphatase levels in 42 hemodialysis patients. The mean ± SD was 249 ± 161 IU/L in patients with high-turnover bone disease, and 167 ± 75 IU/L in patients with normal or low-turnover bone disease. The shaded zone represents the range of normal levels (30 to 90 IU/L). n.s., statistically nonsignificant difference.

active osteoclasts, without any significant perturbation of bone mineralization. They also had an increased bone formation evidenced by significantly increased osteoblast surfaces and BFR. Both bone formation and resorption parameters were well coupled ($r = 0.80, P < 0.0001$). There was no difference in

TABLE 1. Plasma biochemical data and bone histomorphometric data^a

Data	High Turnover ^b (N = 32)	Normal or Low Turnover ^c (N = 10)	P
Plasma Biochemical Data			
Total calcium (mM)	2.58 ± 0.23	2.48 ± 0.33	NS
Phosphorus (mM)	2.14 ± 0.47	1.92 ± 0.64	NS
iPTH (pg/mL)	753 ± 670	128 ± 149	0.005
tAP (IU/L)	249 ± 161	167 ± 75	NS
bAP (ng/mL)	66.9 ± 63.5	10.8 ± 4.2	0.0008
Aluminum (μM)	1.49 ± 0.72	0.67 ± 0.61	0.008
Bone Histomorphometric Data			
BV/TV (%)	18.7 ± 6.9	12.7 ± 8.7	0.02
OV/BV (%)	14.4 ± 7.4	5.8 ± 4.2	0.001
OS/BS (%)	57.3 ± 13.4	27.0 ± 22.2	0.0001
Obl. S/BS (%)	15.5 ± 11.3	2.2 ± 1.7	0.0007
O. Th (μm)	11.96 ± 4.81	5.80 ± 2.92	0.0005
Ocl. S/BS (%)	4.06 ± 2.81	0.77 ± 0.70	0.0008
Ocl. n/mm ²	2.90 ± 2.59	0.39 ± 0.34	0.004
BFR (μm ³ /μm ² per day) [*]	0.31 ± 0.24	0.05 ± 0.06	0.02

^a Values are expressed as mean ± SD. iPTH, intact parathyroid hormone; tAP, total alkaline phosphatases; bAP, bone-specific alkaline phosphatase; NS, nonsignificant difference; BV/TV, trabecular bone volume; OV/BV, osteoid volume; OS/BS, osteoid surface; Obl. S/BS, osteoblastic surface; O. Th, osteoid thickness; Ocl. S/BS, osteoclast surface; Ocl. n, osteoclast number; BFR, bone formation rate.

^b High-turnover bone disease, patients with a BFR 2 SD higher than the normal value.

^c Normal or low turnover bone disease, when the BFR was in the normal range or lower.

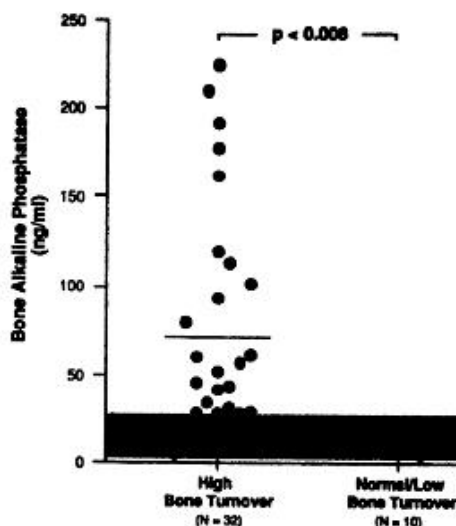


Figure 2. Plasma bone-specific alkaline phosphatase levels in 42 hemodialysis patients. The mean \pm SD was 66.9 ± 63.5 ng/mL in patients with high-turnover bone disease, and 10.8 ± 4.2 ng/mL in patients with normal or low-turnover bone disease. The shaded zone represents the range of normal levels (4 to 25 ng/mL).

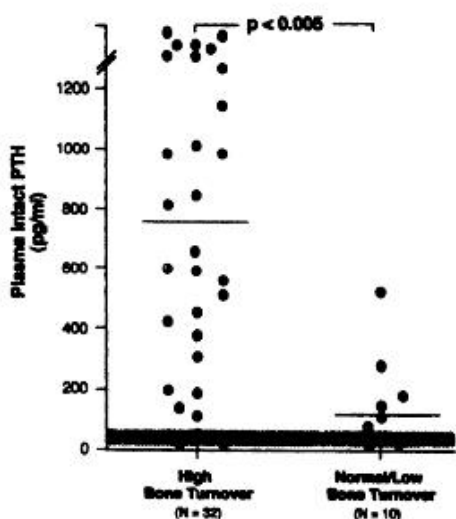


Figure 3. Plasma intact PTH levels in 42 hemodialysis patients. The mean \pm SD was 753 ± 670 pg/mL in patients with high-turnover bone disease, and 128 ± 149 pg/mL in patients with normal or low-turnover bone disease. The shaded zone represents the range of normal levels (10 to 65 pg/mL).

the percentage of bone surface stained by aluminum between the two groups. There was no evidence for aluminum-related bone disease, mixed uremic osteodystrophy, or osteomalacia in the group of patients

with normal or LTBD, on the basis of the BFR, osteoid thickness, and bone cellularity (11,12). Only one patient had a histologically proven ABD; he had 0% of Obl. S/BS, 0.70% of Ocl. S/BS, and 16.32% of OS/BS, and his plasma iPTH level was undetectable, his bAP level was 12.0 ng/mL, and his tAP level was 140 IU/L.

Correlations

Table 2 shows the correlation of plasma iPTH, tAP, and bAP levels with bone histomorphometric parameters in all dialysis patients. Plasma bAP levels were positively correlated with iPTH ($r = 0.82$, $P < 0.0001$) (Figure 4). Both the osteoblast ($r = 0.50$, $P < 0.005$) and osteoclast ($r = 0.39$, $P < 0.0001$) surfaces were better correlated with plasma bAP levels than with tAP levels. The BFR was excellently correlated with plasma bAP levels ($r = 0.91$, $P < 0.0001$), much better than with either plasma tAP or iPTH levels (Table 2).

However, several discrepancies were observed between plasma bAP and iPTH levels. There was a subgroup of five patients with iPTH > 400 pg/mL and normal plasma bAP. They had (mean \pm SD) plasma bAP levels of 11.7 ± 4.3 ng/mL, iPTH levels of 632 ± 202 pg/mL, and a BFR of $0.176 \pm 0.079 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ per day (only three patients had BFR determined). These results suggest that the BFR had a tendency to be lower in these patients compared with the BFR in the rest of patients with HTBD ($0.310 \pm 0.240 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$ per day). However, this conclusion needs confirmation because the low number of samples did not allow any statistical test. There was a second subgroup of six patients with histological signs of HTBD in which plasma iPTH was lower than 400 pg/mL (191 ± 127 pg/mL) and bAP higher than 25 ng/mL (34.5 ± 11.5 ng/mL). In a third subgroup of 12 patients with normal bAP and iPTH levels (10.9 ± 4.60 ng/mL and 85 ± 80 pg/mL, respectively), three patients had histological signs of HTBD and nine had normal or LTBD.

Sensitivity, Specificity, and Predictability

Table 3 shows the calculations of sensitivity, specificity, and predictability of both HTBD and N/LTBD, on the basis of the assessment of iPTH, tAP, and bAP. Plasma bAP levels > 20 ng/mL were better predictors (sensitivity 100%, specificity 100%, positive predictability 84%) of HTBD than were plasma tAP levels of > 200 IU/L or iPTH levels of > 200 pg/mL. The prediction of HTBD increased when two of the criteria were combined: iPTH levels > 200 pg/mL and bAP levels > 20 ng/mL (positive predictability, 94%). By analogy, use of the combined criteria of iPTH level < 200 pg/mL and bAP levels < 20 ng/mL for the prediction of N/LTBD resulted in 80% sensitivity, 100% specificity, and 100% positive predictability. It should be emphasized that plasma bAP levels equal to or higher than 20 ng/mL, either alone or combined with plasma iPTH levels of 200 pg/mL, established the diagnosis of

TABLE 2. Correlations of plasma iPTH, total alkaline phosphatases, and bone alkaline phosphatase with bone histomorphometric parameters^a

Parameter	iPTH	Total Alkaline Phosphatases	Bone Alkaline Phosphatase
BV/TV (%)	0.51	0.36	0.54
OV/BV (%)	0.74	0.61	0.76
OS/BS (%)	0.48	0.38	0.58
Obl. S/BS (%)	0.55	0.38	0.50
Ocl. S/BS (%)	0.30	0.30	0.39
Ocl. n/mm ²	0.32	0.22 ^b	0.36
O. Th (μm)	0.67	0.55	0.75
BFR (μm ³ /μm ² per day)	0.67	0.74	0.91

^a Abbreviations as in legend to Figure 1.

^b No statistical significance.

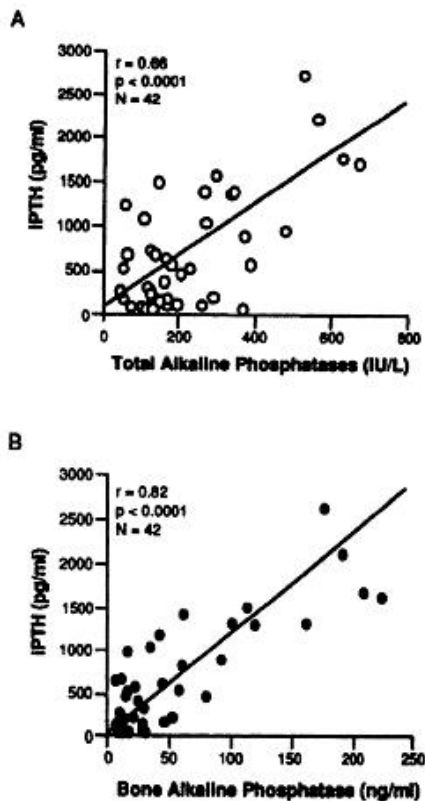


Figure 4. Correlation of plasma total alkaline phosphatases (Panel A) and bone-specific alkaline phosphatase (Panel B) levels with plasma intact parathyroid hormone levels in 42 hemodialysis patients.

HTBD and formally excluded patients with normal or LTBD.

DISCUSSION

Alkaline phosphatases are glycosylated proteins produced by at least five different organs: liver, bone,

kidney, intestine, and placenta (4-7). To date, four genes that encode for these AP isoenzymes have been identified in humans. Three at chromosome 2q34-37 and a fourth gene at chromosome 1p36.1-34 (4,5). bAP is secreted by osteoblast cells, and it is thought that bAP plays a major role in bone formation and skeletal mineralization. In the study presented here, we demonstrated that bone formation and bone resorption parameters correlated better with plasma bAP levels, rather than with tAP or iPTH levels. Accordingly, plasma bAP levels were the best predictors of bone turnover in our dialysis patients. When combined with plasma iPTH levels, the predictive value of this marker was even increased.

The limitation of plasma tAP activity in evaluating the degree of bone turnover has generally been recognized. In the dialysis population, it has always been difficult to consider the increased level of plasma tAP as synonymous with HTBD, because of the high occurrence of postinfectious hepatopathies (15,16). Several indirect techniques have been used to measure the bAP separately from the other types of AP and to enhance the sensitivity of this marker, including: heat inactivation, inhibition by amino acids and urea, wheat germ lectin or concanavalin-A precipitation, agarose-gel electrophoresis, and high-performance affinity chromatography (17-21). The disadvantage of these techniques was that they were laborious, time-consuming, and had low sensitivity and low specificity. Fortunately, this has now been solved by the use of monoclonal antibody specific for bAP.

Our findings show for the first time that plasma bAP levels are significantly higher in dialysis patients with HTBD than in those with N/LTBD. Furthermore, they confirm the data of different previous studies that suggested that plasma bAP could be a sensitive marker in the assessment of bone turnover in uremic patients with secondary hyperparathyroidism, because of its excellent correlation with plasma iPTH (8,9). In our study, plasma bAP levels were also positively correlated with iPTH. Moreover, they correlated with both bone formation and resorption parameters better than iPTH and tAP did.

Likewise, plasma bAP levels were the best predictor

TABLE 3. Calculations of sensitivity, specificity, and predictability

Parameter	iPTH (pg/mL)		Total AP (IU/L)		Bone AP (ng/mL)			Combined Parameters	
High Turnover	>150	>200	>150	>175	>200	>10	>15	>20	iPTH >200 and Bone AP >20
Sensitivity (%)	78	72	62	53	50	84	97	100	100
Specificity (%)	70	80	60	80	90	70	83	100	80
Positive predictability (%)	89	92	83	89	94	90	86	84	94
Negative predictability (%)	50	47	33	35	36	58	83	100	100
Low Turnover	<150	<200	<150	<175	<200	<10	<15	<20	iPTH <200 and Bone AP <20
Sensitivity (%)	70	80	60	80	90	70	83	100	80
Specificity (%)	78	72	62	53	50	84	97	100	100
Positive predictability (%)	50	47	33	35	36	58	83	100	100
Negative predictability (%)	89	92	83	89	94	90	86	84	94

of bone turnover in the dialysis patients. Values higher than 20 ng/mL had a sensitivity of 100%, and a specificity of 100% for the diagnosis of HTBD. When associated with iPTH > 200 pg/mL the positive predictability value increased from 84% to 94%. Interestingly, several patients with high plasma iPTH and histological signs of HTBD had plasma bAP lower than 20 ng/mL. Because the known skeletal resistance to the action of PTH and the probably altered osteoblastic function (22–24) in uremic patients, one can hypothesize that the levels of plasma bAP may be more significantly influenced by the degree of these alterations in some patients. Furthermore, these patients, in spite of high iPTH levels, have only a moderate HTBD as evidenced by their BFR. There was a good correlation between plasma bAP levels and the BFR.

For the diagnosis of N/LTBD, using the criterion of plasma bAP level less than 20 ng/mL resulted in 100% sensitivity, 100% specificity, and 100% positive predictability. In comparison, Salusky *et al.* reported that plasma iPTH values below 200 pg/mL were 100% sensitive and 79% specific, and had a positive predictability of 58% for the assessment of LTBD (25). By using the agarose-gel electrophoresis method of quantitation of plasma bAP, it has been found that a level of bAP < 27 U/L had 78.1% sensitivity, 86.4% specificity, and 75% positive predictability for the diagnosis of ABD (26). In the study presented here, patients with N/LTBD had plasma bAP levels within the normal range. The unique patient with histological signs of ABD also had a normal plasma bAP value, thus we can assume that bAP will probably be normal or decreased in a such type of bone disease. However, normal plasma bAP levels were seen in some patients with mild HTBD. Altogether, these results suggest that plasma bAP levels alone or combined with iPTH may be proposed as the best plasma marker of secondary hyperparathyroidism in dialysis patients.

In conclusion, this study demonstrates that plasma bAP can be measured with a reliable immunoassay in hemodialysis patients. It represents a highly sensitive and specific biochemical marker of skeletal remodeling in these patients, even better when associated

with plasma iPTH levels. Plasma bAP levels equal or higher than 20 ng/mL established the diagnosis of HTBD and formally excluded patients with N/LTBD. The combination of serum bAP and iPTH measurements improved the diagnosis of the type of renal osteodystrophy.

ACKNOWLEDGMENTS

At the time that this study was performed, Anibal Ferreira, M.D., was an exchange postdoctoral fellow supported by the Fundação Calouste Gulbenkian. We acknowledge the contribution of the Institut Scientifique Roussel, and the useful discussions with Caroline Morieux, Michael Mannstadt, M.D., and Pierre Simon, M.D. We also thank Dr. Joëtte Pengoan and Dr. Béatrice Birmele of the Centre Hospitalier Universitaire de Tours, France, and Dr. Jean Paul Eche, of the Clinique du Pont de Chaume, Montauban, France, for their collaboration.

REFERENCES

- DeVernejoul MC, Kuntz D, Miravet L, Guerin J, Biela-koff J, Ryckewaert A: Bone histomorphometry in hemodialysed patients. *Metab Bone Dis & Rel Res* 1981;3: 175–179.
- Hercz G, Pei Y, Greenwood C, *et al.*: Aplastic osteodystrophy without aluminum: The role of "suppressed" parathyroid function. *Kidney Int* 1993;44:860–866.
- Hodsman AB, Sherrard DJ, Wong EGC, *et al.*: Vitamin-D-resistant osteomalacia in hemodialysis patients lacking secondary hyperparathyroidism. *Ann Intern Med* 1981;94:629–637.
- Seargeant LE, Stinson RA: Evidence that three structural genes code for human alkaline phosphatase. *Nature (Lond)* 1979;281:152–154.
- Harris H: The human alkaline phosphatases: What we know and what we don't know. *Clin Chim Acta* 1989;180: 177–188.
- Goldstein DJ, Rogers C, Harris H: A search for trace expression of placental-like alkaline phosphatase in non-malignant human tissues: Demonstration of its occurrence in lung, cervix, testis, and thymus. *Clin Chim Acta* 1982;125:63–75.
- Weiss MJ, Henthorn PS, Lafferty MA, Slaughter C, Raducha M, Harris H: Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;84: 7182–7186.
- Garnero P, Delmas PD: Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatase with a new immunoradiometric assay in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol & Metab* 1993;77:1046–1053.
- Duda RJ, O'Brien JF, Katzmann JA, Petersen JM, Mann KG, Riggs BL: Concurrent assays of circulating bone Gla

- protein and bone alkaline phosphatase: effect of sex, age and metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol & Metab* 1988;66:951-957.
10. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al.: Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. *J Bone Min Res* 1987;2:595-610.
 11. Garcia-Carrasco M, De Vernejoul MC, Sterkers Y, Morieux C, Kuntz D, Miravet L: Decreased bone formation in osteoporotic patients compared to age matched control. *Calcif Tissue Int* 1989;44:173-175.
 12. DeVernejoul MC, Belenguer R, Halkidou H, Buisine A, Bielakoff J, Miravet L: Histomorphometric evidence of deleterious effect of aluminum on osteoblast. *Bone (NY)* 1985;6:15-20.
 13. Noe DA. In: Noe DA, Ed. *The Logic of Laboratory Medicine*. München, Germany: Urban & Schwarzenberg; 1985:31.
 14. Galen RS, Gambino SR. In: Galen RS, Gambino SR, Eds. *Beyond Normality: The Predictive Value and Efficiency of Medical Diagnoses*. New York: John Wiley & Sons; 1900: 9-14.
 15. Naik RB, Gosling P, Price CP: Comparative study of alkaline phosphatase isoenzymes, bone histology, and skeletal radiography in dialysis bone disease. *Br Med J* 1977;1:1307-1310.
 16. Leung KS, Fung KP, Sher AHL, Li CK, Lee KM: Plasma bone-specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. *J Bone Jt Surg Br Vol* 1993;75: 288-292.
 17. Moss DW, Witby LG: A simplified heat inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. *Clin Chim Acta* 1975;61:63-71.
 18. Moss DW: Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chem* 1982;28:2007-2016.
 19. Rosalki SB, Foo AY: Two new methods for separating and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in plasma. *Clin Chem* 1984;30:1182-1186.
 20. Garrido JC, Aguayo FJ, Moreno CA: Comparison of three bone alkaline phosphatase quantification methods in patients with increased alkaline phosphatase activities. *Clin Chem* 1992;38:1165-1166.
 21. Gonchoroff DG, Branum EL, Cedel SL, Riggs BL, O'Brien JF: Clinical evaluation of high-performance affinity chromatography for the separation of bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chim Acta* 1991;199:43-50.
 22. Llach F, Massry SG: On the mechanism of secondary hyperparathyroidism in moderate renal insufficiency. *J Clin Endocrinol & Metab* 1985;61:601-606.
 23. Ureña P, Kubrusly M, Mannstadt M, et al.: The renal PTH/PTHrP receptor is down-regulated in rats with chronic renal failure. *Kidney Int* 1994;45:605-611.
 24. Marie FJ, Lomri A, DeVernejoul MC, et al.: Relationship between histomorphometric features of bone formation and bone cell characterization in vitro in renal osteodystrophy. *J Clin Endocrinol & Metab* 1989;69:1166-1173.
 25. Salusky IB, Ramirez JA, Oppenheim W, et al.: Biochemical markers of renal osteodystrophy in pediatric patients undergoing CAPD/CCPD. *Kidney Int* 1994;45: 253-258.
 26. Couttenye MM, D'Haese PC, VanHoof VO, et al.: Bone alkaline phosphatase (BAP) compared to PTH in the diagnosis of adynamic bone disease (ABD) [Abstract]. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9:905A.

Na presença de sobrecarga alumínica, pode observar-se uma dissociação entre os valores da isoforma óssea da fosfatase alcalina e da PTH intacta.

Na verdade, como foi demonstrado por Cannata-Andía e colaboradores, a intoxicação alumínica associou-se a níveis mais elevados da isoforma óssea da fosfatase alcalina (fruto da estimulação osteoblástica direta), com níveis séricos reduzidos de PTH intacta (causada por inibição da síntese e libertação de PTH) (168; 169).

Confirmando estas observações prévias, posteriormente, tivemos igualmente a possibilidade de demonstrar que numa população de 140 doentes prevalentes em hemodiálise, níveis mais elevados de aluminemia se associaram a menor concordância entre os níveis plasmáticos da isoforma óssea da fosfatase alcalina e os níveis séricos da PTH intacta (170).

Bone Alkaline Phosphatase besides Intact Parathyroid Hormone in Hemodialysis Patients – Any Advantage?

Cristina Jorge Célia Gil Marília Possante Eugénia Silva Rui Andrade
Nazaré Santos Ana Cruz Romeu Teixeira Aníbal Ferreira

Hemodial – Centro de Hemodiálise de Vila Franca de Xira, Vila Franca de Xira, Portugal

Key Words

Hemodialysis · Bone alkaline phosphatase ·
Aluminium · iPTH · Renal osteodystrophy

Abstract

Background/Aim: Bone alkaline phosphatase (bAP) is known to be an important biochemical marker of bone formation. Through the present study, we intended to find out whether there is any advantage in bAP determination, as a routine biochemical marker, besides intact parathyroid hormone (iPTH) in hemodialysis patients. **Methods:** In a population of 140 hemodialysis patients, bAP and iPTH were determined on four quarterly consecutive occasions. According to the values of iPTH (pg/ml) and bAP (ng/ml), patients were divided into four groups: group I: iPTH >200 and bAP >20, group II: iPTH >200 and bAP <20, group III: iPTH <200 and bAP <20 and group IV: iPTH <200 and bAP >20. Patients with higher serum phosphorus (P) (group A: $P \geq 7$ mg/dl) were compared with those with lower serum P levels (group B: $P < 7$ mg/dl). **Results:** The global correlation between iPTH and bAP (total evaluations, $n = 503$) was 0.32 ($p < 0.001$). Group IV patients tended to show a slight increase of serum aluminum (sAl) levels, which were 12.48

± 5.35 $\mu\text{g/l}$ higher than in the patients from group I (sAl = 9.97 ± 4.39 $\mu\text{g/l}$), group II (sAl = 10.86 ± 4.45 $\mu\text{g/l}$) or group III (sAl = 10.92 ± 3.92 $\mu\text{g/l}$). Significance values (Mann-Whitney) in each group, in comparison with group IV, were the following: group I: 0.004; group II: 0.062; group III: <0.001. Group A ($n = 66$) showed higher iPTH levels than group B ($n = 430$), although bAP and sAl were both similar in these two groups of patients (Mann-Whitney): iPTH (A) = 631.0 ± 487.7 vs. iPTH (B) = 253.3 ± 191.6 , $p < 0.001$; bAP (A) = 22.9 ± 17.4 vs. bAP (B) = 20.4 ± 13.1 , $p = \text{n.s.}$; sAl (A) = 10.2 ± 3.5 vs. sAl (B) = 10.8 ± 4.4 , $p = \text{n.s.}$ For similar Al and bAP values, group A showed a much stronger iPTH/bAP correlation than group B: $r = 0.67$ ($p < 0.001$) vs. $r = 0.30$ ($p < 0.001$), respectively. **Conclusion:** Although iPTH and bAP are frequently in agreement, it seems important to separate parathyroid activity given by iPTH, from bone remodeling reflected by bAP, in the presence of either a higher aluminum exposition or a well-controlled phosphatemia.

Copyright © 2005 S. Karger AG, Basel

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2005 S. Karger AG, Basel
1660-2110/05/1013-0122\$22.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/nec

Dr. Cristina Jorge
Hemodial – Centro de Hemodiálise de Vila Franca de Xira
Quinta da Mina, lote 3, r/c
PT-2600-076 Vila Franca de Xira (Portugal)
Tel. +351 26 3 28 52 60, Fax +351 26 3 27 66 74, E-Mail cristinamjorge@netcabo.pt

Introduction

Chronic renal failure is often accompanied by alterations in bone metabolism, resulting in an imbalance between bone resorption/formation. Situations in which there is an increase in bone resorption include secondary hyperparathyroidism, osteoporosis, mixed bone diseases and β_2 -microglobulin osteoarthropathy. On the other hand, lesions in which bone resorption is usually decreased comprehend aluminum-related low bone turnover, osteomalacia, adynamic osteopathy and extraskel-etal calcifications [1, 2].

Bone biopsy is the only method that allows a correct diagnosis of the underlying bone disease, through the analysis of both static and dynamic histomorphometric parameters. This method however is not always available since there is a relative lack of experienced technicians and laboratory facilities in this field. On the other hand, it is an invasive method, even though its adverse effects are low [2].

Due to all the reasons mentioned, in the majority of patients, inference of the underlying bone pathology is based on biochemical data, of which the most commonly used is plasma iPTH. However, iPTH has limitations: it primarily reflects the activity of parathyroid glands and not necessarily what goes on in the bone; there may be a relative resistance to its action at the cellular level in chronic renal failure; its measurement through the common laboratorial methods may be overevaluated [1–3].

Bone alkaline phosphatase (bAP) has been considered to be the best biochemical marker of bone formation and it was shown to bring additional information in relation to iPTH [1, 3–5]. bAP is part of a family of six alkaline phosphatase isoenzymes, which have been identified so far (hepatic, intestinal, renal, placental and tumoral). Liver, kidney and bone isoforms are coded by the same gene and differ only by post-transcriptional glycosylation. bAP has a molecular weight of 80 kDa and its plasma concentration depends only on its production, by the osteoblasts, and on its hepatic degradation. It is neither filterable by the kidney, nor dialyzable, and so its plasma concentration is not affected by renal failure [2]. bAP appears to be essential to the mineralization of bone and to its formation [6]. In hemodialyzed patients, values of bAP >20 ng/ml have been associated with either the presence of hyperparathyroidism or with high turnover bone disease [4]. Values of bAP <20 ng/ml associated with iPTH <200 pg/ml (or <3 times the superior limit of the laboratory reference value) suggest the presence of adynamic bone disease (ABD). However, studies that used both

bone biopsy results and bAP values in this particular pathology are lacking.

The aim of the present work was to evaluate the usefulness of bAP determination in a population of hemodialyzed patients, by confronting it with iPTH values, in order to get more biochemical information about the underlying bone metabolism.

Patients and Methods

Our sample consisted of a fluctuating population of about 140 chronic renal failure patients undergoing regular hemodialysis, of which 69 were male and 71 were female, with the mean age of 64.12 ± 16.03 years and almost all were Caucasians (10 Black). All patients were dialyzed with polysulfone capillary filters, of either low (conventional hemodialysis) or high permeability (high-flux hemodialysis). Most of the patients were taking calcium carbonate and some were medicated with either oral or intravenous calcitriol at the time of the study. None was medicated with aluminum salts. Also, there were no patients with clinical or laboratorial signs of hepatic disease.

We performed four sequential quarterly predialysis blood samples (total evaluations, $n = 503$) in order to evaluate plasma iPTH, plasma bAP, serum aluminum (sAl), calcemia and phosphatemia. Plasma iPTH was measured through chemoluminescence by using Immulight 2000[®] (DPC, USA). Normal values vary between 12 and 72 pg/ml with this method. Plasma bAP was measured by using a monoclonal antibody method (Ostase[®]). Normal values range from 5.8 to 11.6 ng/ml. sAl was determined by using atomic absorption spectrometry. Plasma calcium and phosphorus were both evaluated through a multichannel autoanalyzer (Hitachi 917[®], Roche, Germany).

The statistical analysis was done using the SPSS 9.0 program. Once the distribution was not normal, the Mann-Whitney test was used to compare parameters in different groups. Spearman's correlation test was used when indicated. Average values are shown and followed by the respective standard deviation in parentheses. Values were considered significant for a $p < 0.05$, except for linear correlations, where significance was considered for a $p < 0.01$.

Results

The correlation between bAP and iPTH was 0.32 ($p < 0.001$) when considering all 503 determinations (fig. 1).

According to the values of both iPTH and bAP, determinations were divided into four groups (table 1). Group I ($n = 113$) included those analyses in which iPTH was >200 pg/ml and bAP was >20 ng/ml. This concordance of normal or elevated iPTH and high bAP could reflect the presence of either a normal bone or a high remodelling bone disease, or at least it suggests that the presence of ABD would be very unlikely. sAl in this group was quite low, being 9.97 $\mu\text{g/l}$ on average. The correlation

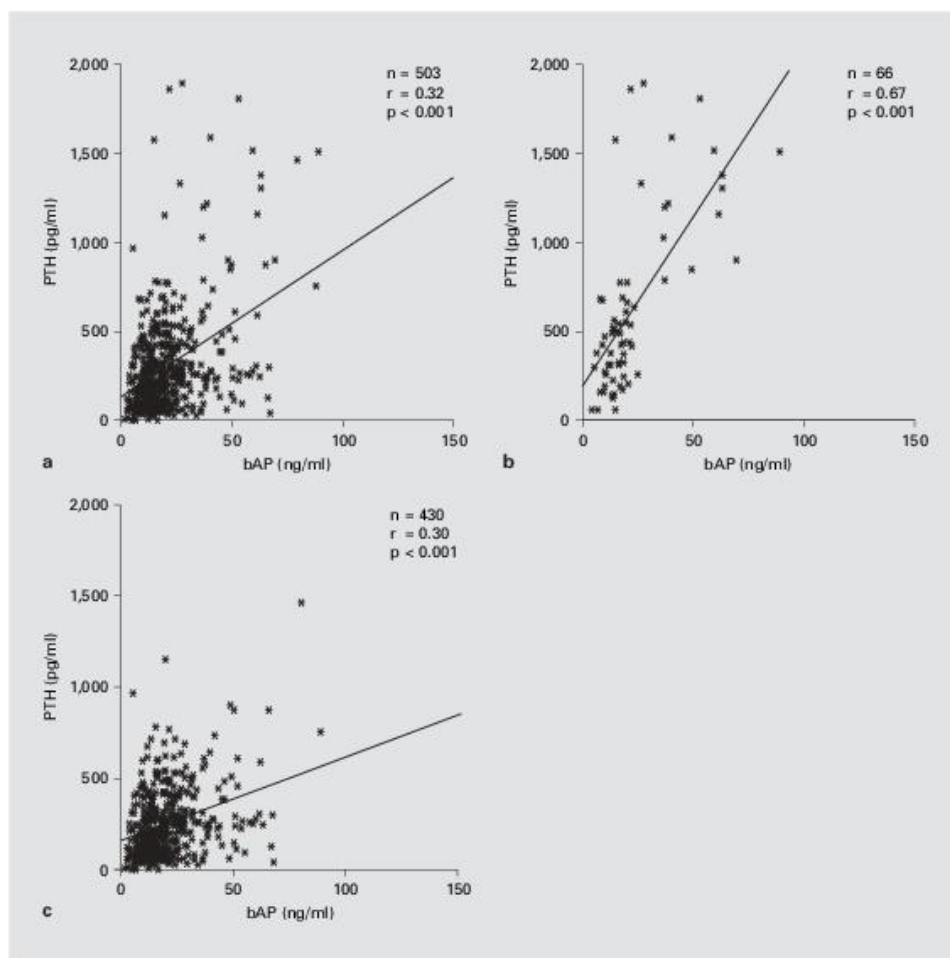


Fig. 1. Correlation between bAP and iPTH (a) in the general group, (b) in group A (phosphatemia ≥ 7 mg/dl), and (c) in group B (phosphatemia < 7 mg/dl).

Table 1. Four groups were created according to the levels of both bAP and iPTH. It is discriminated sAI in each group. Mann-Whitney refers to sAI in each group in comparison with group IV

	n	sAI (\pm SD)	p (Mann-Whitney)
GI (iPTH > 200 and bAP > 20)	113	9.97 \pm 4.39	0.004
GII (iPTH > 200 and bAP < 20)	114	10.86 \pm 4.45	0.062
GIII (iPTH < 200 and bAP < 20)	149	10.92 \pm 3.92	< 0.001
GIV (iPTH < 200 and bAP > 20)	49	12.48 \pm 5.35	

between iPTH and bAP in this group was not significant. Group II ($n = 114$) comprehended determinations in which iPTH was also > 200 pg/ml, but bAP was < 20 ng/ml. Average sAI in this group was $10.86 \mu\text{g/l}$. Group III ($n = 149$), including analysis in which both iPTH (< 200 pg/ml) and bAP (< 20 ng/ml) tended to be low. This could represent the existence of an underlying ABD. sAI in this group was $10.92 \mu\text{g/l}$ on average. As in groups I and II, the correlation between iPTH and bAP in group III was very low and not significant. Finally, group IV

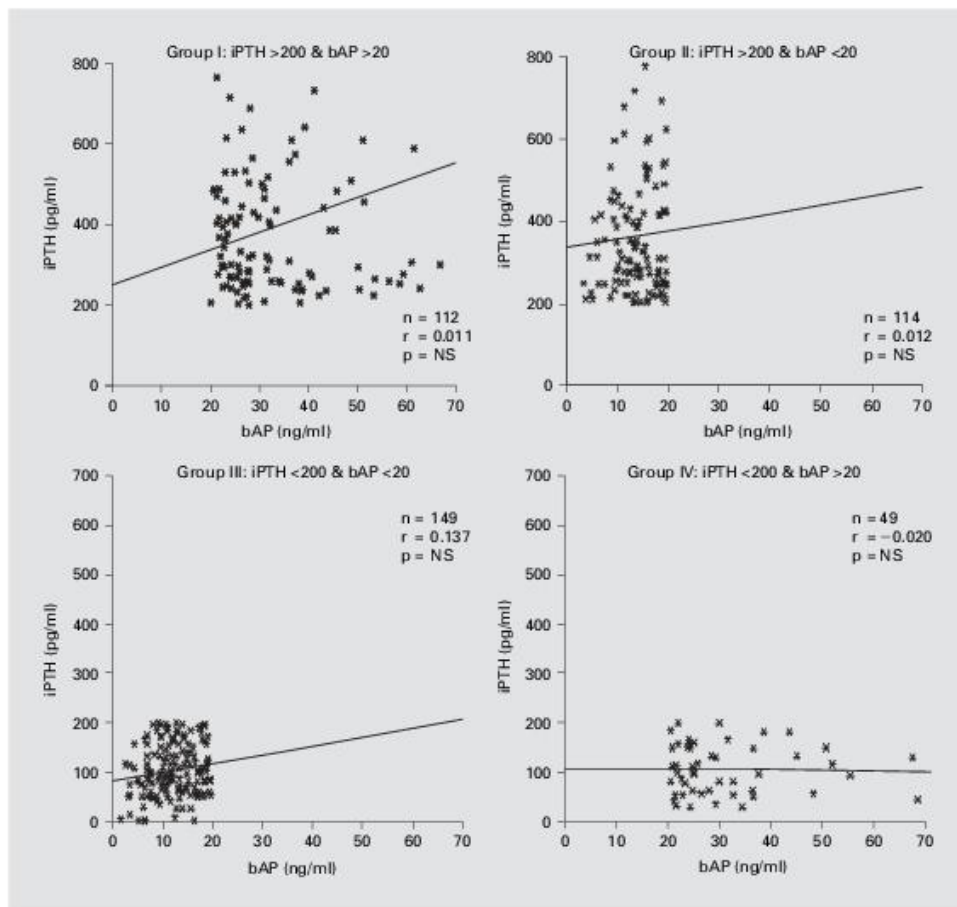


Fig. 2. Correlation between bAP and iPTH in groups I-IV.

represented those determinations in which iPTH was low (<200 pg/ml) and bAP was high (>20 ng/ml). Interestingly, sAI in this group was higher than in the others, being on average 12.48 $\mu\text{g/l}$ (significance values vs. group I were 0.004, vs. group II were 0.062 and vs. group III were <0.001). The correlation between iPTH and bAP was negative in this group ($p = \text{n.s.}$) (fig. 2).

Determinations were also divided according to serum phosphorus levels. Those with serum phosphorus ≥ 7 mg/dl (group A, $n = 66$) showed higher iPTH values than those with a phosphatemia <7 mg/dl (group B, $n = 430$), as expected, although bAP and sAI were both similar in these two groups (table 2). Interestingly, for a similar alu-

minemia and plasma bAP, those evaluations with a serum phosphorus ≥ 7 mg/dl showed a much stronger iPTH/bAP correlation than the others: $r = 0.67$ ($p < 0.001$) vs. $r = 0.30$ ($p < 0.001$).

Discussion

bAP has been shown to be the best marker of bone formation [3, 4]. Several authors have stressed its superiority in relation to iPTH, as we have focused in the introduction above. Indeed there are several works in which both iPTH and bAP were confronted with the histological

Table 2. Phosphatemia, calcemia, plasma iPTH, plasma bAP and sAl in groups A and B. The correlation between iPTH and bAP in each group as well as its statistical significance is also represented

P	n	P, mg/dl	Ca, mg/dl	iPTH, pg/ml	bAP, ng/ml	Al, µg/l	r	p
≥ 7 mg/dl	66	8.13 ± 1.10	9.64 ± 0.91	631.0 ± 487.7	22.93 ± 17.42	10.16 ± 3.46	0.67	<0.001
<7 mg/ml	430	4.17 ± 1.37	9.17 ± 0.81	253.3 ± 191.6	20.44 ± 13.14	10.83 ± 4.40	0.30	<0.001

results of bone biopsies, either in hemodialysis or peritoneal dialysis patients [1, 3–5, 7]. Unfortunately the method used to measure bAP in these different studies was not the same, making it difficult to draw general conclusions. Anyway, we can expect, with a safe degree of confidence, that values of bAP >20 ng/ml (Ostase[®]) in conjunction with values of iPTH >3 times the superior limit of normal (200 pg/ml in this study) formally excludes a low remodelling bone disease, as it was shown by Ureña et al. [4] in 1996. On the other hand, the presence of low values of bAP (<7 or 10 or 12.9 ng/ml Ostase[®], or <27 U/l Isopal[®]) in conjunction with low values of iPTH, is highly suggestive of either a normal bone or of a low remodelling bone disease [1, 3, 4, 7]. Even the presence of high values of iPTH by themselves are not sufficient to safely infer the presence of hyperparathyroidism at the bone level, as it was so clearly shown by Goodman et al. [8]. Indeed these authors have demonstrated that some of the dialysis patients, who were submitted to calcitriol therapy in order to control their high remodelling bone disease, developed ABD, in spite of their relatively high levels of iPTH. In this situation, bAP would more realistically reflect the nature of bone metabolism in those patients.

In our study, the correlation between bAP and iPTH in the general group was lower than in other reports. This stresses the relatively high percentage of measures in which iPTH and bAP were not concordant. It is of note, in this regard, that the same happened in those situations in which plasma phosphorus levels were more controlled, and that constituted the vast majority of our measurements. The contrary was also not surprising: those evaluations with higher plasma phosphorus were the ones in which iPTH and bAP showed the best correlation, reflecting the likely stimulation of parathyroid function by phosphorus, giving rise to a likely high remodelling bone disease, as evaluated by the concordance between bAP and iPTH, which tended to be both elevated in this particular population [9].

It was interesting for us to verify that the patients from group IV (higher bAP and lower iPTH) showed higher

aluminum levels than the other groups. In this context, it is worthy to remember that Lieberherr et al. [10] have shown that low concentrations of aluminum stimulate the activity of osteoblastic-like cells and in this way, bone formation. On the other hand, the inhibiting effect of aluminum on the parathyroid gland is well known. This effect might reflect aluminum action either at the secretion level [11] or at the production level, as Díaz-Corte et al. [12] recently demonstrated. These authors have shown a decrease of mRNA of pre-proPTH in the parathyroid gland of rats with renal failure subjected to an acute aluminum load. What we would find in the bone biopsies of these patients is, in spite of all these considerations, an incognita. Couttenye et al. [3], in a report from a sample of chronic hemodialysis patients, also found out that the high bAP/low iPTH group of patients had higher sAl levels than the other patients, although they used another method of bAP determination. They concluded that aluminum overload decreased the diagnostic performance of a low bAP. A year later, the same group of authors arrived at the same conclusion when they analyzed the biochemical profile of a large sample of the European CAPD population [13]. Interestingly, in this last study, although sAl levels of the low iPTH/high bAP patients were higher than in the other groups, they were still very low levels, quite far from the described toxic limit [14], since the median sAl of the general group was only 5 µg/l. These sAl levels are comparable to the ones we found in the present work.

It was also a surprise to find such a low correlation between iPTH and bAP even in those groups where, by definition, they should be in the 'same range', namely groups I and III. It would have been interesting to compare the histological results of these patients' bone, in which case we might have identified different subgroups according to different levels of activation of osteoblasts and osteoclasts as it is recently being discussed. Indeed, Gal-Moscovici and Popovtzer [15] have recently reported on a new variant of ABD in which there is an increase of reabsorptive activity (traded by the presence of a rela-

tively high number of osteoclasts in the bone biopsy). They pointed to the possible role of β_2 -microglobulin in its etiopathogenesis as well as cytokines like TNF- α , interleukin-1 β or interleukin-6. The patients with this variant, like all the others with ABD, showed low serum iPTH levels. Unfortunately the values of bAP in those patients, compared with the others with typical ABD, were not reported.

In conclusion, although iPTH and bAP are frequently in agreement (what makes bAP determination redundant), it is not always the case. Indeed, in particular cir-

cumstances, it seems important to separate parathyroid activity given by iPTH, from bone remodelling reflected by bAP. According to our results, this separation appears to be prominent in the presence of either a higher aluminium exposition or a well-controlled phosphatemia. Fortunately, the latter condition is becoming more frequent, thanks to both the use of newer phosphorus chelants and to the growing of dialytic efficacy. In this way, we advocate that the measurement of bAP and the biochemical characterization of bone turnover should be more frequently performed.

References

- 1 Coen G, Ballanti P, Bonucci E, Calabria S, Centorrino M, Fassino V, Manni M, Mantella D, Mazzaferro S, Napoletano I, Sardella D, Taggi F: Bone markers in the diagnosis of low turnover osteodystrophy in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:2294-2302.
- 2 Ureña P, Vernejoul MC: Circulating biochemical markers of bone remodeling in uremic patients. *Kidney Int* 1999;55:2141-2156.
- 3 Couttenye M, D'Haese P, Van Hoof V, Lemoniatou E, Goodman W, Verpooten G, De Broe M: Low serum levels of alkaline phosphatase of bone origin: A good marker of adynamic bone disease in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:1065-1072.
- 4 Ureña P, Hruby M, Ferreira A, Ang K, Vernejoul MC: Plasma total versus bone alkaline phosphatase as markers of bone turnover in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:506-512.
- 5 Jarava C, Armas JR, Salgueira M, Palma A: Bone alkaline phosphatase isoenzyme in renal osteodystrophy. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11(suppl 3):43-46.
- 6 Beerisen W, Bos T: Alkaline phosphatase induces the mineralization of sheets of collagen implanted subcutaneously in the rat. *J Clin Invest* 1992;89:1974-1980.
- 7 Fletcher S, Jones R, Rayner H, Harnden P, Hordon L, Aaron J, Oldroyd B, Brownjohn A, Turney J, Smith M: Assessment of renal osteodystrophy in dialysis patients: Use of bone alkaline phosphatase, bone mineral density, and parathyroid ultrasound in comparison with bone histology. *Nephron* 1997;75:412-419.
- 8 Goodman W, Ramirez J, Belin T, Chon Y, Gales B, Segre G, Salusky I: Development of adynamic bone disease in patients with secondary hyperparathyroidism after intermittent calcitriol therapy. *Kidney Int* 1994;46:1160-1166.
- 9 Almaden Y, Hernandez A, Torregrosa V, Canalejo A, Sabate L, Fernandez Cruz L, Campistol JM, Torres A, Rodriguez M: High phosphate level directly stimulates parathyroid hormone secretion and synthesis by human parathyroid tissue in vitro. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:1845-1852.
- 10 Lieberherr M, Grosse B, Coumot-Witmer G, Hermann-Erlee M, Balsan S: Aluminium action on mouse bone cell metabolism and response to PTH and 1,25(OH) $_2$ D $_3$. *Kidney Int* 1987;31:736-743.
- 11 Morrissey J, Rothstein M, Mayor G, Slatopolsky E: Suppression of parathyroid hormone secretion by aluminium. *Kidney Int* 1983;23:699-700.
- 12 Diaz-Corte C, Fernández-Martin JL, Barreto S, Gómez C, Fernández-Coto T, Braga S, Cannata JB: Effect of aluminium load on parathyroid hormone synthesis. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:742-745.
- 13 Couttenye M, D'Haese P, Deng J, Van Hoof V, Verpooten G, De Broe M: High prevalence of adynamic bone disease diagnosed by biochemical markers in a wide sample of the European CAPD population. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:2144-2150.
- 14 De Broe ME, Drücke TB, Ritz E: Diagnosis and treatment of aluminium overload in end-stage renal failure patients. *Nephrol Dial Transplant* 1993;8(suppl 1):1-4.
- 15 Gal-Moscovici A, Popovtzer MM: Parathyroid hormone-independent osteoclastic resorptive bone disease: A new variant of adynamic bone disease in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:620-624.

Após transplantação renal de doentes com HPTH 2º observa-se, frequentemente, uma dissociação entre os níveis da isoforma óssea da fosfatase alcalina e da PTH intacta: em cerca de 80% dos doentes os valores de PTH intacta tendem a diminuir e simultaneamente, no pós-transplante imediato os níveis de isoforma óssea da fosfatase alcalina sofrem elevação (171; 172).

Estas alterações de sentido oposto são semelhantes às que se observam após paratiroidectomias cirúrgicas, durante os quadros designados de “osso faminto”.

3.1.2. Outros marcadores séricos da formação óssea

3.1.2.1. Osteocalcina

A osteocalcina é a proteína não colagénica, mais abundante no osso normal, sendo sintetizada e libertada pelos osteoblastos e pelos odontoblastos, sob controlo metabólico da vitamina D3.

A ativação da osteocalcina depende da respetiva carboxilação a qual tem como co-fator a vitamina K. Por este motivo a deficiência em vitamina K associa-se, frequentemente, a níveis circulantes de osteocalcina reduzidos, os quais conduzem a diminuição da massa óssea e aumento do risco de fraturas (173; 174; 175).

Além da osteocalcina, que promove a mineralização óssea, também a “MGP – *matrix gla protein*” é uma outra proteína dependente da vitamina K, a qual apresenta uma potente ação inibidora da calcificação extra-esquelética, particularmente da calcificação vascular (176).

Por este motivo, a deficiência em vitamina K associa-se, habitualmente, a desmineralização do esqueleto ósseo e a calcificações extra-ósseas, podendo conduzir à denominada “calcificação paradoxal” (176; 177; 178).

Pela mesma razão, os doentes urémicos sujeitos a anticoagulação oral, mediante utilização de antagonistas de vitamina K, apresentam um risco muito aumentado de calcificações extra-ósseas, nomeadamente vasculares, dos tecidos moles e mesmo lesões cutâneas de calcifilaxia (também denominada arteriopatía urémica cálcica) (179; 180; 176; 177).

Os níveis séricos de osteocalcina têm sido, com alguma frequência, utilizados como marcador não invasivo da formação óssea.

No entanto, no doente urémico, a interpretação dos níveis de osteocalcina é particularmente difícil, visto ser uma proteína dependente da remoção renal (181).

Na IRC os resultados dos doseamentos de osteocalcina correspondem, habitualmente, a cerca de 1/3 da molécula intacta. Os restantes 2/3 refletem os fragmentos C-terminal, N-terminal e ainda a região média da osteocalcina (182).

Outra importante limitação à utilização da osteocalcina deve-se à sua deficiente estabilidade (que é muito baixa), dificultando a reprodutibilidade das determinações (182).

E esta limitação não se observa apenas nos doentes urémicos. Mesmo em doentes pós menopausa, com diferentes graus de osteoporose, mas com função renal normal, a osteocalcina mostrou uma sensibilidade significativamente inferior à isoforma óssea da fosfatase alcalina, no diagnóstico do grau de remodelação óssea (183).

Apesar destas limitações muito relevantes, os métodos imunoradiométricos com utilização de anticorpos monoclonais, permitiram otimizar os doseamentos da osteocalcina, ao dosear apenas a proteína intacta e não os diversos fragmentos circulantes (175).

No entanto, e ao contrário do que foi descrito por Garnero e colaboradores (175), mesmo estes imunoensaios com anticorpos monoclonais doseiam 3 moléculas diferentes: a osteocalcina intacta, a osteocalcina carboxilada e a osteocalcina descarboxilada (182).

Na nossa investigação clínica, a osteocalcina permitiu a diferenciação entre doença óssea de elevada remodelação versus remodelação normal/baixa (184). Para além dos níveis séricos de osteocalcina estarem significativamente aumentados nos

nostros doentes hemodialisados, em comparação com os valores de referência para a população não urêmica, identificámos valores de osteocalcina significativamente mais elevados nos doentes com remodelação óssea estimulada.

Os doentes com histologia óssea evidenciando osso com elevada remodelação, em comparação com os doentes que apresentavam remodelação óssea normal ou osso adinâmico, apresentavam níveis séricos significativamente mais elevados de osteocalcina: 555 ± 423 ng/mL versus 198 ± 261 ng/mL.

No entanto, esta diferença nos níveis de osteocalcina não permitiu separar a formação óssea da reabsorção óssea, visto que, a osteocalcina tanto se correlacionou com parâmetros de formação (fosfatase alcalina óssea; $r=0,90$; $p=0,0001$) como de reabsorção óssea (piridinolina sérica, que discutiremos abaixo; $r=0,73$; $p=0,0001$) (184).

Morishita e colaboradores, com base nas biopsias ósseas de 62 hemodialisados, definiram como limiar ótimo para distinguir doença adinâmica de lesão mista, os seguintes valores: PTH intacta 195 pg/ml e osteocalcina 30 ng/ml. No mesmo estudo foram identificados os limiares de 455 pg/ml para a PTH intacta e de 50 ng/ml para a osteocalcina intacta, para permitir o diagnóstico diferencial entre HPTH 2º severo e doença óssea de elevada remodelação, mas de grau moderado (185).

3.1.2.2. Propeptido carboxiterminal do procolagénio tipo I - PICP

O propeptido carboxiterminal do procolagénio tipo I (PICP) tem um peso molecular de aproximadamente 100.000 Dalton, tendo sido utilizado por diversos autores como marcador da formação óssea, visto resultar diretamente da atividade osteoblástica (186).

O PICP é um pré-produto da molécula terminal de colagénio tipo I, o qual representa mais de 90% das proteínas da matriz óssea.

Os níveis plasmáticos de PICP são determinados mediante a utilização de anticorpos monoclonais específicos (187; 188).

Em doentes com IRC, em fases pré dialítica, o PICP correlacionou-se com os parâmetros histomorfométricos dinâmicos. No entanto, esta correlação não se observou com os parâmetros estáticos, nem com outros marcadores não invasivos da formação óssea acima referidos (189).

Na nossa experiência, observámos níveis aumentados de PICP, nos doentes hemodialisados, mas sem relação estatisticamente significativa com nenhum parâmetro histomorfométrico (184), o que está de acordo com as observações previamente descritas por Mazaferro e colaboradores (190).

Em doentes hemodialisados, a interpretação dos níveis plasmáticos de PICP é difícil, e frequentemente apresenta resultados contraditórios com outros marcadores não invasivos.

Hamdy e colaboradores descreveram níveis de PICP como inapropriadamente elevados em 18 doentes com sobrecarga alumínica (191).

No entanto, se tivermos em conta os efeitos opostos da intoxicação alumínica, sobre os níveis circulantes da isoforma óssea da fosfatase alcalina e da PTH intacta, (estimulando a primeira e inibindo a segunda, como previamente discutido), esta aparente discrepância pode ter uma justificação fisiopatológica.

3.1.3. Piridinolina, desoxipiridinolina e reabsorção óssea (manuscrito 6)

Durante o processo de reabsorção óssea, a degradação do colagénio levada a cabo pela ação osteoclástica, induz a libertação de diversas moléculas, nomeadamente das que têm uma função de estabilização do colagénio tipo I, através duma ação de “pontagem”.

Destas moléculas de “pontagem” (“*cross-link*”), as mais relevantes são a piridinolina (PYD ou *hidroxilisilpiridinium*) e a desoxipiridinolina (DPYD ou *lisilpiridinium*), as quais se libertam do osso, em função do grau de reabsorção óssea, observada em diversas situações clínicas (192).

A excreção urinária de PYD e de DPYD, em indivíduos com função renal normal, correlacionou-se diretamente com a reabsorção óssea, na osteoporose pós menopausa (193), no hiperparatiroidismo primário (194), em crianças com deficiente nutrição (195), na doença de Paget (196), e ainda na hipercalcemia associada a tumores malignos (197).

A correlação entre os níveis urinários de PYD e de DPD é superior a 0,98, apesar de a primeira se encontrar no osso e na cartilagem ao contrário da última que tem exclusivamente origem óssea.

Estes fragmentos do colagénio tipo I são dialisados, encontrando-se aumentados no dialisante recolhido ao longo da sessão de hemodiálise ou no líquido de drenagem da diálise peritoneal (198).

O método inicial e mais difundido, para a quantificação destas moléculas, foi a cromatografia líquida de alta eficácia, urinária ou sérica (198).

Tivemos a oportunidade de quantificar, pela primeira vez em doentes urémicos, os níveis de PYR séricos, utilizando um imunoensaio enzimático (184).

A relevância do nosso estudo deveu-se à validação deste método de doseamento da PYR em hemodialisados anúricos, tendo-se registado uma elevada reprodutibilidade de resultados intra-ensaio e inter-ensaio.

Utilizámos um anticorpo policlonal contra a piridinolina sérica livre, desenvolvido pela Metra Biosystems, Inc (Palo Alto, CA) (199).

Os nossos resultados demonstram que a PYR pode ser doseada nos doentes hemodialisados, que os seus níveis séricos estão muito aumentados nestes doentes (quando comparados com uma população normal) e que níveis mais elevados de PYR se associaram a maior remodelação óssea.

Neste estudo comparámos os níveis séricos da PYR com os níveis séricos de outros marcadores bioquímicos da remodelação óssea, e ainda com os parâmetros histomorfométricos estáticos e dinâmicos das biopsias ósseas de osso não descalcificado, efetuadas em 37 doentes hemodialisados (184).

Verificámos que a PYR se correlacionou significativamente melhor com a reabsorção óssea do que a iPTH ou que a osteocalcina.

De particular relevância foram as correlações positivas dos níveis séricos da PYR com a superfície osteoclástica (Ocl.S/BS) e com o número de osteoclastos por mm^2 (Ocl.n/ mm^2) (184).

Serum Pyridinoline as a Specific Marker of Collagen Breakdown and Bone Metabolism in Hemodialysis Patients

PABLO UREÑA,¹ ANÍBAL FERREIRA,^{1,2} VIOLA T. KUNG,³ CAROLINE MORIEUX,²
PIERRE SIMON,⁴ KIM S. ANG,⁴ JEAN CLAUDE SOUBERBIELLE,¹ GINO V. SEGRE,⁵
TILMAN B. DRÜEKE,¹ and MARIE CHRISTINE DE VERNEJOL²

ABSTRACT

Type I collagen represents more than 90% of bone matrix. Quantitative analysis of collagen cross-link molecules such as pyridinoline (PYD) provides valuable information on bone resorption rate. We have studied 37 hemodialysis patients who underwent a systematic transiliac bone biopsy for histomorphometry study. Eighteen of them had tetracycline double labeling, allowing to determine dynamic, in addition to static bone parameters. Measurement of serum-free PYD was performed using a new competitive enzyme immunoassay. Serum PYD values were compared with those of three other serum markers of bone metabolism, namely intact PTH (iPTH), bone-specific alkaline phosphatase (bAP), and osteocalcin, for the correlations with bone histomorphometric parameters. Serum PYD levels (mean \pm SD) were significantly higher in dialysis patients than in normal individuals, 90.6 ± 99.6 nM versus 1.9 ± 0.4 nM, respectively. Patients with high turnover bone disease had significantly higher serum PYD levels than patients with normal or low bone turnover, 108.8 ± 108.0 nM versus 34.1 ± 12.8 nM, respectively. Serum PYD levels were positively correlated with bone resorption parameters including osteoclast surface ($r = 0.59$, $p < 0.0001$) and osteoclast number/mm² ($r = 0.61$, $p < 0.0001$), and also with bone formation parameters, osteoblast surface ($r = 0.43$, $p < 0.008$), double-labeled surface ($r = 0.81$, $p < 0.001$), and BFR ($r = 0.91$, $p < 0.0001$). The BFR was better correlated with serum PYD levels than with either serum iPTH or osteocalcin concentrations. However, correlation with serum bAP was comparable. Serum cross-linked type I carboxy-terminal telopeptide (ICTP) and type I carboxy-terminal extension peptide (PICP) levels were also significantly increased in both groups of dialysis patients but they did not correlate with any of the bone turnover parameters. In conclusion, PYD, which is a specific serum marker of collagen breakdown, provides valuable information on bone turnover in hemodialysis patients.

INTRODUCTION

CHRONIC RENAL FAILURE is often associated with bone disorders including secondary hyperparathyroidism, aluminum-related low turnover bone disease,⁽¹⁾ osteomalacia,⁽²⁾ adynamic osteopathy,⁽³⁾ and β 2-microglobulin bone deposition.^(4,5) The distinction between high and low bone turnover diseases in these patients frequently requires invasive

and/or costly methods such as bone histomorphometry after double tetracycline labeling,⁽¹⁾ scintigraphic-scan studies,⁽⁶⁾ computed tomography,^(7,8) and kinetic studies using either radiolabeled bisphosphonate or calcium.^(9,10) During the past few years, several enzymes and matrix proteins synthesized by osteoblasts and protein fragments released after bone matrix breakdown have been proposed as serum biochemical markers of bone formation and bone resorption rates.

¹Département de Néphrologie, INSERM Unité 90, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France.

²INSERM Unité 349, Hôpital Lariboisière, Paris, France.

³Metra Biosystems, Inc., Palo Alto, California.

⁴Service de Néphrologie, Centre Hospitalier de Saint-Brieuc, France.

⁵Endocrine Unit, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts.

Among these proteins, type I collagen, which represents 85–90% of the bone protein matrix, has been studied most often. During bone resorption, bone collagen is degraded by specific osteoclast-related enzymes. This results in the release of several collagen cross-links into the circulation which are subsequently excreted in the urine.^(11,12) Quantitative analysis of collagen cross-link molecules, in particular pyridinoline (PYD) and deoxypyridinoline (DPD) provides valuable information on the bone resorption rate. Recent studies in individuals with normal renal function have demonstrated that the urinary excretion of collagen cross-link molecules is an excellent index of the bone resorption rate in osteoporotic and in postmenopausal women,^(12,13) patients with primary hyperparathyroidism,⁽¹⁴⁾ malnourished children,⁽¹⁵⁾ patients with Paget's disease,^(16,17) and in patients with tumor-associated hypercalcemia.⁽¹⁸⁾

In the present study, we measured serum PYD in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis who underwent a transiliac bone biopsy in order to determine its potential value as a humoral marker of collagen breakdown and bone remodeling. Serum PYD levels were measured in such patients for the first time using a new competitive enzyme immunoassay.⁽¹⁹⁾ They were compared with three other available serum markers of bone metabolism to evaluate their relative value in the diagnosis of bone disease in hemodialysis patients.

METHODS

Patients

Thirty-seven adult uremic patients (15 females and 22 males) on maintenance hemodialysis were included in the present study after their informed consent was given. Their mean (\pm SD) age was 58 ± 13 . The mean duration of hemodialysis treatment was 7.3 ± 5.2 years. All the patients were treated by conventional bicarbonate hemodialysis 4–5 hr three times a week. Nine patients were hemodialyzed with standard cellulose dialysis membrane and 28 with high-flux synthetic hemodialysis membrane. Underlying nephropathy types were: nephrosclerosis 4, interstitial nephropathy 13, polycystic kidney disease 4, chronic glomerulonephritis 12, diabetic nephropathy 1, and unknown 3. All patients were oligoanuric (≤ 200 ml/24 hr). Serum levels of hepatic enzymes, SGPT, and SGOT were within the limits of normal values in all patients. At the time of study, most of the patients had received either calcitriol or phosphate binding therapy for different periods of time. None of them had received other bone affecting treatments such as corticosteroids, steroids, calcitonin, or bisphosphonates. Twenty-eight patients had clinical and biological signs of secondary hyperparathyroidism. There was no evidence for other bone disease such as osteomalacia, aluminum-related bone disease, Paget's disease, and severe osteoporosis.

Biochemistry

Predialysis blood sampling was performed after a 12-hr fast 1–2 weeks before the bone biopsy. Serum calcium was

determined using atomic absorption spectrometry, serum phosphorus using a Technicon Auto Analyzer. Serum aluminum (Al) was determined using atomic absorption spectrometry with a graphite oven. Serum intact PTH (iPTH) was measured using a commercial radioimmunoassay for intact human PTH 1–84 (Allegro Intact PTH; Nichols Institute, San Juan Capistrano, CA). The range of normal values was 10–65 pg/ml. Serum total alkaline phosphatases (Alk P'tases) were measured by an automated method (normal values, 30–90 IU/l). Serum bone-specific alkaline phosphatase (bAP) was measured using a radioimmunoassay (Tandem-R, Ostase) provided by Hybritech Europe S.A., Belgium.⁽²⁰⁾ The mean \pm SD value obtained in normal adult individuals was 11.8 ± 4.3 μ g/l. Serum osteocalcin was measured using a radioimmunoassay from Cis Bio International (ELSA-OSTEO, Gifs/Yvette, France). This IRMA assay utilizes human osteocalcin as standards and two monoclonal antibodies recognizing at the same time the intact molecule and the central N-terminal fragment (1–43).⁽²¹⁾ The range of values in normal adult individuals is between 13.3 and 48.0 ng/ml.⁽²¹⁾

Serum procollagen type I carboxy-terminal extension peptide (PICP) was measured using a radioimmunoassay kit from Orion Diagnostica (Espoo, Finland). The detection limit of the assay was 1.2 ng/ml. The reference interval (mean \pm SD) for men and women was 38–202 μ g/l with no apparent correlation with age. Serum pyridinoline cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen (ICTP) was measured using a radioimmunoassay kit from Orion Diagnostica, Finland. The reference interval (mean \pm SD) for healthy adults was 1.8–5.0 μ g/l.

Serum free pyridinoline was measured using a competitive enzyme immunoassay recently developed by Metra Biosystems, Inc. (Palo Alto, CA), which utilizes a modified procedure previously described by Seyedin et al.^(19,22) This immunoassay uses a sensitive rabbit polyclonal antibody against free PYD and measures free PYD in the serum. Microtiter plates are coated with PYD antigen. Twenty-five microliters of serum sample or PYD standards are added to each well of the microplate, followed by the addition of 125 μ l of anti-PYD antibody. The plate is then incubated overnight at 4°C. After the unbound materials are washed off, alkaline phosphatase-conjugated rabbit anti-IgG is added to the well and incubated at room temperature for 1 hr. After washing the plate, p-nitrophenyl phosphate substrate is added, and the color is developed at room temperature for 1 hr. The absorbance at 405 nm wavelength is determined, and the PYD concentration in the unknown sample is quantitated against a standard curve. The PYD antibody has less than 3% of cross-reactivity against DPD or larger pyridinoline peptides (>1000 D). The intraassay and interassay variations were less than 10 and 15%, respectively. There was no significant diurnal variation of serum PYD concentrations in the serum of 6 healthy individuals. The average variation of serum PYD measured every 2 hr during 24 hr was of 8.9%, with a range from 5.7 to 12.0%. Mean \pm SD in normal individuals was 1.9 ± 0.4 nM.⁽¹⁹⁾

Bone biopsy and bone histomorphometry

Transiliac bone biopsies using the trephine of Bordier-Meunier with an internal diameter of 8 mm were obtained in 37 patients. In 18 patients the bone biopsy was performed after tetracycline double labeling (2 days on, 10 days off, 2 days on with 600 mg dimethylchlortetracycline/day). The bone specimens were fixed for 24 hr in methanol, dehydrated, and embedded in methylmethacrylate. Undecalcified sections of 5 μm thickness were made using a microtome (Model Jung K, Heidelberg, Germany) equipped with a tungsten carbide knife. Three nonconsecutive sections were stained with Toluidine blue and two with a specific histochemical stain for detection of aluminum in bone (aurin tricarboxylic acid method). Two unstained sections (7 μm thick) were prepared for fluorescence microscopy. Each bone section was read in duplicate, by two different persons, without any knowledge of clinical or biochemical information of the patients. All sections were analyzed quantitatively for static and dynamic parameters of bone formation and bone resorption. Histomorphometric measures were carried out using a semiautomatic image analyzer (Biocom, Les Ulis, France) coupled with a Leitz microscope. Approximately 50 different fields were analyzed for the same bone biopsy. Normal bone histomorphometric values are from de Vernejoul, et al.⁽²³⁾ The following bone histomorphometric parameters, expressed according to the standardized nomenclature,⁽²⁴⁾ were measured in trabecular bone: trabecular bone volume (BV/TV) expressed as the percent of trabecular space; osteoid volume (OV/BV) expressed as the percent of trabecular bone volume; osteoid surface (OS/BV) expressed as the percent of trabecular bone surface; osteoblastic surface (Obl.S/BS) expressed as the osteoid surface covered with plump osteoblasts and expressed as the percent of trabecular bone surface; osteoid thickness (O.Th) expressed in micrometers; osteoclast surface (Ocl.S/BS) defined as the fraction of trabecular bone surface covered with osteoclasts; osteoclast number (Ocl.n) per mm^2 of tissue section; and aluminum surface (Al.S/BS) defined as the fraction of trabecular bone surface covered by aluminum. The bone dynamic parameters considered were: double labeled surface (d.Lab.S/BS) expressed as the fraction of trabecular bone surface; mineralizing surface (MS/BS) defined as the total extent of double label plus half of the extent of single label and expressed as the fraction of the bone surface; mineral appositional rate (MAR) expressed as $\mu\text{m}/\text{day}$; adjusted apposition rate (Aj.AR) ($\mu\text{m}/\text{day}$); and bone formation rate (BFR) ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$), calculated as the mineralization apposition rate multiplied by total labeled surfaces.

Patients were separated into two groups according to the type of bone disease. High turnover bone disease (HTBD) is defined as a BFR 2 SD higher than the normal value ($0.07 \pm 0.02 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$), and normal or low turnover bone disease (N/LTBD) is defined as a BFR in the normal range or lower. In the cases without dynamic bone parameters, HTBD was diagnosed for Obl.S/BS $\geq 6.0\%$, and Ocl.n ≥ 0.8 per mm^2 .⁽²³⁾

TABLE 1. SERUM BIOCHEMICAL DATA IN THE WHOLE GROUP OF HEMODIALYSIS PATIENTS

Substance	Patients	n	Normal range
Total calcium (mM)	2.56 \pm 0.30	37	2.25–2.55
Phosphorus (mM)	2.05 \pm 0.56	37	0.80–1.55
Intact PTH (pg/ml)	653 \pm 683	35	10–65
Total alkaline phosphatases (IU/l)	255 \pm 203	37	30–90
Bone alkaline phosphatase (ng/ml)	55.1 \pm 60.9	36	7.5–16.0
Osteocalcin (ng/ml)	451 \pm 413	31	13.8–48.0
ICTP ($\mu\text{g}/\text{l}$)	36 \pm 14	17	1.8–5.0
PICP ($\mu\text{g}/\text{l}$)	240 \pm 105	33	38–202
Pyridinoline (nM)	90.6 \pm 99.6	37	1.5–2.3
Aluminum (μM)	1.26 \pm 0.78	30	0.05–0.10

Abbreviations are: PICP, procollagen type I carboxy-terminal extension peptide; ICTP, pyridinoline cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen.

Statistical analysis

All results are given as the means \pm SD. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA test), or unpaired Student's *t* test as appropriate. The significance of the magnitude of correlation coefficients between biochemical and bone histological parameters were assessed by linear regression analysis. Significance levels are indicated in table and figure legends.

RESULTS*Biochemistry*

Table 1 shows the results of serum biochemical parameters measured in the group of hemodialysis patients and compared with normal values. Serum iPTH levels were 11 times higher in uremic patients than the upper range of normal. Likewise, serum total and bAP as well as osteocalcin were significantly increased in uremic patients. Mean serum PYD level was significantly higher in dialysis patients than in normal individuals, 90.6 ± 99.6 nM versus 1.9 ± 0.4 nM, respectively (Table 1, Fig. 1). There was no statistically significant difference between patients dialyzed on synthetic high-flux or standard cellulosic dialysis membrane, 90.9 ± 109.7 nM versus 89.7 ± 63.8 nM, respectively. Both ICTP and PICP levels were also significantly increased in the serum of dialysis patients.

Table 2 shows the comparison of these serum parameters between patients with HTBD and patients with normal or LTBD. No significant difference was observed for the serum levels of total calcium, phosphorus, ICTP, or PICP between the two groups. However, iPTH and osteocalcin were significantly higher in the group of patients with HTBD than in the group with LTBD, 831 ± 707 pg/ml and 555 ± 423 ng/ml versus 142 ± 150 pg/ml and 198 ± 261 ng/ml, respectively. Serum PYD levels were 3-fold higher in

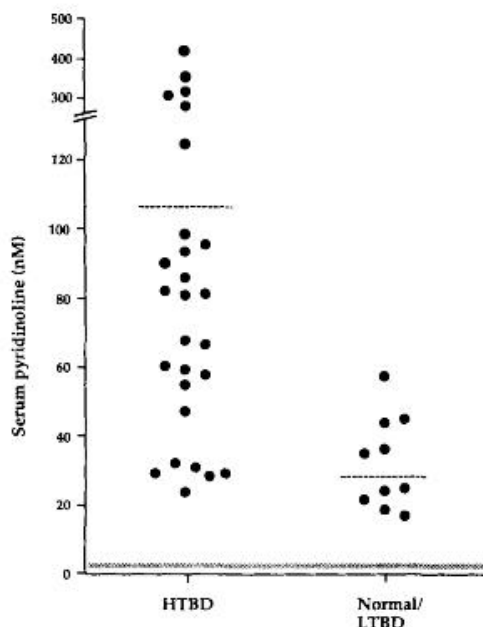


FIG. 1. Serum free pyridinoline levels in 37 hemodialysis patients. The mean \pm SD value in patients with high turnover bone disease (HTBD) was 109 ± 108 nM and 34 ± 13 nM in patients with normal or low turnover bone disease (LTBD). The stippled zone represents the range of normal values.

patients with HTBD than in those with LTBD, 108.8 ± 108.0 nM versus 34.1 ± 12.8 nM (Fig. 1). However, 5 out of 10 patients with LTBD presented serum PYD levels comparable to those of patients with HTBD, suggesting that PYD could be released from a source other than bone

collagen. Bone AP was also significantly increased in patients with HTBD, as was serum aluminum.

Bone histomorphometry

The mean \pm SD values of histomorphometric parameters in hemodialysis patients with high and low turnover bone disease are shown in Table 3. The BFR in the first group of dialysis patients was $0.34 \pm 0.24 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$, confirming the diagnosis of HTBD, versus $0.05 \pm 0.06 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$ in patients with normal or LTBD. Patients with HTBD had a marked increase of bone resorption, as assessed by the increase in osteoclast number (Ocl.n/mm²) and in the trabecular surfaces covered by active osteoclasts (Ocl.S/BS), without any significant perturbation of bone mineralization. In addition, both bone formation and bone resorption were well coupled in these patients as assessed by the correlation between Obl.S/BS (%) and Ocl.S/BS (%) ($r = 0.79, p < 0.0001$). There was no significant difference in the percentage of bone surface stained by aluminum between the two groups.

Correlations

Table 4 shows the correlations between serum PYD levels and humoral and bone histomorphometric parameters in all dialysis patients. Serum PYD was positively correlated with serum total and bAP, iPTH, and osteocalcin. However, it did not correlate with any of the two collagen type 1-related proteins studied, PICP and ICTP. Tables 4 and 5 show the correlations of serum PYD levels with bone histomorphometric parameters and their comparison with those of serum bAP, iPTH, and osteocalcin. Serum PYD levels were positively correlated with bone resorption parameters including Ocl.S/BS ($r = 0.59, p < 0.0001$) and Ocl.n/mm² ($r = 0.61, p < 0.0001$) (Figs. 2A and 3A), and also with bone formation parameters: Obl.S/BS ($r = 0.43, p < 0.008$), and BFR ($r = 0.91, p < 0.0001$). The exclusion of five dialysis patients with serum PYD levels 2 SD higher than the mean

TABLE 2. SERUM BIOCHEMICAL DATA IN HEMODIALYSIS PATIENTS WITH EITHER HIGH OR NORMAL/LOW BONE TURNOVER

Substance	High turnover	n	Normal or low turnover	n	p
Total calcium (mM)	2.62 ± 0.26	27	2.44 ± 0.33	10	NS
Phosphorus (mM)	2.17 ± 0.49	27	1.84 ± 0.63	10	NS
Intact PTH (pg/ml)	831 ± 707	26	142 ± 150	9	0.007
Total Alk P'tases (IU/l)	282 ± 224	27	171 ± 78	10	NS
Bone Alk P'tase (ng/ml)	69.8 ± 63.9	27	10.7 ± 4.4	9	0.009
Osteocalcin (ng/ml)	555 ± 423	22	198 ± 261	9	0.02
ICTP ($\mu\text{g/l}$)	33.2 ± 16.6	11	40.1 ± 5.9	6	NS
PICP ($\mu\text{g/l}$)	254 ± 118	24	200 ± 33.0	9	NS
Pyridinoline (nM)	109 ± 108	27	34.1 ± 12.8	10	0.04
Aluminum (μM)	1.48 ± 0.72	22	0.67 ± 0.61	8	0.009

Abbreviations are: PICP, procollagen type I carboxy-terminal extension peptide; ICTP, pyridinoline cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen. High turnover, patients with a BFR 2 SD higher than the normal value, and low turnover, when the BFR was in the normal range or lower. Values are expressed as mean \pm SD.

TABLE 3. BONE HISTOMORPHOMETRIC DATA IN HEMODIALYSIS PATIENTS WITH EITHER HIGH OR NORMAL/LOW BONE TURNOVER

Parameter	High turnover (n = 27)	Normal or low turnover (n = 10)	p
BV/TV (%)	19.7 ± 7.8	12.7 ± 9.2	0.02
OV/BV (%)	14.8 ± 7.6	3.3 ± 4.0	0.003
OS/BS (%)	57.8 ± 14.5	28.2 ± 23.2	0.0001
Obl.S/BS (%)	17.0 ± 11.5	2.4 ± 1.6	0.0006
O.Th (μm)	12.07 ± 5.12	8.91 ± 9.54	NS
Ocl.S/BS (%)	3.26 ± 1.78	0.71 ± 0.72	0.0002
Ocl.n/mm ²	2.26 ± 1.29	0.35 ± 0.34	0.0001
Al S/BS (%)	15.26 ± 20.75	20.75 ± 26.95	NS
d.Lab.S/BS (%)	8.65 ± 6.67	1.54 ± 1.87	0.09
MS/BS (%)	26.56 ± 15.13	6.60 ± 6.03	0.006
MAR (μm/day)	1.39 ± 0.38	0.44 ± 0.40	0.001
Aj.AR (μm/day)	0.56 ± 0.32	0.20 ± 0.23	0.01
BFR (μm ³ /μm ² /day)	0.34 ± 0.24	0.05 ± 0.06	0.01

High turnover bone disease (HTBD), patients with a BFR 2 SD higher than the normal value, and normal or low turnover bone disease (N/LTBD), when the BFR was in the normal range or lower. In the cases without dynamic bone parameters, HTBD was diagnosed for Obl.S/BS ≥ 6.0%, and Ocl.n ≥ 0.8/mm². Dynamic bone parameters were available for 18 patients, 15 with HTBD and 3 with N/LTBD. Values are expressed as mean ± SD.

TABLE 4. CORRELATIONS BETWEEN SERUM PYRIDINOLINE AND HUMORAL AND BONE HISTOMORPHOMETRIC PARAMETERS

	r	n	p
<i>Serum pyridinoline versus humoral parameters</i>			
Total alkaline phosphatases	0.92	37	.0001
Bone alkaline phosphatase	0.90	36	.0001
Intact PTH	0.63	35	.0001
PICP	0.14	33	NS
ICTP	0.22	17	NS
Osteocalcin	0.73	31	.0001
<i>Serum pyridinoline versus histomorphometric parameters</i>			
BV/TV (%)	0.34	37	.04
OV/BV (%)	0.77	37	.0001
OS/BS (%)	0.51	37	.001
Obl.S/BS (%)	0.43	37	.008
Ocl.S/BS (%)	0.59	37	.0001
Ocl.n/mm ²	0.61	37	.0001
O.Th (μm)	0.50	35	.002
d.Lab.S/BS (%)	0.81	18	.001
MS/BS (%)	0.57	18	.01
Aj.AR (μm/day)	0.87	18	.0001
BFR (μm ³ /μm ² /day)	0.91	18	.0001

values did not modify these correlations (Figs. 2B and 3B). The BFR was better correlated with serum PYD than with either serum iPTH or osteocalcin concentrations. In addition, serum intact PTH, and bAP levels were similarly well correlated with both bone formation and bone resorption parameters (Table 5). The good correlation of serum PYD levels with osteoclast surface and osteoclast number was

similar in both groups of patients, HTBD and LTBD. Interestingly, serum bAP levels were as well correlated with these histomorphometric bone remodeling parameters as serum PYD levels.

DISCUSSION

Pyridinium crosslinks are markers of type I and II collagen breakdown. Two main molecules have been defined, namely PYD (hydroxylslypyridinium or HP) and DPD (lysylpyridinium or LP), which are predominantly present in both bone and cartilage, with the exception that most of the pyridinium cross-links found in the cartilage is in the form of PYD.⁽²⁵⁾ The urinary excretion of both PYD and DPD has been shown to serve as an excellent marker of the bone resorption rate in malnourished children,⁽¹⁵⁾ osteoporotic and postmenopausal women,^(12,13) patients with primary hyperparathyroidism,⁽¹⁴⁾ rheumatoid arthritis and osteoarthritis⁽²⁶⁾ or Paget's disease,^(16,17) and in patients with tumor-associated hypercalcemia.⁽¹⁸⁾

The present study demonstrates first that serum PYD concentrations can be reliably measured with an accurate competitive enzyme immunoassay and that serum PYD can be used as another humoral marker of bone metabolism in dialysis patients. Second, hemodialysis patients had markedly increased serum PYD levels compared with normal individuals. High serum PYD levels were generally associated with HTBD. Third, serum PYD levels were positively correlated with bone resorption and bone formation parameters. These correlations were comparable to those found between serum bAP and bone histomorphometric parameters. However, serum PYD was correlated significantly better than either serum iPTH or osteocalcin.

TABLE 5. CORRELATIONS OF FOUR HUMORAL BONE PARAMETERS WITH BONE HISTOMORPHOMETRIC PARAMETERS

Parameters	PTH	Pyridinoline	Bone alkaline phosphatase	Osteocalcin
BV/TV (%)	0.51	0.34	0.56	0.29*
OV/BV (%)	0.72	0.77	0.76	0.71
OS/BS (%)	0.46	0.51	0.58	0.39
Obl.S/BS (%)	0.54	0.43	0.51	0.48
Ocl.S/BS (%)	0.46	0.59	0.59	0.44
Ocl.n/mm ²	0.51	0.61	0.51	0.70
O.Th (μm)	0.46	0.50	0.53	0.32*
d.Lab.S/BS (%)	0.77	0.81	0.82	0.91
MS/BS (%)	0.38*	0.57	0.50	0.29*
MAR (μm/day)	0.58	0.71	0.72	0.50*
Aj.TAR (μm/day)	0.65	0.87	0.87	0.61
BFR (μm ³ /μm ² /day)	0.67	0.91	0.92	0.67

*No statistical significance.

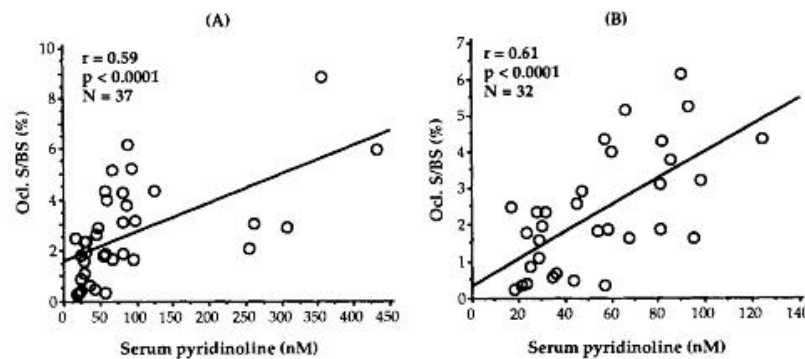


FIG. 2. Correlation between serum-free pyridinoline and osteoclast surface (Ocl.S/BS). For all patients (A) and without 5 patients with serum PYD and iPTH 2 SD higher than the mean value (B).

Unfortunately, there is no information so far concerning the metabolism of PYD in uremic patients. However, given that PYD is not metabolized because it results from a post-translational modification of collagen molecules already incorporated into the extracellular matrix and cannot be reutilized during collagen synthesis,^(27,28) that diet-derived PYD is not absorbed from the intestine, and that most of the PYD molecules are normally excreted into the urine,⁽¹⁵⁾ one can assume that its marked increase in the dialysis patients of the present study was in part due to the failure of the diseased kidneys to excrete PYD and its subsequent retention in the circulation, similar to many other molecules such as β2-microglobulin and guanidines.⁽²⁹⁾ In keeping with this, no difference was observed in serum PYD levels between patients dialyzed on high-flux or standard cellulose dialysis membrane, which may indicate that the type of dialysis membrane would not have a major influence on serum PYD levels.

As mentioned earlier, high serum PYD levels were gen-

erally associated with HTBD. However, in the case of LTBD, 5 patients had serum PYD levels particularly increased, suggesting that PYD could be released either from degraded bone collagen independent of osteoclast-mediated bone resorption, or from sources other than bone, such as cartilage, tendons, ligaments, aorta, skin, or muscles.⁽¹⁵⁾ It seems unlikely that a hypothetical amount of PYD released by vessels, muscles, or skin could be responsible for the increase in serum PYD levels in these 4 patients since none of them had signs of vascular, muscular, or skin disease. It is possible that PYD released through degradation of cartilage could explain the elevated serum PYD levels in at least 2 of these 4 patients who had histologically proven β2-microglobulin amyloid-related arthropathy.⁽²⁶⁾ However, the hypothesis of increased bone collagen degradation is more attractive to us since the 4 patients had a marked reduction in their trabecular bone volume (9.27 ± 3.9%). Such a high rate of bone matrix degradation, associated with high serum PYD levels, in the absence of PTH-stim-

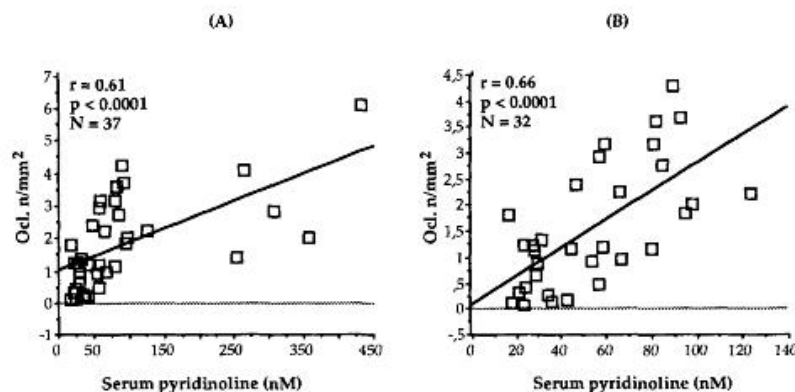


FIG. 3. Correlation between serum-free pyridinoline and osteoclast number per mm^2 of tissue section (Ocl.n/ mm^2). For all patients (A) and without 5 patients with serum PYD and iPTH 2 SD higher than the mean value (B).

ulated bone resorption, remains to be confirmed in a larger population of dialysis patients with LTBD. The diagnosis of aluminum-associated LTBD or osteomalacia was excluded in these patients.

In spite of its low specificity (37%) in detecting patients with LTBD, the highest values of serum PYD levels were found in patients with the highest rate of bone resorption. This was further confirmed by the good correlation observed between serum PYD levels and the number of osteoclasts/ mm^2 and the percentage of bone surface covered by osteoclasts in the whole group of patients as well as separately in both subgroups, HTBD and LTBD (data not shown). Likewise, we found that serum PYD was as well correlated with bone resorption and bone formation parameters as serum iPTH and bAP. Of note, bone histomorphometric data showed a high degree of coupling between bone resorption and bone formation parameters in these patients. Taken together, these findings suggest that serum PYD could be as useful as serum iPTH and bAP in the assessment of bone turnover in hemodialysis patients.

In the present study, serum bAP levels showed significant correlations with bone resorption and formation parameters as well as with serum PYD. Moreover, serum bAP was better than PYD in predicting HTBD. These findings are in accordance with observations showing a high correlation between serum bAP and iPTH in dialysis patients.⁽²⁰⁾ Despite the absence of bone histomorphometry in this study, the authors suggested that serum bAP could be a sensitive marker in the assessment of bone turnover in uremic patients with secondary hyperparathyroidism. Since HTBD is defined by a high bone formation rate, the difference between bAP and PYD could be due to the fact that PYD reflects bone resorption rather than bone formation in contrast to bAP, which mostly reflects the bone formation rate. Perhaps the sensitivity and specificity of PYD can be increased if bone mineral density changes are taken into account in the diagnosis of HTBD; however, this hypothesis remains to be examined.

As to PICP and ICTP, we found increased serum levels in our hemodialysis patients, in accordance with previous observations made by Hamdy et al. and Coen et al.⁽³⁰⁻³²⁾ However, in contrast to the observations made by these authors, we did not observe a significant correlation between serum levels of either PICP or ICTP with any of the bone histomorphometric parameters examined. These apparent discrepancies could be due to the fact that Coen et al.⁽³¹⁾ studied patients with moderate chronic renal failure before the start of hemodialysis therapy, or because of the smaller number of patients and the presence of aluminum overload in 38% of patients in the study by Hamdy et al.⁽³⁰⁾ Moreover, high serum ICTP levels may also reflect the metabolism of collagen molecules of nonskeletal origin as previously suggested in osteoporotic patients.⁽³⁸⁾ Based on our findings, we suggest that PICP and ICTP are not sensitive markers of bone metabolism in hemodialysis patients.

In conclusion, this study demonstrates for the first time that PYD can be measured with a reliable competitive enzyme immunoassay in the serum of hemodialysis patients. It represents an interesting and specific biochemical marker of collagen breakdown and skeletal remodeling in these patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported in part by a grant from Hospital Laboratories. At the time this study was performed, Pablo Ureña, M.D., was a recipient of a grant from "Société de Secours des Amis des Sciences" and Anibal Ferreira, M.D., was an exchange post-doctoral fellow supported by the Fundação Calouste Gulbenkian. We also gratefully acknowledge the contribution of the Institut Scientifique Roussel and useful discussion with Michael Mannstadt, M.D., and Milan Hruby, M.D.

REFERENCES

- De Vernejoul MC, Kuntz D, Miravet L, Gueris J, Biela-koff J, Ryckewaert A 1981 Bone histomorphometry in hemodialysed patients. *Metab Bone Dis Rel Res* 3:175-179.
- Hodsman AB, Sherrard DJ, Wong EGC, Brickman AS, Lee DBN, Alfrey AC, Singer FR, Norman AW, Coburn JW 1981 Vitamin-D-resistant osteomalacia in hemodialysis patients lacking secondary hyperparathyroidism. *Ann Intern Med* 94:629-637.
- Herez G, Pei Y, Greenwood C, Mapuel A, Saipho C, Goodman WG, Segre GV, Fenton S, Sherrard DJ 1993 Aplastic osteodystrophy without aluminum: The role of "suppressed" parathyroid function. *Kidney Int* 44:860-866.
- Drücke T 1991 Beta-2-microglobulin amyloidosis and renal bone disease. *Miner Electrolyte Metab* 17:261-272.
- Onishi S, Andress DL, Maloney NA, Coburn JW, Sherrard DJ 1991 Beta-2-microglobulin deposition in bone in chronic renal failure. *Kidney Int* 39:990-995.
- Karsenty G, Vigneron N, Jorgetti V, Fauchet M, Zingraff J, Drücke T, Cournot-Witmer G 1986 Value of ^{99m}Tc -methylene diphosphonate bone scan in renal osteodystrophy. *Kidney Int* 29:1058-1065.
- Messa C, Goodman WG, Hoh CK, Choi Y, Nissenson AR, Salusky IB, Phelps ME, Hawkins RA 1993 Bone metabolic activity measured with positron emission tomography and (18F) fluoride ion in renal osteodystrophy: correlation with bone histomorphometry. *J Clin Endocrinol Metab* 67:949-955.
- Pirano B, Chen T, Cooperstein L, Segre G, Paschert J 1988 Fractures and vertebral bone mineral density in patients with renal osteodystrophy. *Clin Nephrol* 30:57-62.
- Joffe P, Hyldstrup L, Podenphant J, Henriksen JH 1992 Bisphosphonate kinetics in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis: relations to dynamic bone histomorphometry, osteocalcin, and parathyroid hormone. *Am J Nephrol* 12:419-424.
- Cochran M, Cochran M, Neville A, Marshall EA 1994 Comparison of bone formation rates measured by radiocalcium kinetics and double-tetracycline labeling in maintenance dialysis patients. *Calcif Tissue Int* 54:392-398.
- Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, Guzman NA 1979 The biosynthesis of collagen and its disorders. *N Engl J Med* 301:13-23.
- Delmas PD, Schlemmer A, Gineyts E, Riis B, Christiansen C 1991 Urinary excretion of pyridinoline crosslinks correlates with bone turnover measured on iliac crest biopsy in patients with vertebral osteoporosis. *J Bone Miner Res* 6:639-644.
- Uebelhart D, Schlemmer A, Johansen JS, Gineyts E, Christiansen C, Delmas PD 1991 Effect of menopause and hormone replacement therapy on the urinary excretion of pyridinoline cross-links. *J Clin Endocrinol Metab* 72:367-373.
- Seibel MJ, Gartenberg F, Silverberg SJ, Ratcliffe A, Robins SP, Bilezikian JP 1992 Urinary hydroxypyridinium cross-links of collagen in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 74:481-486.
- Branca F, Robins SP, Ferro-Luzzi A, Golden MHN 1992 Bone turnover in malnourished children. *Lancet* 340:1493-1496.
- Simon LS, Krane SM, Wortman PD, Krane IM, Kovitz KL 1984 Serum levels of type I and III procollagen fragments in Paget's disease of bone. *J Clin Endocrinol Metab* 58:110-120.
- Delmas PD, Gineyts E, Bertholin A, Garnero P, Marchand F 1993 Immunoassay of pyridinoline crosslink excretion in normal adults and in Paget's disease. *J Bone Miner Res* 8:643-648.
- Body JJ, Delmas PD 1992 Urinary pyridinium cross-links as marker of bone resorption in tumor-associated hypercalcemia. *J Clin Endocrinol Metab* 74:481-486.
- Kung VT, Gomez B, Långard R, Seyedin S, Clark B, Riggs L 1993 An immunoassay for the measurement of free pyridinoline in serum: a marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 8:S151.
- Garnero P, Delmas PD 1993 Assessment of the serum levels of bone alkaline phosphatases with a new immunometric assay in patients with metabolic bone disease. *J Clin Endocrinol Metab* 77:1046-1053.
- Garnero P, Grimaux M, Demiaux B, Precaudat C, Seguin P, Delmas PD 1992 Measurement of serum osteocalcin with a human-specific two-site immunoradiometric assay. *J Bone Miner Res* 7:1389-1398.
- Seyedin S, Kung VT, Daniloff YN, Hesley RP, Gomez B, Nielsen LA, Rosen HN, Zuk RF 1993 Immunoassay for urinary pyridinoline: the new marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 8:635-641.
- de Vernejoul MC, Belenguer R, Halkidou H, Busine A, Biela-koff J, Miravet L 1985 Histomorphometric evidence of deleterious effect of aluminum on osteoblast. *Bone* 6:15-20.
- Parfitt AM, Drezner MK, Glurieux FH, Kanis JA, Malfuche HH, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR 1987 Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. *J Bone Miner Res* 2:595-610.
- Uebelhart D, Gineyts E, Chapuy MC, Delmas PD 1990 Urinary excretion of pyridinium crosslinks: a new marker of bone resorption in metabolic bone disease. *Bone Miner* 8:87-96.
- Seibel MJ, Duncan A, Robins SP 1989 Urinary hydroxy-pyridinium crosslinks provide indices of cartilage bone involvement in arthritic diseases. *J Rheumatol* 16:964-970.
- Fyfe DR 1987 Collagen crosslink amino-acids. *Meth Enzymol* 144:115-139.
- Robins SP 1982 Turnover of collagen. In: Weiss JB, Jayson MIV (eds.) *Collagen in Health and Disease*. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 160-178.
- Bergström J, Furst P 1992 Uraemic toxins. In: Drukker WM, Parsons FM, Maher JF (eds.) *Replacement of Renal Function by Dialysis*. Second, revised and enlarged ed. Martinus Nijhoff Publishers, Amsterdam, pp. 354-390.
- Hamdy NAT, Risteli J, Beneton MNC, Brown CB, Kanis JA 1993 Serum type I procollagen peptide: A non-invasive index of bone formation in patients on hemodialysis? XIIIth Int. Congress of Nephrology, Jerusalem, June 13-18, 469.
- Coen G, Mazzaferro S, Ballanti P, Bonucci E, Bondatti F, Manni M, Pasquali M, Perruzza I, Sardella D, Spurio A 1992 Procollagen type I C-terminal extension peptide in predialysis chronic renal failure. *Am J Nephrol* 12:246-251.
- Coen G, Ballanti P, Mazzaferro S, Pasquali M, Bonucci E 1993 Procollagen type I C-terminal extension peptide, PTH, and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in chronic renal failure. *Bone* 14:415-420.

Address reprint requests to:
Dr. Pablo Ureña
 INSERM Unité 90
 Département de Néphrologie
 Hôpital Necker
 161 rue de Sèvres
 75743 Paris Cedex 15, France

Received in original form February 7, 1994; in revised form December 6, 1994; accepted February 7, 1995.

Após transplantação renal, a excreção urinária de PYR e de DPYR, em doentes com calcemia normal, mostrou maior sensibilidade que os níveis de PTH intacta e de isoforma óssea da fosfatase alcalina, no diagnóstico de HPTH 2º (200).

Contrariando estes resultados, Bervoets e colaboradores não conseguiram evidenciar diferenças significativas nos níveis séricos de DPYR em 84 doentes, com IRC em fase pré-dialítica, com diferentes graus de remodelação óssea (201).

3.1.4. Outros marcadores séricos da reabsorção óssea

3.1.4.1. Telopectido do colagénio tipo I – ICTP

O ICTP resulta da degradação do colagénio durante o processo de reabsorção óssea, e é composto por fragmentos que também incluem as moléculas de “pontagem”, ou estabilizadoras, das cadeias de colagénio (“*cross-linking molecules*”) referidas na alínea anterior.

Os métodos de determinação do ICTP, mediante o recurso a anticorpos policlonais, mostraram resultados decepcionantes e pouco reprodutíveis (202).

A eliminação do ICTP depende diretamente da função renal residual e, por exemplo, em mulheres sujeitas a terapêutica hormonal substitutiva por quadros de osteoporose pós menopausa, os níveis de ICTP mostraram uma fraca correlação com a reabsorção óssea (203).

Na nossa experiência também não conseguimos evidenciar nenhuma correlação entre os níveis séricos de ICTP e qualquer parâmetro histomorfométrico estático ou dinâmico, o que nos levou a concluir que este não é um marcador sensível da reabsorção óssea em doentes hemodialisados (184).

Pelo contrário, e em oposição aos nossos resultados, Mazaferro e colaboradores encontraram correlações estatisticamente significativas, entre o ICTP e marcadores séricos (fosfatase alcalina total, fosfatase alcalina óssea, PTH intacta) e histomorfométricos, de remodelação óssea (190).

3.1.4.2. Fosfatase ácida resistente ao ácido tártrico (TRAP)

Esta enzima é particularmente abundante nos osteoclastos e está habitualmente aumentada no soro de doentes com aumento da reabsorção óssea (204).

A TRAP representa a fração da fosfatase ácida que mostra resistência na sua mobilidade num gel de acrilamida, ao ácido tartárico. Esta característica biofísica permite separar a isoforma óssea das restantes isoformas (como a prostática) que constituem, no seu conjunto, a fosfatase ácida total.

Desde há mais de uma década que os doseamentos da TRAP são feitos por imunoensaios, mas os resultados em doentes hemodialisados ainda são escassos e carecem de validação em maiores populações bem como da correlação com os dados da histomorfometria óssea (173; 205).

Os doentes com quadros de HPTH 2º, em hemodiálise, apresentaram níveis séricos médios de TRAP significativamente mais elevados, que os doentes hemodialisados com remodelação óssea normal ou reduzida. Os níveis séricos de TRAP correlacionaram-se com a superfície osteoclástica em hemodialisados (206).

Embora a maioria da TRAP seja produzida ao nível do osso, pelos osteoclastos cativados, podem observar-se níveis circulantes elevados desta proteína noutras patologias como a doença de Gaucher e a leucemia “*Hairy Cell*” (207).

Após transplantação renal, a TRAP também se mostrou um bom marcador da atividade osteoclástica, correlacionando-se, de forma significativa, com outros marcadores não invasivos da reabsorção óssea (208).

Mais recentemente, investigadores japoneses descreveram uma elevada correlação entre a redução da TRAP e a redução da PTH 1-84, bem como do rácio PTH 1-84/PTH intacta, ao fim de 12 semanas de tratamento com cinacalcet em doentes com HPTH 2º severo (209).

Como discutiremos detalhadamente no capítulo 4, de acordo com a nossa experiência a TRAP é particularmente vantajosa, por permitir identificar os osteoclastos ativados, nas lâminas de tecido ósseo não descalcificado, mediante uma coloração específica que tivemos oportunidade de otimizar.

3.1.5. Aluminemia, depósitos ósseos de alumínio e terapêutica com desferroxamina (manuscrito 7)

Níveis séricos elevados de alumínio (embora não sendo marcadores bioquímicos da remodelação óssea) podem fornecer informação relevante, face ao risco aumentado de desenvolvimento de doença óssea de baixa remodelação ou de compromisso da mineralização óssea, podendo atingir critérios de osteomalácia (ver capítulo seguinte).

Os doentes hemodialisados podem ser expostos a intoxicação maciça aguda pelo alumínio, habitualmente na sequência de um deficiente tratamento da água para hemodiálise, como aconteceu num lamentável episódio, no sul de Portugal, no início da década de 90.

Felizmente, estas catástrofes terapêuticas são, atualmente, uma raridade, em todo o mundo, face aos elevados níveis de exigência no tratamento da água e soluções dialisantes.

A maioria das unidades de preparação da água para hemodiálise e de soluções dialisantes passou a funcionar com sistemas redundantes, em paralelo, assegurando uma elevadíssima qualidade da água, que atinge a classificação de “*ultrapura*” quando se praticam técnicas de elevada convecção, como a hemodiafiltração.

A exposição dos nossos doentes ao alumínio pode ainda ser de tipo crónico, mantido e repetido, como o que foi descrito nalgumas populações (inclusivamente portuguesas), que cozinham em louça rica em alumínio, ou dever-se à manutenção da terapêutica com hidróxido de alumínio (como captador de fósforo), que ainda persiste nalgumas (escassas) unidades.

As medições do alumínio sérico apresentam algumas limitações e significativas dificuldades de interpretação (210). O alumínio sérico representa apenas o alumínio presente no espaço extracelular, isto é, em cerca de 5% da massa corporal.

A determinação dos níveis séricos de alumínio informa-nos mais sobre a exposição aguda a este metal do que sobre a respetiva exposição crónica (211). Estas determinações seriadas permitem ainda definir um perfil de aluminemia para cada doente e acompanhar eventuais variações bruscas (indicadoras de exposição maciça e/ou recente a este metal) (212; 213).

A presença de níveis de alumínio sérico acima de 80 $\mu\text{gr/L}$ é fortemente sugestiva de intoxicação alumínica. Para valores compreendidos entre 40 e 80 $\mu\text{gr/L}$ pode ser de grande utilidade clínica a realização do teste da desferroxamina (DFO), através da administração de 5 mg/Kg de DFO (captador do alumínio), (214).

Embora a relevância deste teste tenha sido, ocasionalmente, posta em causa, pelas variações dos resultados (variações inter-testes), e pelas dificuldades na interpretação dos mesmos, ele tem sido utilizado na prática clínica nefrológica.

Na nossa experiência clínica consideramos um teste de DFO positivo quando se observa uma elevação da aluminemia superior a 50 $\mu\text{g/L}$, ou quando um valor basal igual ou superior a 40 $\mu\text{g/L}$ pelo menos duplica, (comparando os níveis pré DFO e 48 horas após a administração endovenosa de 5 mg/Kg DFO, em doentes não sujeitos a este teste ou a esta terapêutica captadora nos últimos 6 meses).

A presença de um teste de DFO positivo, nestas condições, é indicação para a investigação mais agressiva dos depósitos ósseos de alumínio, através da realização de biopsia óssea e geralmente para um primeiro período de terapêutica com captadores deste metal (128).

Importa, no entanto, sublinhar que um teste de DFO negativo não exclui a presença de depósitos ósseos de alumínio muito extensos. Na patogenia destes “falsos resultados negativos” poderão estar múltiplos fatores, como por exemplo, o grau de repleção de ferro corporal (211).

Tendo em conta que a DFO é um captador do alumínio e do ferro, estabelecendo compostos de grande estabilidade com estes metais, a sobrecarga com ferro é uma das causas mais frequentes de falsos resultados negativos do teste do DFO, como foi elegantemente descrito por Cannata e colaboradores (214; 215).

Estes autores propõem que as quantificações dos níveis séricos de DFO, do complexo alumínio - DFO e do complexo alumínio - ferro sejam efetuadas através de cromatografia líquida de alta rentabilidade, de forma a separar cada um destes componentes (215).

Face ao risco de efeitos acessórios associados à terapêutica com DFO, na dose de 5 mg/kg/dia, secundários ao aumento sérico dos complexos de DFO - alumínio e DFO - ferro (podendo contribuir, respetivamente, para o aumento de incidência de encefalopatia alumínica ou sépsis a *mucormicosis*), o grupo de Cannata e colaboradores avaliaram a eficácia da utilização de doses mais baixas de DFO (216).

Também nós tivemos a oportunidade de confirmar, num estudo prospetivo com 6 meses de duração, a eficácia e segurança destas “*microdoses*” (apenas 0,5 µg/kg/diálise) de desferroxamina no tratamento da sobrecarga alumínica (217).

Selecionámos 19 doentes que apresentavam aluminemia basal superior a 20 µg/L ou que duplicavam o valor basal de aluminemia no teste do DFO. A utilização da microdose de 0,5 µg/kg/diálise, durante 6 meses, permitiu a redução significativa das aluminemias basais e após teste de DFO (217).

Esta abordagem, com microdoses de desferroxamina (10 vezes inferiores ao previamente proposto) afigura-se como a forma mais segura e eficaz de remover o excesso de alumínio, de forma suave mas por longos períodos. Está particularmente indicada em doentes com forte exposição a este metal.

Use of a desferrioxamine “microdose” to chelate aluminum in hemodialysis patients

C. Jorge, C. Gil, M. Possante,
M.C. Catarino, A. Cruz, R. Andrade,
R. Teixeira, N. Santos and A. Ferreira

Hemodial-Centro de Dialise de Vila Franca de Xira, Vila Franca de Xira, Portugal

Sir, – Since the “European Consensus Conference on Aluminium Overload”, the usual dose of desferrioxamine (DFO) to chelate aluminum (Al) has been 5 mg/kg/week [De Broe et al. 1993]. Recent works from Spain, however, suggest that much lower DFO doses can be effective in Al removal [Canteros et al. 1998]. In order to evaluate the long-term effect of 0.5 mg/kg of DFO on the serum levels of Al of hemodialysis patients, we performed a prospective study. We selected those patients whose basal predialysis serum Al was $\geq 20 \mu\text{g/l}$ and whose delta on the DFO test (5 mg/kg) [De Broe et al. 1993] was \geq twice the basal value. Such values could reflect Al overload, mainly if used in conjunction with the serum iPTH. We followed 19 patients (7 males, 12 females), with the mean age (\pm SD) of 62.7 (\pm 10.4) years, who were on hemodialysis for an average of 68.3 (\pm 64.2) months. All patients were dialysed with low-permeability polysulfone

capillary filters, which were reused with peracetic acid. During 6 months, 0.5 mg/kg of DFO was administered i.v. for the first 2 hemodialysis hours, at each session except when i.v. iron was given. Since the latter was administered from once per week to once per month, patients received DFO 2 or 3 times per week, on average. A DFO test was performed immediately before treatment and 2 months after the end of it. The results obtained are shown in Table 1. A 25.2% reduction of basal predialysis serum Al and a 21.7% reduction of delta Al during the DFO test was observed with this mode of DFO administration. Individual changes of basal serum Al are shown in Figure 1. The majority of patients had a decrease in serum Al. We stress the fact that our patients already had very low serum Al levels to start with, which undoubtedly resulted from the absence of Al hydroxide treatment and from low Al levels in the dialysate. At present, we routinely evaluate the latter every month. Its value has been persistently lower than $2 \mu\text{g/l}$ and did not significantly vary throughout the study period. During the same time period we evaluated other clinical and biochemical parameters which are shown in Table 2. Using this protocol, the calculated maximum total amount of DFO administered for 6 months to a patient weighing 70 kg, undergoing hemodialysis thrice weekly and receiving DFO at all sessions is 2520 mg. This is considerably less than the usual DFO dose (5 mg/kg/week) given to such patient for a time period of only 3 months, that is 4200 mg. In spite of the lower cumulative DFO dose, Al could be efficaciously removed. We did not observe any adverse reactions or secondary effects associated with this therapy, as expected. Adverse effects of DFO are dose-related, and the “microdose” used by us is much lower than the one currently recommended

Table 1. Serum Al levels ($\mu\text{g/l}$) as revealed by DFO test (5 mg/kg) before (t1) and after 6 months (t2) of DFO therapy (0.5 mg/kg, means \pm SD).

Before DFO therapy (t1)			After 6 months of DFO therapy (t2)		
Al pre DFO 1	Al post DFO 1	Delta 1	Al pre DFO 2	Al post DFO 2	Delta 2
24.6 \pm 4.6	55.8 \pm 11.6	31.2 \pm 10.1	18.4 \pm 4.8*	43.7 \pm 12.7	25.3 \pm 10.4**

*p < 0.001 pre 1 versus pre 2, **p < 0.02 delta 1 versus delta 2; paired Student's t test.

Table 2. Follow-up of biochemical, hematological and clinical parameters before (t1) and after 6 months (t2) of DFO treatment.

	Serum calcium (mg/dl)	Serum phosphorous (mg/dl)	Plasma iPTH (pg/ml)	Blood Hb (g/dl)	Serum iron (μ g/dl)	Plasma ferritin (ng/ml)	EPO therapy (U/kg/week)	Vitamin D3 intake (μ g/week)	CaCO ₃ intake (g/day)
T1	9.4 \pm 0.6	5.1 \pm 1.8	201.1 \pm 183.1	11.7 \pm 1.6	69.5 \pm 18.3	406.6 \pm 151.6	120.7 \pm 73.5	0.4 \pm 0.8	3.2 \pm 1.9
T2	9.4 \pm 0.7	4.6 \pm 1.5	210.3 \pm 199.2	11.5 \pm 1.8	69.8 \pm 24.3	462.6 \pm 149.4	127.6 \pm 90.2	0.5 \pm 0.8	3.4 \pm 1.9

p = NS for all parameters; paired Student's t test.

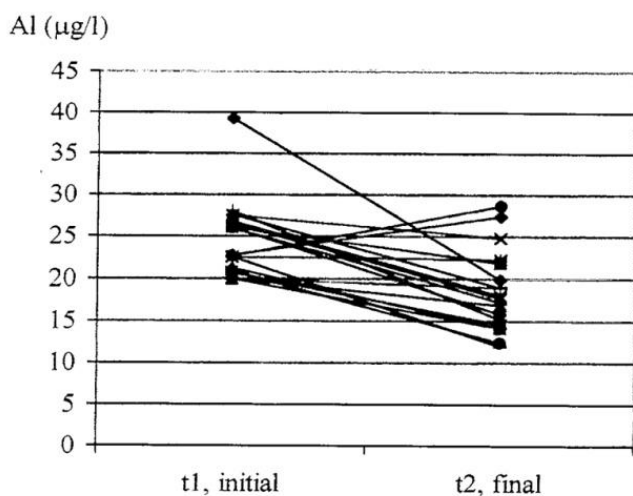


Figure 1. Basal predialysis serum Al of each patient before (t1) and after 6 months (t2) of DFO therapy.

throughout the world. Given these results, we conclude that 0.5 mg/kg of DFO, administered in the first 2 hours of a hemodialysis session, 2 - 3 times per week, during 6 months, is a safe and effective way to chelate Al. The use of this therapy in patients with elevated basal serum Al levels might prove to offer a higher degree of safety, in addition to its effectiveness, as, for instance, a lower risk of developing Al encephalopathy.

References

- Canteras A, Diaz-Corte C, Fernandez-Martin JL, Gago E, Fernandez-Merayo C, Cannata JB 1998 Ultrafiltrable aluminium after very low doses of desferrioxamine. *Nephrol Dial Transplant* 13: 1538-1542
- De Broe ME, D'Haese PC, Couutenye MM, Van Landeghem GF, Lamberts LV 1993 New insights and strategies in the diagnosis and treatment of aluminium overload in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 8 (Suppl 1): 47-50
- De Broe ME, Druke TB, Ritz E 1993 Diagnosis and treatment of aluminium overload in end-stage renal failure patients. *Nephrol Dial Transplant* 8 (Suppl 1): 1-4

Correspondence to

Dr. C. Jorge,
Hemodial-Centro de Dialise de Vila Franca de Xira,
Quinta da Mina, lote 3, r/c 2600 Vila Franca de Xira,
Portugal

3.1.6. Limitações do diagnóstico não invasivo da osteodistrofia renal

Como discutiremos ao longo do próximo capítulo, a realização de uma biopsia óssea com avaliação da remodelação, da mineralização e do volume ósseo, constitui o método ideal de caracterização da osteodistrofia, no doente urémico.

No entanto, tratando-se de um método cruento e disponível apenas em escassos centros, raramente o diagnóstico invasivo é a primeira opção do nefrologista na avaliação da doença óssea metabólica.

Por esse motivo, o diagnóstico não invasivo, mediante a utilização dos marcadores bioquímicos da remodelação óssea, discutida ao longo deste capítulo, constitui, habitualmente, a abordagem inicial do metabolismo ósseo e mineral, no doente urémico.

Infelizmente, como tivemos oportunidade de referir, aquando da discussão individualizada de cada marcador da formação e reabsorção óssea considerados, a sua sensibilidade e especificidade são habitualmente reduzidas.

Quando associados, alguns destes marcadores bioquímicos aumentam a sua sensibilidade e especificidade, no diagnóstico da doença óssea subjacente, permitindo, em muitos casos, separar os quadros de elevada remodelação dos de doença adinâmica, sobretudo quando são consideradas populações alargadas (120).

No entanto, no doente *individual*, este diagnóstico é muito mais difícil, sobretudo se baseado apenas em valores isolados e não em perfis de evolução dos marcadores bioquímicos de remodelação óssea (120).

Na nossa experiência pessoal, e com base em 156 biopsias ósseas efetuadas, num estudo prospetivo (218), em doentes tratados de acordo com os objetivos KDOQI, a sensibilidade e especificidade da iPTH e da isoforma óssea da fosfatase alcalina foram bastante limitadas como, é evidenciando na tabela abaixo apresentada.

Diagnóstico não invasivo da remodelação óssea em doentes tratados de acordo com os "guidelines" KDOQI e sujeitos a biopsia óssea				
No diagnóstico de doença óssea adinâmica				
	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
iPTH < 150 pg/mL	51,1%	77,3%	75,4%	53,7%
BAP < 20 ng/mL	83,5%	44,6%	67,9%	65,9%
iPTH < 150 pg/mL e BAP < 20 ng/mL	47,3%	83,3%	79,6%	53,4%
No diagnóstico de doença óssea de elevada remodelação				
	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
iPTH > 300 pg/mL	62,3%	78,6%	60,0%	80,2%
BAP > 20 ng/mL	42,3%	78,8%	50,0%	73,2%
iPTH > 300 pg/mL e BAP > 20 ng/mL	34,0%	87,5%	58,1%	72,2%
VPP=valor preditivo positivo; VPN=valor preditivo negativo; BAP=isoforma óssea da fosfatase alcalina; iPTH=paratormona intacta				
Resultados de 156 biopsias ósseas (90 com osso adinâmico e 66 com doença óssea de elevada remodelação) Ferreira A. (resultados ainda não publicados)				

Estes nossos resultados estão em total concordância com os descritos por Barreto e colaboradores, em doentes biopsados no mesmo período de tempo e igualmente tratados de acordo com os objetivos KDOQI. Estes autores descreveram uma sensibilidade e um índice preditivo positivo, para um valor de iPTH superior a 300 pg/ml, no diagnóstico de doença óssea de alta remodelação, de 69% e 62%, respetivamente (219). Na nossa avaliação obtivemos resultados sobreponíveis de 62,3% e 60% para os mesmos parâmetros (ver tabela acima).

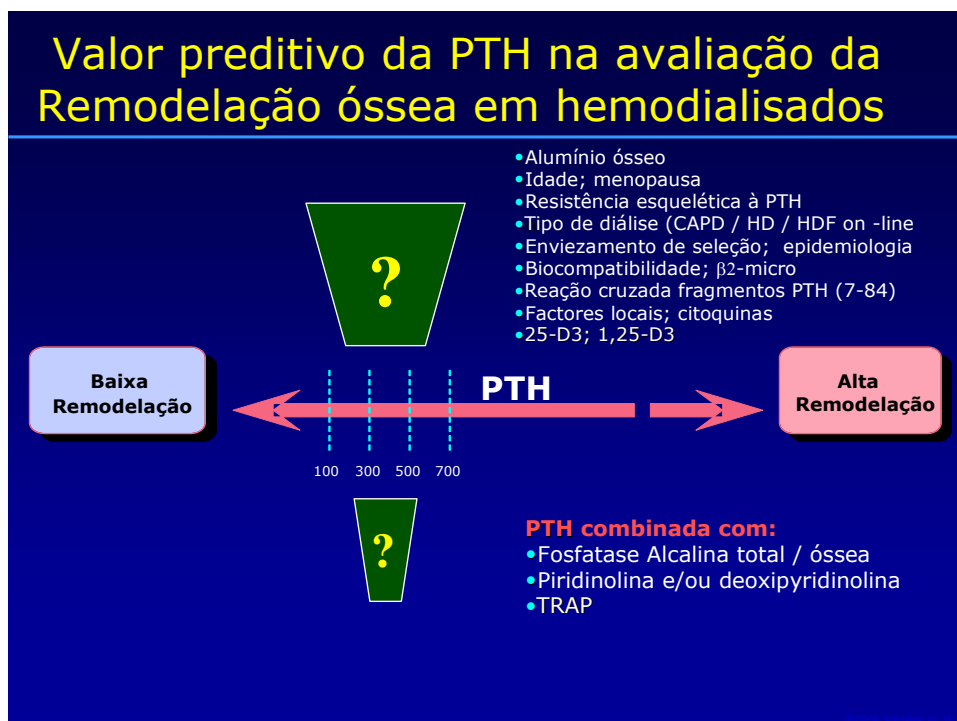
Com base nos resultados das nossas investigações, na área do diagnóstico não invasivo da osteodistrofia renal, estamos inteiramente de acordo com o proposto

previamente nos KDOQI (220), e mais recentemente nos KDIGO (96), acerca da relevância da determinação dos níveis circulantes da paratormona, na caracterização da remodelação óssea.

No entanto, tal como outros autores, evidenciamos as limitações destas determinações da PTH, no diagnóstico da doença óssea e metabólica no doente urémico, considerado de forma individual.

O intervalo de valores que a PTH pode assumir em determinada fase evolutiva de um doente com insuficiência renal, no qual, após a realização de uma biopsia óssea, tanto podemos diagnosticar doença óssea adinâmica como osso normal ou doença óssea de elevada remodelação, corresponde ao que convencionámos chamar “*intervalo cinzento*” da PTH.

Como está representado na figura seguinte, este *intervalo cinzento* da PTH poderá ser alargado ou estreitado por diferentes fatores, muitos dos quais tivemos a oportunidade de caracterizar na nossa investigação clínica.



3.2. Bibliografia capítulo 3:

1. *Bone histomorphometry in renal osteodystrophy.* **Ott,S.M.** 2, 2009, Semin Nephrol, Vol. 29, pp. 122-132.
2. *The physiochemical structure of bone: cellular and non cellular elements.* **Green,J.** 1994, Miner Electrolyte Metab, Vol. 29, pp. 7-15.
3. *How to diagnose the different forms of renal osteodystrophy: Role of biochemical markers.* **Ferreira,A.; Drüeke,T.B.** 2000, Am J Med Sci, Vol. 320, pp. 85-89.
4. *Development of renal bone disease.* **Ferreira, A.** 2006, Eur J Clin Invest, Vol. 36, pp. 2-12.
5. *Diagnosis of renal osteodystrophy: when and how to use biochemical markers and non-invasive methods; when one biopsy is needed.* **Ferreira,A.** 2000, Nephrol Dial Transplant, Vol. 15, pp. 8-14.
6. *Two-week longitudinal survey of bone architecture alteration in the hindlimb-unloaded rat model of bone loss: sex differences.* **David,V.; Lafage-Proust,M.H.; Laroche,N.; Christian,A.; Ruegsegger,P.; Vico,L.** 2006, Am J Physiol Endocrinol Metab, Vol. 290, pp. 440-447.
7. *Definition, evaluation and classification of renal osteodystrophy: A position statement from Kidney Disease: Improving General Outcome (KDIGO).* **Moe,S.M.; Drüeke,T.; Cunningham,J.; Goodman,W.G.; Martin,K.; Olgaard,K.; Ott,S.; Sprague,S.; Lameire,N.; Eknoyan,G.** 2006, Kidney Int, Vol. 69, pp. 1945-1953.
8. *Femoral bone mineral density reflects histologically determined cortical bone volume in hemodialysis patients.* **Adragão,T.; Herberth,J.; Monier-Faugere,M-C.; Branscum,A.J.; Ferreira,A.; Frazão,J.M.; Malluche,H.H.** 2009, Osteoporos Int, p. Published on line 25 th June 2009.
9. *High prevalence of low bone mineral density in predialysis chronic kidney disease patients: bone histomorphometric analysis.* **Lobao,R; Carvalho,A.B.; Cuppari,L.; Ventuta,R.; Lazaretti-Castro,M; Jorgetti,V.; Vieira,J.G.; Cendoroglo,M.; Draibe,S.A.** 2004, Clin Nephrol, Vol. 62, pp. 432-439.
10. *Total hip bone mass predicts survival in chronic hemodialysis patients.* **Taal,M.W.; Roe,S.; Masud,T.; Green,D.; Porter,C.; Cassidy,M.J.** 2003, Kidney Int, Vol. 63, pp. 1116-1120.
11. *Trends in renal osteodystrophy: a survey from 1983 to 1995 in a total of 2248 patients.* **Monier-Faugere,M-C.; Malluche,H.** S-3, 1996, Nephrol Dial Transplant, Vol. 11, pp. S111-S120.
12. *Fibroblast growth factor 23 (FGF23) predicts progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study.* **Fliser,D.; Kollerits,B.; Neyer,U.; Ankerst,D.P.; Lhotta,K.; Lingenhel,A.; Ritz,E.; Kronenberg,F.** 2007, J Am Soc Nephrol, Vol. 18, pp. 2601-2607.

13. *As nature did not predict dialysis - what we can learn from FGF23 in end-stage renal disease?* **Ketteler,M.; Biggar,P.H.** 2009, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 24, pp. 2618-2620.
14. *Regulation of fibroblast growth factor-23 in chronic kidney disease.* **Westerberg,P-A.; Linde,T.; Wikström,B.; Ljunggren,O.; Stridsberg,M.; Larson,T.** 2007, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 22, pp. 3202-3207.
15. *Vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease. A single center observational study.* **Gonzalez,E.A.; Sachdeva,A.; Oliver,D.A.; et.al.** [ed.] 510. 2004, *Am J Nephrol*, Vol. 24, p. 503.
16. *Vitamin D status and secondary hyperparathyroidism: the importance of 25-hydroxyvitamin D cut-off levels.* **Gomez-Alonso,C.; Naves-Diaz,M.L.; Fernandez-Martin,J.L.; et.al.** 2003, *Kidney Int*, Vol. 85, pp. S44-S48.
17. *Diminished parathyroid 1,25(OH)₂D₃ receptors in experimental uremia.* **Merke,J.; Hugel,U.; Zlotkowski,A.; et.al.** 1987, *Kidney Int*, Vol. 32, pp. 350-353.
18. *Evolution of our understanding of vitamin D.* **DeLuca,H.F.** 2, 2010, *Nutrition Reviews*, Vol. 66, pp. S73-S87.
19. *Fibroblast Growth Factor 23 and disordered vitamin D metabolism in chronic kidney disease: updating the "trade-off" hypothesis.* **Gutiérrez,O.M.;** 2010, *Clin J Am Soc Nephrol*, Vol. 5, pp. 1710-1716.
20. *The diagnosis of renal osteodystrophy: a comparison of technetium 99 pyrophosphate bone scintigraphy with other techniques.* **Hodson,E.M; Howman-Gilles,R.B.; Evans,R.B.; et.al.** 1981, *Clin Nephrol*, Vol. 16, pp. 24-28.
21. *Value of the 99-mTc-methylene diphosphonate bone scan in renal osteodystrophy.* **Karsenty,G.; Vigneron,N.; Jorgetti,V.; et.al.** 1986, *Kidney Int*, Vol. 29, pp. 1058-1065.
22. *Calcemic response to parathyroid hormone in renal failure: role of calcitriol and the effect of parathyroidectomy.* **Rodriguez,M.; Felsenfeld,A.; Llach,F.** 1991, *Kidney Int*, Vol. 40, pp. 1063-1068.
23. *Calcemic response to parathyroid hormone in renal failure: role of phosphorus and its effect on calcitriol.* **Rodriguez,M.; Martin-Malo,A.; Martinez,ME; Torres,A.; Felsenfeld,A.** 1991, *Kidney Int*, Vol. 40, pp. 1055-1062.
24. *Regulation of parathyroid hormone gene expression by hypocalcemia, hypercalcemia and vitamin D in the rat.* **Naveh-Manly,T.; Silver,J.** 1990, *J Clin Invest*, Vol. 86, pp. 1313-1319.
25. *Cloning and characterization of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid.* **Brown,E.M.; Gamba,G.; Riccardi,D.; Lombardi,M.; Butters,R.; Kifor,O.; et.al.** 1993, *Nature*, Vol. 366, pp. 575-580.

26. *Parathyroid gland function in renal failure.* **Felsenfeld,A.J.; Llach,F.** 1993, *Kidney Int*, Vol. 43, pp. 771-789.
27. *Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis.* **Goodman,W.G.; Goldin,J.; Kuizon,B.D.; Yoon,G.; Gales,B.; Sider,D.; et,al.** 2000, *N Engl J Med*, Vol. 342, pp. 1472-1483.
28. *Parathyroid gland function in renal failure.* **Goodman,W.G.; Belin,T.; Gales,B.; et,al.** 2008, *Kidney Int*.
29. *Direct in vivo comparison of calcium-regulated parathyroid hormone secretion in normal volunteers and patients with secondary hyperparathyroidism.* **Ramirez,J.A.; Goodman,W.G.; Gornbein,J.; Menezes,C.; Moulton,L.; Segre,G.V.; et,al.** 1993, *J Clin Endocrinol Metab*, Vol. 76, pp. 1489-1494.
30. *Hypocalcemia increases and hypercalcemia decreases the steady-state level of parathyroid hormone messenger RNA in the rat.* **Yamamoto,M.; Igarashi,T.; Muramatsu,M.; Fukagawa,M.; Motokura,C.; Ogata,E.** 1989, *J Clin Invest*, Vol. 83, pp. 1503-1506.
31. *K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease.* **National Kidney Foundation,.** 2003, *Am J Kidney Dis*, Vol. 42, pp. S70-S77.
32. *KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention and treatment of chronic kidney disease - mineral and bone disorder (CKD-MBD).* **Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group.** Sup 113, 2009, *Kidney Int*, Vol. 76, pp. S1-S130.
33. *Mineral metabolism parameters throughout chronic kidney disease stages 1-5 Achievement of K/DOQI target ranges.* **Craver,L.; Paz-Marco,M.; Martinez,I.; Rue,M.; Borràs,M; Martin,M.L.; Sarró,F.; Valdivielso,J.F.; Fernández,E.** 2007, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 22, pp. 1171-1176.
34. *Altered divalent ion metabolism in early renal failure: role of 1,25(OH₂D).* **Wilson,L.; Felsenfeld,A.; Drezner,M.K.; et,al.** 1985, *Kidney Int*, Vol. 27, pp. 567-573.
35. *On the pathogenesis of the uremic state. An exposition of the "trade-off hypothesis".* **Bricker,N.S.** 1972, *N Eng J Med*, Vol. 286, pp. 1093-1099.
36. *Vitamin D deficiency: a neglected aspect of disturbed calcium metabolism in renal failure.* **Cannata-Andía,J.; Alonso,C.G.** 2002, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 17, pp. 1875-1878.
37. *Reduced parathyroid vitamin D receptor messenger ribonucleic acid levels in primary and secondary hyperparathyroidism.* **Carling,T.; Rastad,J.; Szabo,E.; Westin,G.; Akerstrom,G.** 2000, *J Clin Endocrinol Metab*, Vol. 85, pp. 2000-2003.

38. *Vitamin D*. **Dusso,A.S.; Brown A.J.;Slatopolsky E.**; 2005, Am J Physiol Renal Physiol, Vol. 289, pp. F8-F28.
39. *Is low plasma 25-(OH)vitamin D a major risk factor for hyperparathyroidism and Looser's zones independent of calcitriol?* **Ghazali,A.; Fardellone,P.; Pruna,A.; et,al.** 1999, Kidney Int, Vol. 55, pp. 2169-2177.
40. *The physiochemical state and renal handling of divalent ions in chronic renal failure.* **Coburn,J.W.; Popovtzer,M.M.; Masry,S.G.** 1969, Arch Intern Med, Vol. 124, pp. 302-312.
41. *Hyperphosphatemia: its consequences and treatment in patients with chronic renal disease.* **Delmez,J.A.; Slatopolsky,E.** 1992, Am J Kidney Dis, Vol. 19, pp. 303-317.
42. *On the mechanism of secondary hyperparathyroidism in moderate renal insufficiency.* **Llach,F.; Massry,S.G.** 1985, J Clin Endocrinol Metab, Vol. 61, pp. 601-606.
43. *The role of phosphate in the secretion of parathyroid hormone in man.* **Reiss,E.; Canterbury,J.M.; Bercovitz,M.A.** 1970, J Clin Invest, Vol. 49, pp. 2146-2149.
44. *Metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃.* **Kumar,R.** 1984, Physiol Rev, Vol. 64, pp. 478-504.
45. *With or without the kidney: the role of FGF-23 in CKD.* **Fukagawa,M.; Kazama,J.J.** 2005, Nephrol Dial Transplant, Vol. 20, pp. 1295-1298.
46. *Phosphorus accelerates the development of parathyroid hyperplasia and secondary hyperparathyroidism in rats with renal failure.* **Denda,M.; Finch,J.; Slatopolsky,E.** 1996, Am J Kidney Dis, Vol. 28, pp. 596-602.
47. *Direct effect of phosphorous on PTH secretion from whole rat parathyroid glands in vitro.* **Almaden,Y.; Canalejo,A.; Hernandez,A.; Ballesteros,E.; Garcia-Navarro,S.; Torres,A.; Rodriguez,M.** 1996, J Bone Min Res, Vol. 11, pp. 970-976.
48. *A direct effect in vitro of phosphate on PTH release from bovine parathyroid tissue slices but not from dispersed parathyroid cells.* **Nielsen,P.K.; Feldt-Rasmussen,U.; Olgaard,K.** 1996, Nephrol Dial Transplant, Vol. 11, pp. 1762-1768.
49. *Parathyroid cell proliferation in normal and chronic renal failure rats. The effects of calcium, phosphate and vitamin D.* **Naveh-Many,T; Rahamimov,R.; Liuni,N.; Silver,J.** 1995, J Clin Invest, Vol. 96, pp. 1786-1793.
50. *RNA protein binding and post-transcriptional regulation of parathyroid hormone gene expression by calcium and phosphate.* **Moallem,E.; Kilav,R.; Sillver,J.; Navey-Many,P.** 1998, J Biol Chem, Vol. 273, pp. 5253-5259.
51. *p21 and TGF-alpha mediate dietary regulation of parathyroid cell growth.* **Dusso,A.; Pavlopoulos,T.; Naumovich,L; Lu,Y.; Finch,J.; Brown,A.J.; Slatopolsky,E.** 2001, Kidney Int, Vol. 59, pp. 855-865.

52. *How fibroblast growth factor 23 works.* **Liu,S.; Quarles,L.D.** 2007, J Am Soc Nephrol, Vol. 18, pp. 1637-1647.
53. *Cloning and characterization of FGF-23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia.* **Shimada,T.; Mizutani,S.; Muto,T.; et,al.** 2001, Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 98, pp. 6500-6505.
54. *FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa.* **Shimada,T.; Urakawa,I.; Yamazaki,Y.; et,al.** 2, 2004, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 314, pp. 409-414.
55. *Circulating concentration of FGF-23 increases as renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers.* **Larsson,T.; Nisbeth,U.; Ljunggren,O.; Jüpnér,H.; Jonsson,K.B.** 2003, Kidney Int, pp. 2271-2279.
56. *FGF-23 and sFRP-4 in chronic kidney disease and post renal transplantation.* **Pande,S.; Ritter,C.S.; Rothstein,M.; et,al.** 2006, Nephron Physiology, Vol. 104, pp. 23-32.
57. *Fibroblast growth factor-23 in early chronic kidney disease: additional support in favor of a phosphate-centric paradigm for the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism.* **Evenepoel,P.; Meijers,B.; Viaene,L.; Bammens,B.; Claes,K.; Kuypers,D.; Vanderschueren,D.; Vanrenterghem,Y.** 7, 2010, Clin J Am Soc Nephrol, Vol. 5, pp. 1268-1276.
58. *Fibroblast growth factor-23 and early decrements in kidney function: the heart and soul study.* **Ix,J.; Shilpak,M.G.; Wassel,C.L.; Whooley,M.A.** 3, 2010, Nephrol Dial Transplant, Vol. 25, pp. 993-97.
59. *Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 alpha-hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells.* **krajisnik,T.; Bjorklund,P.; Marsel,R.; et,al.;** 1, 2007, J Endocrinol, Vol. 195, pp. 125-131.
60. *The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats.* **Ben-Dov,I.Z.; Galitzer,H.; Lavi-Moshayoff,V.; et,al.** 2007, J Clin Invest, Vol. 117, pp. 4003-4008.
61. *Genetic dissection of phosphate- and vitamin D-mediated regulation of circulating Fgf23 concentrations.* **Yu,X.; Sabbagh,A.; Davis,S.I.; Demay,M.B.; White,K.E.** 6, 2005, Bone, Vol. 36, pp. 971-977.
62. *Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D.* **Liu,S.; Tang,W.; Zhou,J.; et,al.** 2006, J Am Soc Nephrol, Vol. 17, pp. 1305-1315.
63. *FGF23 fails to inhibit uremic parathyroid glands.* **Canalejo,R.; Canalejo,A.; Martinez-Moreno,J.M.; Rodriguez-Ortiz,M.E.; Estepa,J.C.; Mendoza,F.J.;**

Munoz-Castaneda,J.F.; Shalhoub,V.; Almaden,Y.; Rodriguez,M. 7, 2010, J Am Soc Nephrol, Vol. 21, pp. 1125-1135.

64. *Parathyroid cell resistance to fibroblast growth factor 23 in secondary hyperparathyroidism of chronic kidney disease.* **Galitzer,H.; Ben-Dov,I.Z.; Silver,J.; Naveh-Many,P.** 3, 2007, Kidney Int, Vol. 77, pp. 2011-2018.

65. *Fibroblast growth factor-23 in early chronic kidney disease: additional support in favor of a phosphate-centric paradigm for the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism.* **Evenepoel,P.; Meijers,B.; Viaene,L; Bammens,B; Claes,K.; Kuypers,D.; Vandershueren,D.; Vanrenterghem,Y.** 7, 2010, Clin J Am Soc Nephrol, Vol. 5, pp. 1268-1276.

66. *Patterns of FGF-23, DMP1, and MEPE expression in patients with chronic kidney disease.* **Pereira,R.C.; Juppner,H.; Azucena-Serrano,C.E.; Yadin,O.; Salusky,I.B.; Wesseling-Perry,K.** 2009, Bone, Vol. 45, pp. 1161-1168.

67. *Bone mass does not correlate with the serum fibroblast growth factor 23 in hemodialysis patients.* **Ureña-Torres,P.; Friedlander,G; de Vernejoul,M.C.; et,al.** 2008, Kidney Int, Vol. 73, pp. 102-107.

68. *Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho.* **Kurosu,H; Ogawa,Y.; Yamamoto,M.; et,al.;** 10, 2006, J Biol Chem, Vol. 281, pp. 6120-6123.

69. *Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23.* **Urakawa,I.; Yamazaki,Y.; Shimada,T.; et,al.;** . 7120, 2006, Nature, Vol. 444.

70. *Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein.* **Matsumura,Y.; Aizawa,H.; Shiraki-Lida,T.; Nagai,R.; Kuro-o,M.; Nabeshima,Y.** 1998, Biochem Biophys Res Commun, Vol. 242, pp. 626-630.

71. *Secreted klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of klotho protein from cell membrane.* **Imura,A.; Iwano,A.; Tohyama,O.; et,al.** 2004, FEBS Lett, Vol. 565, pp. 143-147.

72. *Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease.* **Gutierrez,O.; Isakova,T.; Rhee,E.; et,al. .** 2005, J Am Soc Nephrol, Vol. 16, pp. 2205-2215.

73. *Clinical significance of FGF-23 measurement in dialysis patients.* **Jongbloed,F.; Galassi,A; Cozzolino,M.; et,al.** 3, 2011, Clin Nephrol, Vol. 76, pp. 201-209.

74. *Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 alpha-hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells.* **krajisnik,T.; Bjorklund,P.; Marsel,R.; et,al.;** 2007, J Endocrinol, Vol. 195, pp. 125-131.

75. *Targeted ablation of FGF-23 demonstrates an essential physiological role of FGF-23 in phosphate and vitamin D metabolism.* **Shimada,T.; Kakitani,M.; Yamazaki,Y.; et,al.** 2004, J Clin Invest, Vol. 113, pp. 561-568.

76. *The fibroblast growth factor 23: a new player in the field of cardiovascular, bone and renal disease.* **Cozzolino,M.** 3, *Curr Vasc Pharmacol*, Vol. 8, pp. 404-411.
77. *High levels of serum fibroblast growth factor (FGF)-23 are associated with increased mortality in long haemodialysis patients.* **Jean,G.; Terrat,J-C.; Vanel,T.; et,al.** 2009, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 24, pp. 2792-2796.
78. *Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney diseases.* **Gutierrez,O.; Jannuzi,J.L.; Isakova,T.; et,al.;** 2009, *Circulation*, Vol. 119, pp. 2545-2552.
79. *Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis.* **Gutierrez,O.M.; Mannstadt,M.; Isakova,T.; et,al.;** 6, 2008, *N Engl J Med*, Vol. 359, pp. 640-642.
80. *Clinical relevance of FGF23 in chronic kidney disease.* **Seiler,S.; Heine,G.H.; Fliser,D.** 2009, *Kidney Int*, Vol. 114, pp. S34-S42.
81. *FGF-23 and vascular dysfunction in patients with stage 3 and 4 chronic kidney disease.* **Yilmaz,M.; Sonmez,A.; Saglam,M.; et,al.;** 2010, *Kidney Int*, Vol. 78, pp. 678-685.
82. *Phosphate may promote CKD progression and attenuate renoprotective effect of ACE inhibition.* **Zoccali,C; Ruggenti,P.; Perna,A.; et,al.** 2011, *J Am Soc Nephrol*, Vol. 22, pp. 1923-1930.
83. *FGF-23 associates with death, cardiovascular events, and initiation of chronic dialysis.* **Kendrick,J.; Cheung,A.K.; Kaufman,J.S.; et,al.** 2011, *J Am Soc Nephrol*, Vol. 22, pp. 1913-1922.
84. *Fibroblast growth factor 23 and fetuin A are independent predictors for the coronary artery disease extent in mild chronic kidney disease.* **Kanbay,M.; Nicoleta,M.; Selcoki,Y.; et,al.;** . 2010, *Clin J Am Soc Nephrol*, Vol. 10, pp. 1780-1786.
85. *Fibroblast growth factor (FGF)-23 and fetuin-A in calcified carotid atheroma.* **Voigt,M.; Fisher,D-C; Rimpau,M.; Schareck,W.; Haffner,D.** 6, 2010, *Histopathology*, Vol. 56, pp. 775-788.
86. *ACE inhibition and fibroblast growth factor in cultured human vascular smooth muscle.* **Tang,L.; Both,K.; Taylor,R.** 1999, *Vasc Med*, Vol. 4, pp. 129-134.
87. *Dietary phosphorous acutely impairs endothelial function.* **Shuto,E.; Taketani,Y.; Tanaka,R.; et,al.** 2009, *J Am Soc Nephrol*, Vol. 20, pp. 1504-1512.
88. *Vitamin D inhibition of TACE and prevention of renal osteodystrophy and cardiovascular mortality.* **Dusso,A.; Arcidiacono,M.V.; Yang,J.; Tokumoto,M.** 2010, *J Steroid Biochem Mol Biol*, Vol. 121, pp. 193-198.

89. *Sclerostin: current knowledge and future perspectives.* **Moester,M.J.; Papapoulos,S.E.; Lowik,C.W.; van Bezooijen,R.L.** 2010, *Calc Tissue Int*, Vol. 87, pp. 99-107.
90. *Characterization of the structural features and interactions of sclerostin: molecular insight into a key regulator of Wnt-mediated bone formation.* **Veverka,V.; Henry,A.J.; Slocombe,P.M.; et,al.** 2009, *J Biol Chem*, Vol. 284, pp. 10890-10900.
91. *Sclerostin: just one more player in renal bone disease?* **Drüeke,T.B.; Lafage-Proust,M.H.** 2011, *Clin J Am Soc Nephrol*, Vol. 6, pp. 700-703.
92. *Sclerostin and dickkopf-1 in renal osteodystrophy.* **Cejka,D.; Herberth,J.; Branscum,A.J.; et,al.** 2011, *Clin J Am Soc Nephrol*, Vol. 6, pp. 877-882.
93. *Vitamin D deficiency.* **Holick,M.F.** 2007, *N Eng J Med*, Vol. 357, pp. 266-281.
94. *Nutritional approach for inhibiting bone resorption in institutionalized elderly women with vitamin D insufficiency and high prevalence of fracture.* **Bonjour,J.P.; Benoit,V.; Pourchaire,O.; Rousseau,B.; Souberbielle,J-C.** 5, 2011, *J Nutr Health Aging*, Vol. 15, pp. 404-409.
95. *Vitamin D: current status and perspectives.* **Cavalier,E.; Delanaye,P.; Chapelle,J.P.; Souberbielle,J-C.** 2, 2009, *Clin Chem Lab Med*, Vol. 47, pp. 120-127.
96. *KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention and treatment of chronic kidney disease - mineral and bone disorder (CKD-MBD).* **Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group.** Suppl 113, 2009, *Kidney Int*, Vol. 76, pp. S1-S130.
97. *Serum levels of 1,25-dihydroxyvitamin D, 24,25-dihydroxyvitamin D, and 25-hydroxyvitamin D in nondialysed patients with chronic renal failure.* **Ishimura,E.; Nishizawa,Y.; Inaba,M.** 1999, *Kidney Int*, Vol. 55, pp. 1019-1027.
98. *Normal serum vitamin D levels.* **Hollis,B.W.; Wagner,C.L.** 2005, *N Engl J Med*, Vol. 352, pp. 515-516.
99. *Assessment of vitamin D status and definition of a normal circulating range of 25-hydroxyvitamin D.* **Hollis,B.W.** 2008, *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, Vol. 15, pp. 489-494.
100. *Analytical and clinical validation of the 25-OH vitamin D assay for the LIAISON automated analyze.* **Ersfeld,D.L.; Rao,D.S.; Body,J.J.; et,al.** 2004, *Clin Biochem*, Vol. 37, pp. 867-874.
101. *The in vitro evaluation of 25-hydroxyvitamin D3 and 19-nor-1alpha, 25-dihydroxyvitamin D2 as therapeutic agents of prostate cancer.* **Chen, T.C.; Schwartz, G.G.; Burnstein, K.L.; et, al.** 2000, *Clin Cancer Res*, Vol. 8, pp. 19-33.

102. *Association between 25-hydroxyvitamin D deficiency and cardiovascular disease in type 2 diabetic patients with mild kidney dysfunction.* **Chonchol,M.; Cigoloni,M; Targher,G.** 1, 2008, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 23, pp. 269-274.
103. *Estimates of optimal vitamin D status.* **Dawson-Hughes,B.; Heaney,R.P.; Holick,M.F.; Lips,P.; Meunier,P.J.; Vieth,R.** 2005, *Osteoporos Int*, Vol. 16, pp. 713-716.
104. *Vitamin D in chronic kidney disease: A systemic role for selective vitamin D receptor activation.* **Andress,D.L.** 2006, *Kidney Int*, Vol. 69, pp. 33-43.
105. *Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice: role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems.* **Xiang,W.; Kong,J.; Chen,S.; et,al.** 1, 2005, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, Vol. 288, pp. E125-E132.
106. *Mineral metabolism and arterial functions in end stage renal disease: Potential role of 25-hydroxyvitamin D deficiency.* **London,G.M.; Guérin,A.P.; Verbeke,F.H.; et,al.** 2007, *J Am Soc Nephrol*, Vol. 18, pp. 613-620.
107. *25-hydroxyvitamin D3, arterial calcifications and cardiovascular risk markers in haemodialysis patients.* **Matias,P.J.; Ferreira,C.; Jorge,C.; Borges,M.; Aires,I.; Amaral,T.; Gil,C.; Cortez,J.; Ferreira,A.** 24, 2009, *Nephrol Dial Transplant*, pp. 611-618.
108. *Renal function and 25-hydroxyvitamin D concentrations predict parathyroid hormone levels in renal transplant patients.* **Boudville,N.C.; Hodsman,A.B.** 2006, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 21, pp. 2621-2624.
109. *25-Hydroxyvitamin D levels are predictors of morbidity and mortality in hemodialysis patients .* **Matias,P.; Jorge,C.; Ferreira,C.; et,al.** 2011, Abstract n°22797 - American Society of Nephrology Annual Meeting .
110. *Vitamin D and the kidney.* **Holick, M.F.** 1983, *Kidney Int*, Vol. 23, pp. 699-674.
111. *New insights into mineral and skeletal regulation by active forms of vitamin D.* **Hendy,G.N.; Hruska,K.A.; Mathew,S.; Goltzman,D.** 2006, *Kidney Int*, Vol. 69, pp. 218-223.
112. *Calcium, phosphorus and bone in renal disease and transplantation.* **Bricker,N.S.; Slatopolsky,E.; Reiss,E.; et,al.** 1969, *Arch Intern Med*, Vol. 123, pp. 543-553.
113. *Are low plasma levels of 25-(OH) vitamin D a major risk factor for hyperparathyroidism independent of calcitriol in renal transplant patients?* **Lomonte,C.; Antonelli,M.; Vernaglion,L.; et,al.** 2005, *J Nephrol*, Vol. 18, pp. 96-101.
114. *25-hydroxyvitamin D levels and bone histomorphometry in hemodialysis renal osteodystrophy.* **Coen,G; Mantella,D.; Manni,M.; Balducci,A.; Nofroni,I.; Sardella,D.; Ballanti,P.; Bonucci,E.** 68 : s.n., 2005, *Kidney Int*, pp. 1840-1849.

115. *Correlation of bone histology with parathyroid hormone, vitamin D3 and radiology in end-stage renal disease.* **Hutchison,A.J.; Whitehouse,R.W.; Boulton,H.F.; Adams,J.E.; Mawer,E.B.; Freemont,A.J.** 1993, *Kidney Int*, Vol. 44, pp. 1071-1077.
116. *Parathyroid hormone in aluminum bone disease: a comparison of parathyroid hormone assays.* **Andress,D.L.; Endres,D.B.; Ott,S.M.** 2010, *Kidney Int*, Vol. 29, pp. S87-S90.
117. *Clinical Utility of an immunoradiometric assay for parathyroid hormone (1-84) in primary hyperparathyroidism.* **Silverberg,S.; Gao,P.; Brown,I; et al.** 10, 2003, *J Clin Endocrinol Metab*, Vol. 88, pp. 4725-4730.
118. *Inter-method variability in PTH measurements: implication for the care of CKD patients.* **Souberbielle,J-C.; Boutten,A.; Carlier,M-C.; et,al.** 2006, *Kidney Int*, Vol. 70, pp. 345-350.
119. *Interpretation of serum PTH concentrations with different kits in dialysis patients according to the KDIGO guidelines: importance of the reference (normal) values.* **Cavalier,E.; Delanaye,P.; Vranken,L.; Bekaert,A-C; Carlisi,A.; Chapelle,J.P.; Souberbielle,J-C.** 2011, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. Epub ahead of print 22 September.
120. *Biochemical markers of bone turnover in the diagnosis of renal osteodystrophy: what do we have, what do we need?* **Ferreira,A.** 1998, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 13, pp. 29-32.
121. *The parathyroid-calcitriol axis in health and chronic renal failure.* **Slatopolsky,E.; Lopez-Hilker,S.; Delmez,J.; Dusso,A.; Brown,A.; Martin,K.J.** 1990, *Kidney Int*, Vol. 38, pp. S41-S47.
122. *Vitamin D deficiency.* **Holick,M.F.;** 2007, *N Engl J Med*, Vol. 357, pp. 266-281.
123. *Spectrum of renal bone disease in end-stage renal failure patients not yet on dialysis.* **Spasovski,G.B.; Bervoets,A.R.; Behets,G.J.; et,al.** 2003, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 18, pp. 1159-1166.
124. *Risk of adynamic bone disease in dialysed patients.* **Malluche,H.; Faugere,M.C.** 1992, *Kidney Int*, Vol. 42, pp. S62-S67.
125. *Comparison of intact, midregion and carboxy terminal assays of parathyroid hormone for the diagnosis of bone disease in hemodialyzed patients.* **Cohen-Solal,M.E.; Sebert,j.L.; Boudailliez,B.; et al.** 1991, *J Clin Endocrinol Metab*, Vol. 71, pp. 516-524.
126. *Renal bone disease in pediatric and young adult patients on hemodialysis in a children's hospital.* **Mathias,R.; Salusky,I.; Harman,W.; et,al.** 1993, *J Am Soc Nephrol*, Vol. 3, pp. 1938-1946.

127. *Biochemical markers of renal osteodystrophy in pediatric patients undergoing CAPD/CCPD.* **Salusky,I.B.; Ramirez,J.A.; Oppenheim,W.; et,al.** 1994, *Kidney Int*, Vol. 45, pp. 253-258.
128. *A utilidade da biopsia óssea com histomorfometria na caracterização da osteodistrofia renal.* **Ferreira,A.; Carvalho,F.; Coelho,A.; Felicíssimo,P.; Galvão,M.J.; da Costa,M.** 1993, *Rev Port Nefrol Hipert*, Vol. 7, pp. 69-82.
129. *Effects of sevelamer hydrochloride and calcium carbonate on renal osteodystrophy in hemodialysis patients.* **Ferreira,A.; Frazão,J.M.; Monier-Faugere,M-C.; Gil,C.; Galvão,J.; Oliveira,C.; Baldaia,J.; Rodrigues,I.; Santos,C.; Ribeiro,S; Hoenger,R.M.; Duggal,A.; Malluche,H.H.** 2008, *J Am Soc Nephrol*, Vol. 19, pp. 405-412.
130. *New lessons from old assays: parathyroid hormone (PTH), its receptors, and the potencial biological relevance of PTH fragments.* **Goodman,W.G.; Salusky,I.B.; Jüpnier,H.** 2002, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 17, pp. 1731-1736.
131. *New assays for parathyroid hormone (PTH) and the relevance of PTH fragments in renal failure.* **Goodman,W.G.** 2003, *idney Int*, Vol. 87, pp. S120-S124.
132. *Accumulation of a non-(1-84) molecular form of parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH assay in renal failure: importance in the interpretation of PTH values.* **Brossard,J.H.; Cloutier,M.; Roy,L.; Lepage,R.; Gascon-Barre,M.; D'Amour,P.** 1996, *J Clin Endocrinol Metab*, Vol. 81, pp. 3923-3929.
133. *Administration of PTH-(7-84) antagonizes the effects of PTH-(1-84) on bone in rats with moderate renal failure.* **Langub,M.C.; Monier-Faugere,M-C.; Wang,G.; et,al.** 4, 2003, *Endocrinology*, Vol. 144, pp. 1135-1138.
134. *Parathyroid hormone 7-84 induces hypocalcemia and inhibits the parathyroid hormone 1-84 secretory response to hypocalcemia in rats with intact parathyroid glands.* **Huan,J.; Olgaard,K.; Nielsen,L.B.; Lewin,E.** 2006, *J Am Soc Nephrol*, Vol. 17, pp. 1923-1930.
135. *Variation in serum and plasma PTH levels in second-generation assays in hemodialysis patients: a cross sectional study.* **Joly,D; Drüeke,T.; Alberti,C; Houillier,P.; Lawson-Body,E; Martin,K.J.; Massart,C.; Moe,S.M.; Monge,M; Souberbielle,J-C.** 2008, *Am J Kidney Dis*, Vol. 51, pp. 987-995.
136. *Development of a novel immunoradiometric assay exclusively for biological active whole parathyroid hormone 1-84: Implications for improvement of accurate assesment of parathyroid function.* **Gao,P.; Scheibel,S.; D'Amour,P.** 4, 2001, *J Bone Min Metab*, Vol. 16, pp. 605-614.
137. *Sensitivity and Specificity of Guideline PTH Targets To Differentiate High and Low Bone Turnover.* **Sharon M. Moe, Ezequiel R. Bellorin-Font, Aluizio B. Carvalho, Patrick C. D'Haese, Tilman B. Drueke, Hongyan Du, Manuel A. Ferreira, Hartmut H. Malluche, Stuart M. Sprague, Vanda Jorgetti.** 2010, *Renal Week 2010*, pp. SA-PO2926.

138. *International Assessment of TMV Classification of Bone Biopsy in ESKD.* **Stuart M. Sprague, Hongyan Du, Thomas L. Manley, Aluizio B. Carvalho, Patrick C. D'Haese, Tilman B. Drueke, Manuel A. Ferreira, Vanda Jorgetti, Sharon M. Moe, Hartmut H. Malluche, Ezequiel R. Bellorin-Font.** 2010, ASN-Renal Week 2010, pp. SA-PO2933.
139. *Predictive Value of Biomarkers for Bone Turnover in ESKD.* **Hartmut H. Malluche, Ezequiel R. Bellorin-Font, Eudocia Rojas, Aluizio B. Carvalho, Patrick C. D'Haese, Tilman B. Drueke, Manuel A. Ferreira, Vanda Jorgetti, Sharon M. Moe, Stuart M. Sprague.** 2010, ASN-Renal Week 2010, pp. SA-PO2924.
140. *Improved assessment of bone turnover by the PTH-(1-84) large C-PTH fragments ratio in ESRD patients.* **Monier-Faugere, M.-C.; Geng, Z.P.; Mawad, H.; Friedler, R.M.; Gao, P.; Cantor, T.L.; Malluche, H.** 2001, *Kidney Int*, Vol. 60, pp. 1460-1468.
141. *Intact PTH combined with the PTH ratio for diagnosis of bone turnover on dialysis patients: a diagnostic test study.* **Herberth, J.; Branscum, A.J.; Mawad, H.; Cantor, T.; Monier-Faugere, M.-C.; Malluche, H.H.** 2010, *Am J Kidney Dis*, Vol. 55, pp. 897-906.
142. *Parathyroid hormone and large related C-terminal fragments increase at different rates with worsening of renal function in chronic kidney disease patients.* **Donadio, C.; Ardini, M.; Lucchesi, A.; Donadio, E.; Cantor, T.** 2007, *Clin Nephrol*, Vol. 67, pp. 131-139.
143. *Changes in total parathyroid hormone (PTH), PTH-(1-84) and large C-PTH fragments in different stages of chronic kidney disease.* **Herberth, J.; Fahrleitner-Pammer, A.; Obermayer-Pietsch, B.; et, al.** 2006, *Clin Nephrol*, Vol. 65, pp. 328-334.
144. *Opposite effects of calcitriol and paricalcitol on the parathyroid hormone.(1-84)/large carboxy-terminal-parathyroid hormone fragments ratio in patients with stage 5 chronic kidney disease.* **Monier-Faugere, M.-C.; Mawad, H.; Malluche, H.H.** 2007, *Clin J Am Soc Nephrol*, Vol. 2, pp. 1255-1260.
145. *Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol triphosphates and increases intracellular free calcium.* **Abou-Samra, A.-B.; Jüpnier, H.; Force, T.** 1992, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 89, pp. 2732-2736.
146. *The renal PTH/PTHrP receptor is down-regulated in rats with chronic renal failure.* **Ureña, P.; Kubrusly, M.; Mannstadt, M.; Hrubby, M.; Trinh, M.M.; Silve, C.; et, al.** 1994, *Kidney Int*, Vol. 45, pp. 605-611.
147. *Down-regulation of the PTH/PTHrP receptor in uremia.* **Ureña, P.; Mannstadt, M.; Hrubby, M.; Ferreira, A.; Segre, G.V.; Drüeke, T.** 1994, *J Bone Min Metab*, Vol. 12, pp. S87-S90.

148. *Parathyroidectomy does not prevent the renal PTH/PTHrP receptor down regulation in uremic rats.* **Ureña,P.; Mannstadt,M.; Hruby,M.; Ferreira,A.; Schmitt,F.; Silve,C.; Ardailou,R.; Lacour,B.; Abou-Samra,A.-B.; Segre,G.V.; Drüeke,T.** 1995, *Kidney Int*, Vol. 47, pp. 1797-1805.
149. *24,25-Dihydroxy vitamin D3 treatment inhibits parathyroid-stimulated adenylate cyclase in iliac crest biopsies from uremic patients.* **Mortensen,B.M.; Aarseth,H.P.; Ganss,R.; Haug,E.; Gautvik,K.M.; Gordeladze,J.O.** 1993, *Bone*, Vol. 14, pp. 125-131.
150. *Phosphate and FGF-23.* **Jüppner,H.** Suppl 121, 2011, *Kidney Int*, Vol. 79, pp. S24-S27.
151. *Dynamics of skeletal resistance to parathyroid hormone in the rat: effect of renal failure and dietary phosphorus.* **Bover,J.; Jara,A.; Trinidad,P.; Rodrigez,M.; Felsenfeld,A.J.** 3, 1999, *Bone*, Vol. 25, pp. 279-285.
152. *PTH/PTHrP receptor mRNA is down-regulated in epiphyseal cartilage growth plate of uremic rats.* **Ureña,P.; Ferreira,A.; Morieux,C.; Drüeke,T.; Vernejoul,M.-C.** 1996, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 11, pp. 2008-2016.
153. *Parathyroid receptor gene expression by epiphyseal growth plates in rickets and tibial dyschondroplasia.* **Ben-Bassat,S.; Genina,O.; Lavelin,I.; Leach,R.M.; Pines,M.** 1, 1999, *Mol Cel Endocrinol*, Vol. 149, pp. 185-195.
154. *Structure of the human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase gene.* **Weiss,M.J.; Junal,R.; Henthorn,P.S.; Kadesch,T.; Harris,H.** 1988, *J Biol Chem*, Vol. 263, pp. 12002-12010.
155. *The human alkaline phosphatases: What we know and what we don't know.* **Harris,H.** 1989, *Clin Chem Acta*, Vol. 180, pp. 177-188.
156. *A search for trace expression of placental-like alkaline phosphatase in non-malignant human tissue: demonstration of its occurrence in lung, cervix testis and thymus.* **Goldstein,D.J.; Rogers,C.; Harris,H.** 1982, *Clin Chem Acta*, Vol. 125, pp. 63-75.
157. *Isolation and characterization of a cDNA encoding a human liver/bone/kidney-type alkaline phosphatase.* **Weiss,M.J.; Henthorn,P.S.; Lafferty,M.A.; Slaughter,C.; Raducha,M.; Harris,H.** 1986, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 84, pp. 7182-7186.
158. *Evidence that three structural genes code for human alkaline phosphatase.* **Seargent,L.E.; Stinson,R.A.** 1979, *Nature*, Vol. 281, pp. 152-154.
159. *Alkaline phosphatase isoenzymes: recent progress.* **Fishman,W.H.** 1990, *Clin Biochem*, Vol. 23, pp. 99-104.
160. *Circulating biochemical markers of bone remodeling in uremic patients.* **Ureña,P.; de Vernejoul,M.C.** 6, 1999, *Kidney Int*, Vol. 55, pp. 2141-2156.

161. *Low serum levels of alkaline phosphatase of bone origin: a good marker of adynamic bone disease in haemodialysis patients.* **Couttenye,M.M.; D'Haese,P.; Van Hoof,V.O.** 1996, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 11, pp. 1065-1072.
162. *Bone alkaline phosphatase isoenzyme in renal osteodystrophy.* **Jarava,C.; Armas,J.R.; Salgueira,M.; Palma,A.** 3, 1996, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 11, pp. 43-46.
163. *The preparation of monoclonal antibodies which react preferentially with human bone alkaline phosphatases and not liver alkaline phosphatase.* **Hill,C.S.; Wolfert,R.L.** 1989, *Clin Chem Acta*, Vol. 186, pp. 315-320.
164. *Isoforms of bone alkaline phosphatase: characterization and origin in human trabecular and cortical bone.* **Magnusson,M.; Larsson,L.; Magnusson,P.; Davie,M.W.J.; Sharp,C.A.** 1999, *J Bone Miner Res*, Vol. 14, pp. 1926-1933.
165. *Effect of chronic renal failure on bone turnover and bone alkaline phosphatase isoforms.* **Magnusson,P.; Sharp,C.A.; Magnusson,M.; Risteli,J.; Davie,M.W.J.; Larsson,L.** 2001, *Kidney Int*, Vol. 60, pp. 257-265.
166. *Analysis of human bone alkaline phosphatase isoforms: comparison of isoelectric focusing and ion-exchange high-performance liquid chromatography.* **Sharp,C.A.; Linderr,C.; Magnusson,P.** 2007, *Clinica Chimica Acta*, Vol. 379, pp. 105-112.
167. *Plasma total versus bone alkaline phosphatase as markers of bone turnover in hemodialysis patients.* **Ureña,P.; Hruby,M.; Ferreira,A.; Ang,K.S.; de Vernejoul,M.C.** 1996, *J Am Soc Nephrol*, Vol. 7, pp. 1-7.
168. *High prevalence of adynamic bone disease diagnosed by biochemical markers in a wide sample of the European CAPD population.* **Couttenye,M.M.; D'Haese,P.; Deng,J.; Vanhoof,V.O.; Verpooten,G.; De Broe,M.E.** 1997, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 12, pp. 2144-2150.
169. *Hypokinetic azotemic osteodystrophy.* **Cannata-Andía,J.** 1998, *Kidney Int*, Vol. 54, pp. 1000-1016.
170. *Bone alkaline phosphatase besides intact parathyroid hormone in hemodialysis patients - any advantage?* **Jorge,C.; Gil,C.; Possante,C.; et,al.;** *Nephron*, Vol. 101, pp. 122-127.
171. *Disorders of bone and mineral metabolism after renal transplantation.* **Massary,P.** 1997, *Kidney Int*, Vol. 54, pp. 1412-1421.
172. *Serum bone alkaline phosphatase is superior to plasma levels of bone matrix proteins for assessment of bone metabolism in patients receiving renal transplants.* **Withold,W.; Friedrich,W.; Degenhardt,S.; et,al.;** 1997, *Clin Chem Acta*, Vol. 261, pp. 105-115.

173. *Vitamin K2 enhances osteocalcin accumulation in the extracellular matrix of human osteoblasts in vitro.* **Koshihara,Y.; Hoshi,K.** 1997, J Clin Endocrinol Metab, Vol. 12, pp. 431-458.
174. *Bone health of adult hemodialysis patients is related to vitamin K status.* **Kohlmeier,M.; Saupe,J.; Shearer,M.; Schaefer,K.; Asmus,G.** 1997, Kidney Int, Vol. 51, pp. 1218-1221.
175. *Measurement of serum osteocalcin with a human-specific two-site immunoradiometric assay.* **Garnero,P.; Grimaux,M.; Demiaux,P.; et,al.** 1992, J Bone Min Res, Vol. 12, pp. 138-1398.
176. *Coagulation meets calcification: the vitamin K system.* **Westenfeld,R.; Shurgers,L.; Brandenburg,V.; et,al.** 2, 2009, Vol. 32, pp. 67-74.
177. *Vascular calcifications: pathogenesis, management and impact on clinical outcomes.* **Cannata-Andía,J.; Rodriguez-Garcia,M; Carrillo-López,N.; Naves Diaz,M.L.; Diaz-Lopez,J.B.** 2006, J Am Soc Nephrol, Vol. 17, pp. S267-S273.
178. *Effect of Vitamin K(2) Supplementation on Functional Vitamin K Deficiency in Hemodialysis Patients: A Randomized Trial.* **Westenfeld,R.; Krueger,T.; Schleiper,G.; et,al.** DEC de 2011, Am J Kidney Dis, p. Dec 9. [Epub ahead of print].
179. *Vascular calcification mechanisms.* **Giachelli,C.M.** 2004, J Am Soc Nephrol, Vol. 15, pp. 2959-2964.
180. *Vascular calcification: a stiff chalange for the nephrologist. Does preventing bone disease cause arterial disease?* **Goldsmith,D.; Ritz,E.; Covic,A.** 2004, Kidney Int, Vol. 66, pp. 1315-1323.
181. *The clinical significance of serum osteocalcin and N-terminal propeptide of type I collagen in predialysis patients with chronic renal failure.* **Tsuchida,T.; Ishimura,E.; Takami,M.; Naoki,M.; Hiroshi,N.; Shuichi,J.; Masaaki,I; Yoshiki,N.** 2005, Osteoporosis Int, Vol. 2, pp. 172-179.
182. *Serum N-terminal midfragment vs. intact osteocalcin immunoradiometric assay as markers for bone turnover and bone loss in hemodialysis patients.* **Nagasue,K.; Inaba,M.; Okuno,S.; Kitatani,K; Imanishi,Y.; Ishimura,E.; Miki,T.; Kim,M.; Nishizawa,Y.** 2, 2003, Biomed Pharmacother, Vol. 57, pp. 98-106.
183. *Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic woman in reponse to alendronate treatment.* **Garnero,P.; Shih,W.J.; Gineyts,E.; Karpf,D.B.; Delmas,P.D.** 1994, J Clin Endocrinol Metab, Vol. 79, pp. 1693-1700.
184. *Serum pyridinoline as a specific marker of collagen breakdown and bone metabolism in hemodialysis patients.* **Ureña,P.; Ferreira,A.; Kung,V.; et,al.** 1995, J Bone Min Res, Vol. 10, pp. 932-939.

185. *A new assay method that detects only intact osteocalcin. Two-step non-invasive diagnosis to predict adynamic bone disease in haemodialysed patients.* **Morishita,T; Nomura,M.; Hanaoka,M.; Saruta,T.; Matsuo,T.; Tsukamoto,Y.** 2000, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 15, pp. 659-667.
186. *Markers of bone metabolism in hemodialysis and hemodiafiltration.* **Jolanta,M.; Piotr,K.; Krystyna,P.; Slawomir,W.; Michal,M.** 5, 2007, *Renal Failure*, Vol. 29, pp. 559-561.
187. *Radioimmunoassay of the carboxyterminal propeptide of human type I procollagen.* **Melkko,J.; Niemi,S.; Risteli,L.; Risteli,J.** 1990, *Clin Chem*, Vol. 36, pp. 1328-1332.
188. *Radioimmunoassay for human procollagen.* **Taubman,M.; Goldberg,G.; Sherr,C.** 1974, *Science*, Vol. 186, pp. 1115-1117.
189. *Procollagen type I C-terminal extension peptide in predialysis chronic renal failure.* **Coen,G.; Mazzaferro,S.; Ballantini,P.; et,al.** 1992, *Am J Nephrol*, Vol. 12, pp. 246-251.
190. *Diagnostic value of serum peptides of collagen synthesis and degradation in dialysis renal osteodystrophy.* **Mazzaferro,S.; Pasquali,M.; Balanti,P.; et,al.** 1995, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 10, pp. 52-58.
191. *Serum type I procollagen peptide: A non-invasive index of bone formation in patients on hemodialysis?* **Hamdy,N.A.T.; Risteli,J.; Risteli,S.; et,al.** 1994, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 9, pp. 511-516.
192. *Urinary excretion of pyridinium crosslinks: a new marker of bone resorption in metabolic bone disease.* **Uebelhart,D.; Gineyts,E.; Chapuy,M.C.; Delmas,P.D.** 1990, *Bone Miner*, Vol. 8, pp. 87-96.
193. *Urinary excretion of pyridinoline crosslinks correlates with bone turnover measured on iliac crest biopsy in patients with vertebral osteoporosis.* **Delmas,P.D.; Schlemmer,A.; Gineyts,E.; et,al.** 1991, *J Bone Min Res*, Vol. 6, pp. 639-644.
194. *Urinary hidroxypyridinium cross-links of collagen in primary hyperparathyroidism.* **Seibel,M.J.; Gartenberg,F.; Silverberg,S.J.** 1992, *J Clin Endocrinol Metab*, Vol. 74, pp. 481-486.
195. *Bone turnover in malnourished children.* **Branca,F.; Robins,S.P.; Ferro-Luzzi,A.; et,al.** 1992, *Lancet*, Vol. 340, pp. 1493-1496.
196. *Serum levels of type I and III procollagen fragments in Paget's disease of bone.* **Simon,L.S.; Krane,S.M.; Wortman,P.D.; et,al.** 1984, *J Clin Endocrinol Metab*, Vol. 58, pp. 110-120.
197. *Urinary pyridinium cross-links as marker of bone resorption in tumor-associated hypercalcemia.* **Body,J.J.; Delmas,P.D.** 1992, *J Clin Endocrinol Metab*, Vol. 74, pp. 481-486.

198. *Pyridinium crosslinks in patients on haemodialysis and continous ambulatory peritoneal dialysis.* **Ibrahim,S.; Mojiminiyi,S.; Barron,J.L.** 1995, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 10, pp. 2290-2294.
199. *An immunoassay for the measurement of free pyridinoline in serum: a marker of bone resorption.* **Kung,V.T.; Gomez,B.; Lungard,R.; Seyedin,S.; Clark,B.; Riggs,L.** 1993, *J Bone Min Res*, Vol. 8, pp. S151-S155.
200. *Diagnostic value of pyridinolic urinary collagen cross-links in hyperparathyroidism of kidney transplant patients.* **Vaccaro,F.; Pagano,A.; Gioviale,M.; et,al.** 1996, *Dial Transplant*, Vol. 25, pp. 132-136.
201. *Useful biochemical markers for diagnosing renal osteodystrophy in predialysis end-stage renal failure patients.* **Bervoets,A.R.; Spasovski,G.B.; Behets,G.J.; et,al.** 5, 2003, *Am J Kidney Dis*, Vol. 41, pp. 997-1007.
202. *Radioimmunoassay for the pyridinoline cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen: A new marker of bone degradation.* **Risteli,J.; Elomaa,I.; Niemi,S.; Novamo,A.; Risteli,L.** 1993, *Clin Chem*, Vol. 39, pp. 635-640.
203. *The carboxy-terminal pyridinoline cross-linked telopeptide of type I collagen in serum as a marker of bone resorption: the effect of nandrolone decanoate and hormone replacement therapy.* **Hassager,C.; Jensen,L.T.; Podenphant,J.; Thomsen,K.; Christiansen,C.** 1994, *Calc Tissue Int*, Vol. 54, pp. 30-33.
204. *Marqueurs biologiques du metabolisme osseux.* **Delmas,P.D.** 1993, *Presse Med*, Vol. 22, pp. 263-268.
205. *Immunoassay of tartrate-resistant acid phosphatase in serum.* **Cheung,C.; Panesar,N.; Haines,C.; Masarei,J.; Swaminathan,R.** 1995, *Clin Chem*, Vol. 41, pp. 679-686.
206. *Correlation between histomorphometric parameters of bone resorption and serum type 5b tartrate-resistant acid phosphatase in uremic patients on maintenance hemodialysis.* **Chu,P.; Chao,T.Y.; Lin,Y.F.; Janckila,A.J.; Yam,L.T.** 5, 2003, *Am J Kidney Dis*, Vol. 41, pp. 1052-1059.
207. *Generation of osteoclastic function in mouse bone marrow cultures: Multinuclearity and tartrate-resistant acid phosphatase are unreliable markers for osteoclastic differentiation.* **Hattersley,G.; Chambers,T.J.** 1989, *Endocrinology*, Vol. 124, pp. 1689-1696.
208. *Tartrate-resistant acid phosphatase 5b and its correlations with other markers of bone mtabolism in kidney transplant recipients and dialyzed patients.* **Malyszko,J.; Pawlak,K.; Wolczynski,S.; Mysliwiec,M.** 2006, *Adv Med Sci* , Vol. 51, pp. 69-72.
209. *Reduction of whole PTH/intact PTH ratio as a predictor of bone metabolism in cinacalcet treatment of hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism.* **Kurajoh,M.; Inaba,M.; Okuno,S.; et,al.** 3, 2011, *Osteoporos Int*, Vol. 22, pp. 1923-1930.

210. *Desferrioxamine test and bone disease in dialysis patients with mild aluminum accumulation.* **de Vernejoul,M.C.; Marchais,L.; London,G.M.** 1989, Am J Kidney Dis, Vol. 14, pp. 124-130.
211. *Hechos y controversias en el diagnostico de certeza de la osteodistrofia renal.* **Douthat,W.; Aguerre,A.A.; Menéndez-Rodriguez,P.** 1993, Rev Port Nefrol Hipert, Vol. 16, pp. 9-19.
212. *New insights and strategies in the diagnosis and treatment of aluminium overload in dialysis patients.* **De Broe,M.E.; D'Haese,P.C.; Couttenye,M.M.; Van Landeghem,G.F.; Lamberts,L.V.** 1993, Nephrol Dial Transplant, Vol. 8, pp. 47-50.
213. *Diagnosis and treatment of aluminium overload in end-stage renal failure patients.* **De Broe,M.E.; Drüeke,T.B.; Ritz,E.** 1993, Nephrol Dial Transplant, Vol. 8, pp. 1-4.
214. *Utilidad de la desferrioxamina en el diagnóstico y en el tratamiento de la intoxicación aluminica.* **Cannata,J.B.** 1992, Nefrologia, Vol. 12, pp. 295-301.
215. *Micellar versus reversed phase liquid chromatography for the determination of desferrioxamine and its chelates with aluminium and iron in uremic serum.* **Menéndez-Fraga,P.; Blaco-González,E.; Sanz-Medel,A.; Cannata-Andía,J.B.** 1997, Talanta, Vol. 45, pp. 25-33.
216. *Ultrafiltrable aluminium after very low doses of desferrioxamine.* **Canteros,A; Diaz-Corte,C; Fernandez-Martin,J.L.; Gago,E.; Fernandez-Merayo,C; Cannata,J.B.** 1998, Nephrol Dial Transplant, Vol. 13, pp. 1538-1542.
217. *Use of desferrioxamine "microdose" to chelate aluminum in hemodialysis patients.* **Jorge,C.; Gil,C.; Possante,M.; Catarino,M.C.; Cruz,A; Andrade,R.; Teixeira,R.; Santos,N.; Ferreira,A.** 1999, Clin Nephrol, Vol. 5, pp. 335-336.
218. **Ferreira,A.; Frazão,J.M.; Monier-Faugere,M-C.; Gil,C.; Galvão,J.; Oliveira,C.; Baldaia,J.; Rodrigues,I.; Santos,C.; Ribeiro,S; Hoenger,R.M.; Duggal,A.; Malluche,H.H.**
219. *K/DOQI-recommended intact PTH levels do not prevent low-turnover bone disease in hemodialysis patients.* **Barreto,F.C.; Barreto,D.V.; Moysés,R.M.A.; et,al.** 2008, Kidney Int, pp. 771-777.
220. *K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease.* **National Kidney Foundation,.** 2003, Am J Kidney Dis, pp. S70-S77.

4 Diagnóstico invasivo da osteodistrofia renal

Como referimos ao longo dos capítulos anteriores, o diagnóstico não invasivo da doença óssea associada à insuficiência renal, baseado apenas na sintomatologia dos doentes, na utilização de exames auxiliares de imagem e em diferentes marcadores bioquímicos da remodelação óssea, apresenta significativas limitações.

Nestas circunstâncias, se queremos ter uma informação precisa, detalhada, com avaliação qualitativa (e eventualmente quantitativa) da remodelação óssea e da respetiva mineralização, temos de realizar uma biopsia óssea de osso não descalcificado (1).

A remodelação óssea é um processo dinâmico, modulado por múltiplos fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, no qual participam diversas hormonas, citocinas e fatores de crescimento.

A “UMO-unidade metabólica óssea” corresponde à estrutura multicelular responsável pela remodelação óssea.

Em resposta à lesão óssea ou a determinados estímulos locais e/ou sistémicos, a UMO entra em atividade e inicia um novo ciclo, respeitando sempre a mesma sequência: 1º) ativação dos osteoclastos; 2º) reabsorção óssea; 3º) recrutamento e ativação dos osteoblastos; 4º) síntese de tecido osteóide; 5º) mineralização do novo osso; e 6º) transformação de alguns osteoblastos em osteócitos (que correspondem a osteoblastos envolvidos por osso mineralizado) (2) (3).

A vida média de uma UMO (correspondendo ao seu ciclo completo) tem uma duração, em condições normais, de aproximadamente 6 meses.

Curiosamente, os osteócitos, desempenham um papel primordial no controlo do metabolismo mineral (mediante, por exemplo, a síntese de FGF-23, como discutido no capítulo 3.1.3) e da remodelação óssea.

São ainda os osteócitos que sintetizam e libertam “esclerostina” para a superfície trabecular, a qual vai inibir a diferenciação das células do estroma ósseo em pré-osteoblastos e em pré-osteoclastos.

Pelo contrário, quando os osteócitos detetam a necessidade de sintetizar mais matriz óssea, interrompem a secreção de “esclerostina” e iniciam a libertação de óxido nítrico, prostaglandinas e fatores de crescimento, os quais conduzem à diferenciação das células mesenquimatosas da medula óssea em pré-osteoclastos (4).

Os pré-osteoclastos são células da linhagem monocítica - macrófaga, que expressam à sua superfície recetores para o ativador do recetor do fator nuclear Kappa-B (RANK) (4).

Os pré-osteoclastos ativados fundem-se entre si e dão origem aos osteoclastos maduros, que são responsáveis pelo processo de reabsorção óssea (2) (4).

A fase de reabsorção óssea de uma UMO dura aproximadamente um mês, seguindo-se um processo de apoptose dos osteoclastos.

A superfície trabecular recentemente sujeita a reabsorção é então preenchida por osteoblastos ativados, que resultam da diferenciação de células pluripotenciais medulares.

Durante cerca de 4 a 5 meses os osteoblastos vão sintetizar tecido osteóide, o qual, em condições normais sofre mineralização, restituindo-se assim o volume ósseo inicial (2).

Finda a fase de formação óssea, a UMO entra num período de repouso, designado “período quiescente”, o qual pode ter uma duração variável entre 2 e 5 anos. Ao conjunto do período quiescente somado das fases de reabsorção e formação óssea, designa-se “período total”.

O valor numérico do inverso do “período total” corresponde a um parâmetro histomorfométrico dinâmico bastante utilizado por alguns grupos, designado “frequência de ativação” (ver abaixo) (5).

A relevância da informação transmitida pela “frequência de ativação” (quando comparada, por exemplo, com a mais frequentemente utilizada “velocidade de formação óssea ou *bone formation rate*”) reside no fato de refletir também a duração do período quiescente.

A biopsia óssea de osso mineralizado, com contagem histomorfométrica, constitui o método de diagnóstico mais fiável da osteodistrofia renal (6). Esta abordagem permite caracterizar os processos de formação e de reabsorção óssea, analisando as consequências dos mesmos e, frequentemente, identificar os mecanismos etiopatogénicos envolvidos.

A avaliação da histologia óssea proporciona, para além da avaliação quantitativa dos elementos celulares envolvidos diretamente na remodelação óssea, obter uma informação qualitativa da estrutura e da organização tridimensional do tecido ósseo (trabecular e cortical) e do espaço intertrabecular onde se processa a eritropoiese (7) (8).

Através da biopsia óssea procede-se igualmente à quantificação e à localização dos depósitos ósseos de metais, com particular relevância para o alumínio (9) (10) (11) e para o ião ferro (1).

Face à inexistência desta alternativa de diagnóstico no nosso país, iniciámos a nossa linha de investigação, precisamente, pela montagem da técnica de biopsia óssea de osso não descalcificado, em Portugal.

Ao longo dos últimos 18 anos, mantivemos, ininterruptamente, a oferta da técnica de biopsia óssea com avaliação histomorfométrica. Realizámos mais de 500 biopsias ósseas no Serviço de Nefrologia do Hospital de Curry Cabral, o que nos coloca entre os 5 centros mundiais, ainda em atividade, com mais biopsias ósseas realizadas em doentes urémicos.

Para além da colheita dos fragmentos ósseos (por abordagem transilíaca), implementámos todos os passos necessários ao diagnóstico invasivo da osteodistrofia renal, incluindo a avaliação quantitativa da histomorfometria óssea.

Após a realização de estágios de média e longa duração no Hôpital Lariboisière, Paris (INSERM Unité 349), Hôpital Necker, Paris (INSERM Unité 90), respetivamente, bem como no Hospital Del Mar, em Barcelona, iniciámos o diagnóstico invasivo da osteodistrofia renal, no Serviço de Nefrologia do Hospital Curry Cabral, em Lisboa.

A técnica da biopsia óssea tem-se desenvolvido no nosso laboratório, não apenas para o diagnóstico da ODR, mas também como suporte ao diagnóstico e terapêutica de patologias de outras especialidades médicas (reumatologia, ortopedia, cirurgia plástica e reconstrutiva, estomatologia, etc.) e à investigação.

Nesta última área, desenvolvemos a técnica de hibridização *in situ* no fémur e tibia de um modelo de rato urémico (após nefrectomia de 5/6 em 2 tempos operatórios), mediante a qual, avaliámos de forma quantitativa, a expressão do recetor da PTH/PTHrP. Os resultados desta investigação, desenvolvida durante o nosso estágio de longa duração em Paris, foram já discutidos, parcialmente, no capítulo 3.1.6.

Após termos realizado e interpretado, no Hospital Curry Cabral, ao longo dos últimos anos, mais de 500 biopsias ósseas em doentes urémicos portugueses, partilhamos a opinião de Malluche, ao defender que a avaliação invasiva da osteodistrofia renal deveria ser utilizada com maior frequência, tendo em conta as limitações dos métodos de imagem e dos marcadores bioquímicos, (discutidas acima e ao longo dos capítulos anteriores) (5) (7) (1).

Esta é, aliás, uma das grandes conclusões, que resultam dos resultados das diferentes componentes da nossa investigação, integradas na presente dissertação.

No mesmo sentido, as orientações do grupo KDIGO, publicadas em 2009, apontam para a necessidade de realizar mais biopsias ósseas, para otimizar o diagnóstico e a terapêutica da ODR (12).

Este objetivo só será atingido mediante a formação e motivação dos nefrologistas, bem como pela desmistificação da ideia de que a biopsia óssea de osso não descalcificado é um método cruento, doloroso e de grande dificuldade técnica.

Desde as fases iniciais da nossa investigação, interessava-nos, prioritariamente, avaliar ou aprofundar os seguintes aspetos:

1. Otimizar as informações e o valor diagnóstico das biopsias ósseas de osso não descalcificado;
2. Proceder ao diagnóstico invasivo da ODR nos doentes portugueses (em fase pré-dialítica, em fase dialítica e após transplantação renal);
3. Avaliar a eficácia, segurança e efeitos sobre o metabolismo ósseo e mineral, de novas alternativas terapêuticas propostas aos doentes urémicos;
4. Integrar a nossa equipa e os nossos resultados em projetos de investigação multicêntricos internacionais, de elevado valor científico;
5. Se possível, e em função dos resultados obtidos, participar ativamente em grupos de trabalho internacionais, responsáveis pela elaboração de princípios e orientações para o diagnóstico e terapêutica da doença óssea e metabólica no doente urémico.

Ao longo do presente capítulo, apresentamos os nossos resultados e o nosso contributo, em relação a cada um destes 5 vetores, que definimos inicialmente para a nossa investigação clínica.

Começámos por selecionar as colorações que mais se adaptavam às nossas necessidades diagnósticas e possibilidades técnicas. Neste sentido, face a quadros de intoxicação maciça e aguda pelo alumínio (ocorrida na década de 90, em Portugal) e a exposições crónicas e frequentes a este metal, fomos repetidamente solicitados a quantificar depósitos ósseos de alumínio (13) (14).

Por este motivo, demos particular relevância a colorações específicas para identificação de depósitos ósseos deste metal, quer na superfície trabecular, quer no interior das trabéculas ósseas. Como veremos, o significado destes dois tipos de depósitos é diverso e implica diferentes opções terapêuticas (ver capítulo 4.1.5).

Para aumentar a sensibilidade e permanência da coloração específica dos depósitos ósseos de alumínio, substituímos a técnica do ácido auritricarboxílico pelo solocromo de azurina.

Esta última, tem como principais vantagens a elevada sensibilidade e a ausência de atenuação do contraste da coloração ao longo do tempo, (o que é de grande relevância para a leitura das lâminas por diferentes observadores ou mesmo, como fizemos recentemente, de forma cruzada entre diferentes laboratórios de histomorfometria) (15).

O solocromo de azurina tem, no entanto, uma importante limitação, que condiciona uma baixa especificidade e que deverá ser sempre considerada: para além de corar os depósitos de alumínio, também evidencia (com a mesma tonalidade, mas menor intensidade) os depósitos ósseos de ferro.

Ao longo da última década, a exposição dos doentes urémicos ao ião ferro foi acentuada, face à administração (via oral e endovenosa) de altas doses deste metal, para otimizar a resposta aos estimuladores da eritropoiese. Por este motivo, passámos a realizar em todos os fragmentos ósseos, colorações específicas para o ião ferro (PERLS-“Perls Prussian blue”) (15) (16).

Cedo nos apercebemos das dificuldades, e do elevado consumo de tempo, inerentes à leitura histomorfométrica de uma biopsia óssea de modo totalmente manual, com grelha colocada na lente ocular (que implicava, em média, cerca de 6 a 8 horas / biopsia).

Apesar de termos lido as primeiras duas centenas de biopsias desta forma, decidimos, a partir dessa fase, otimizar a técnica de leitura histomorfométrica mediante o recurso ao método semiautomático, que passámos a utilizar por rotina.

Para otimizar a quantificação histomorfométrica por método semiautomático, decidimos integrar na nossa rotina de diagnóstico diferentes colorações para as diversas estruturas a serem medidas. Deste modo, quando medimos superfícies e volumes de tecido ósseo cortical ou trabecular, optamos pela coloração de von Kossa. A contagem da superfície osteoblástica é

habitualmente efetuada em lâminas coradas pelo método de tricrómio de Goldner.

Para medirmos a superfície osteoclástica e o número de osteoclastos ativados por área (ou volume) ósseo, necessitámos de incrementar o contraste entre os osteoclastos e as células circundantes, dispostas na superfície trabecular. Com esse objetivo otimizámos os tempos de permanência e de temperatura da reação do corante específico para a fosfatase ácida, enzima expressa pelos osteoclastos (como descrevemos no capítulo 4.1.4.).

A maioria das biopsias que realizámos foram feitas em doentes em programa regular de hemodiálise (IRC estágio 5d). Tendo em conta que menos de 10% da população portuguesa dialisada se encontra em diálise peritoneal, facilmente se entende que tenhamos biopsado poucos doentes sujeitos a esta técnica dialítica.

Tivemos ainda oportunidade de biopsar doentes com IRC moderada, e doentes sujeitos a transplantação renal.

No caso destes últimos, num estudo prospetivo de 6 meses de duração, com dupla biopsia óssea, documentámos uma evolução favorável da formação e da mineralização óssea a par da diminuição da reabsorção e dos depósitos ósseos de alumínio (ver capítulo 4.2.3).

Em todos os casos, observou-se uma evolução no sentido da normalidade, dos parâmetros histomorfométricos da remodelação óssea, da mineralização e dos depósitos ósseos de alumínio.

As diferenças nos parâmetros histomorfométricos não atingiram significado estatístico, o que provavelmente se deveu ao pequeno número de doentes que completaram o estudo (apenas oito) e ao reduzido intervalo de tempo entre as duas biopsias ósseas (seis meses, entre a data da transplantação renal e o sexto mês pós transplantação).

No entanto, a escassez, na literatura médica, de estudos prospetivos com dupla biopsia óssea após transplantação renal, bem como a evolução

concordante de todas as biopsias dos nossos doentes, dão algum relevo aos nossos resultados.

Tendo em conta que o nosso laboratório se mantém, desde há 18 anos, como único centro nacional dedicado à avaliação qualitativa e quantitativa de biopsias ósseas não descalcificadas em doentes urémicos, fomos adquirindo informações relevantes sobre o espectro da osteodistrofia renal em Portugal.

A realização de biopsias ósseas com avaliação histomorfométrica, num tão vasto número de doentes urémicos portugueses, permitiu-nos comparar os dados da nossa população, com os de outros países e outros continentes.

Os efeitos genéticos, epidemiológicos (idade, distribuição por géneros, etc.), nutricionais (deficiência proteica, em fósforo, em vitamina D, etc.), geográficos (exposição solar e níveis de vitamina D ativa variáveis, etc.) e o acesso a diferentes terapêuticas, são apenas alguns dos fatores que podem interferir nos resultados da avaliação histomorfométrica em diferentes zonas (como discutimos no capítulo 4.2.1).

A análise quantitativa de diversos parâmetros histomorfométricos da formação e reabsorção óssea permitiu-nos ainda estabelecer associações inovadoras, mas com grande plausibilidade fisiopatológica, com a utilização de membranas de hemodiálise de diferente biocompatibilidade (ver capítulos 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4) e com os níveis séricos de diversas citocinas e fatores de crescimento, com reconhecida ação nas células envolvidas na remodelação óssea (ver capítulo 5.5).

Foi ainda o recurso à histomorfometria de biopsias ósseas (neste caso, colhidas em doentes franceses, durante o estágio de longa duração que realizámos em Paris, nos Hospitais Lariboisière e Necker), que nos permitiu testar e validar novos marcadores da formação e da reabsorção óssea (ver capítulo 3).

A análise quantitativa da evolução da formação, da reabsorção, da mineralização e do volume ósseo também nos possibilitou avaliar os efeitos, nestes parâmetros histomorfométricos, induzidos por diferentes terapêuticas, utilizadas em doentes hemodialisados.

Exemplos destas linhas de investigação foram as que avaliaram a eficácia e segurança de diferentes alternativas terapêuticas da hiperfosfatemia.

Realizámos 2 estudos aleatorizados, prospetivos, com dupla biopsia óssea, nos quais a terapêutica convencional com carbonato de cálcio foi comparada com o carbonato de lantânio e com o cloridrato de sevelamer. Os resultados e a relevância destes 2 manuscritos são discutidos, seguidamente, nos capítulos 4.3.1 e 4.3.2, respetivamente.

O manuscrito comparando os efeitos do carbonato de cálcio com o cloridrato de sevelamer, no tratamento da hiperfosfatemia e nos efeitos sobre a histomorfometria óssea, foi um dos 2 únicos trabalhos classificados com o “grau de evidência A” pelo painel de peritos da KDIGO (Kidney International 2009; 76 suppl 113, S64: tabela 23 e S112) (17).

Deste modo, esta investigação contribuiu para o estabelecimento dos (inovadores e, pelo menos inicialmente, pouco consensuais) limites de iPTH, propostos pelos peritos da KDIGO, como discutiremos nos capítulos 4.3.2 e 7.

Integramos o núcleo de investigação do KDIGO, que agrega os 5 centros mundiais dedicados à histomorfometria óssea, em atividade, com mais biopsias ósseas realizadas e interpretadas, em doentes urémicos. Nesta equipa de investigadores, temos vindo a correlacionar diferentes marcadores bioquímicos da remodelação óssea (doseados no soro, colhido simultaneamente com o fragmento ósseo) com os resultados histomorfométricos (18) (19) (20).

Pela primeira vez foram analisados, simultaneamente, os dados histomorfométricos de biopsias ósseas de doentes europeus e americanos, os quais foram correlacionados com os resultados das determinações de vários marcadores séricos ou plasmáticos da formação e da reabsorção óssea, quantificadas simultaneamente num único laboratório central (18) (19) (20). Com esta metodologia, foi possível considerar um total de 647 doentes, dos quais 129 foram por nós biopsados e as respetivas biopsias processadas e avaliadas no nosso laboratório. Os resultados preliminares desta investigação são discutidos seguidamente, (no capítulo 4.1.3.).

Como referimos nos capítulos anteriores, as alterações no metabolismo ósseo, associadas à urémia, instalam-se desde fases precoces da evolução da IRC.

Cerca de metade dos doentes com redução do débito do filtrado glomerular (DFG) igual ou superior a 50% já apresentam alterações histológicas ósseas significativas, mais frequentemente caracterizadas por aumento da celularidade, bem como da superfície e volume osteóide (21) (22). Em doentes com DFG igual ou inferior a 30 ml/min, na ausência de qualquer intervenção terapêutica (nomeadamente com vitamina D), observam-se, com frequência, extensas zonas de fibrose peritrabecular e tecido osteóide de aspeto plexiforme (quando observado na luz polarizada) (23).

No entanto, mesmo nesta população com IRC moderada, em fase pré dialítica, também tem vindo a ser descrita uma significativa percentagem de doentes com doença óssea de baixa remodelação (24).

Estes resultados apontam para uma evolução da remodelação óssea desde fases precoces da IRC, para os dois extremos da anormalidade: a doença óssea de elevada remodelação ou a doença óssea adinâmica. Na verdade, quanto mais longa é a evolução da IRC, (sobretudo na ausência de quaisquer intervenções terapêuticas) menor é a probabilidade de ser encontrada uma remodelação óssea normal.

A osteopenia é um dos achados mais frequentes nos doentes com IRC de longa duração, ou integrados, há longo tempo, em programa de diálise crónica. Com o apoio isolado da radiologia é impossível determinar a etiologia desta osteopenia, que se pode observar em grau equivalente, por exemplo, no HPTH 2º, na osteomalácia ou na osteoporose associada a IRC ligeira (25).

De acordo com a proposta da KDIGO, o uso do termo “osteoporose” em doentes urémicos, deverá ser restringido a quadros de IRC ligeira a moderada (IRC estádios 1-3).

Para quadros de IRC mais acentuada, é preferível o termo “CKD-MBD: chronic kidney disease – mineral and bone disorder”, com densidade óssea

diminuída, opção que sublinha a maior relevância dada à especificidade do quadro urémico (12).

Na osteodistrofia renal observam-se, com grande frequência, quadros de grande aumento da remodelação óssea sem variação da densidade óssea total, avaliada por densitometria óssea bifotónica.

Deste modo, o diagnóstico de “osteíte fibrosa” (ver abaixo) pode acompanhar-se de valores de densidade óssea diminuídos, normais ou patologicamente elevados.

Estes aspetos ilustram as limitações da avaliação da densidade óssea no diagnóstico da ODR, e justificam a pouca relevância que os nefrologistas têm dedicado a este método de diagnóstico não invasivo.

Ao contrário do que se observa na população em geral, os valores reduzidos da densidade óssea nos doentes urémicos, não se correlacionam, de forma consistente, com o aumento do risco de fratura, de mortalidade, nem com determinado diagnóstico histológico de ODR (26), o que terá contribuído para que a sua determinação, não seja proposta, por rotina, nesta população (12).

Frequentemente, as alterações no osso cortical mostram evolução oposta à que se observa no osso trabecular.

Por exemplo nos quadros de HPTH 2º, é frequente documentar-se uma redução significativa do osso cortical, acompanhada de manutenção (ou até aumento) do volume ósseo trabecular.

Esta dissociação explica, em grande parte, as diferenças nos resultados obtidos na avaliação da densidade óssea vertebral (predominantemente osso trabecular) em comparação com o colo do fémur (onde predomina o osso cortical) ou o antebraço (quase exclusivamente osso cortical) (27).

A meta-análise de Jamal e colaboradores mostrou que, ao contrário do que se observa na população sem insuficiência renal, a avaliação da densidade óssea do antebraço apresentou um valor preditivo elevado, de risco de fratura, em doentes com IRC severa (fase 5) (28). Pelo contrário, a densidade óssea medida no colo do fémur não se associou a diferente risco de fratura nesta

população (28). Estes resultados traduzem, provavelmente, as diferenças da estrutura tridimensional, da flexibilidade e da resistência óssea, observadas no quadro da IRC severa.

Numa população de 38 hemodialisados (fase 5d) tratados de acordo com as orientações KDOQI, o nosso grupo de investigadores, avaliou os resultados da densidade óssea vertebral, ao nível da coluna lombar (com predomínio de osso trabecular) e no colo do fémur (onde predomina o osso cortical) (29). As avaliações da densidade óssea foram correlacionadas com as medições histomorfométricas de volume ósseo trabecular e volume ósseo cortical, medidas nas biopsias ósseas.

Os resultados, ajustados para a idade e tempo de diálise, mostraram que a densidade óssea do colo do fémur se correlacionou, significativamente, com o volume ósseo cortical.

Pelo contrário, a ausência de correlações entre a densidade óssea da coluna lombar e os parâmetros histomorfométricos, ilustra, uma vez mais, a pouca utilidade desta avaliação nos doentes com IRC em fase 5.

A utilização de tomografia computadorizada quantitativa, de alta resolução, permite distinguir o osso cortical do osso trabecular e, deste modo, avaliar separadamente a densidade de cada um destes tecidos.

Possibilita ainda obter reconstruções e medições tridimensionais (30). No entanto, os resultados deste método não invasivo, ainda não foram validados pela histomorfometria óssea.

A tomografia computadorizada quantitativa de alta resolução, caracterizou, de forma significativamente diferente, a estrutura e densidade ósseas de 32 doentes com IRC que sofreram fratura (em comparação com a avaliação de 59 doentes sem fratura) (31).

Os doentes que sofreram fratura apresentavam diminuição da área de osso cortical, e da espessura óssea cortical e trabecular no rádio e na tíbia. Este grupo de doentes tinha ainda menor número de trabéculas ósseas e maior espaço intertrabecular na avaliação feita no antebraço (rádio).

Importa, no entanto, sublinhar, que estes resultados foram obtidos numa população com uma IRC moderada (a mediana do DFG no grupo com fraturas era de 33 ml/min) (31).

Torna-se agora necessário validar esta avaliação por tomografia computadorizada quantitativa de alta resolução, em doentes integrados em programas de diálise crónica, e após transplantação renal.

Estes resultados, no seu conjunto, apontam para a relevância da manutenção de um volume ósseo adequado e da preservação da normal arquitetura trabecular, de modo a reduzir o risco de fratura.

Para além da avaliação imagiológica acima referida, também a utilização dos marcadores bioquímicos da remodelação óssea (discutidos pormenorizadamente no capítulo anterior) apresentam uma sensibilidade e especificidade reduzidas, no diagnóstico dos diversos tipos de patologia óssea, observada no quadro urémico.

A informação que obtemos com estes meios auxiliares de diagnóstico, é frequentemente escassa, e de difícil interpretação, quando pretendemos aplicar os resultados a doentes específicos.

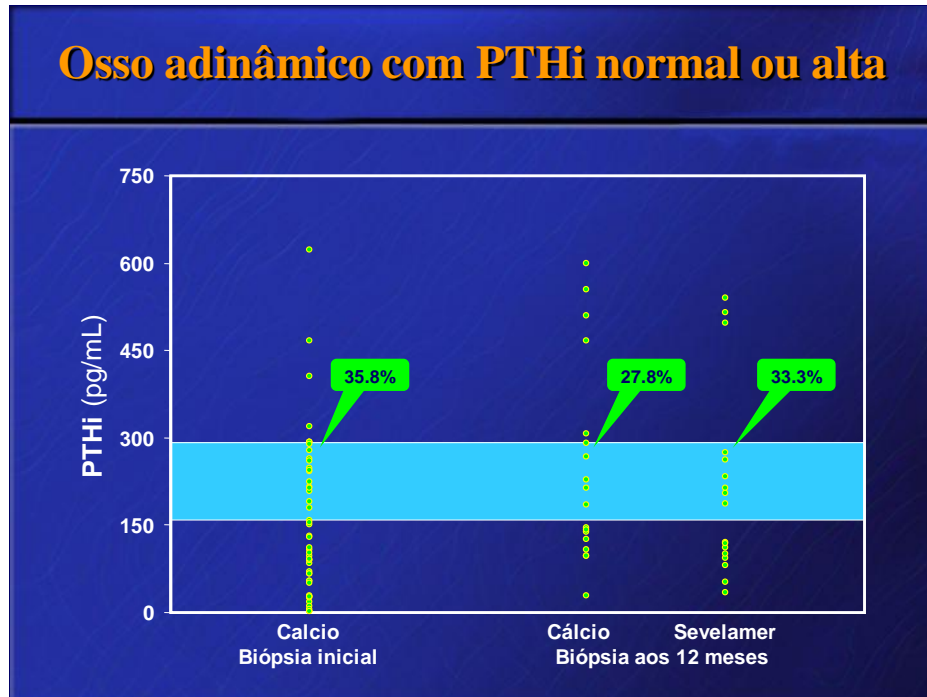
Qi e colaboradores, por exemplo, não conseguiram antecipar o grau de remodelação óssea nem o diagnóstico histológico, em cerca de 30% dos seus doentes, apenas com base nos níveis séricos de iPTH.

Estes autores recomendaram a realização de uma biopsia óssea, antes de iniciar terapêutica substitutiva com vitamina D, em todos os doentes com níveis de iPTH entre 65 e 450 pg/mL (32).

Embora nos pareça exagerada esta proposta, visto que obrigaria a realizar uma biopsia óssea, na maioria dos doentes dialisados, reconhecemos que estes limites de iPTH sérica se podem associar a qualquer diagnóstico histológico.

Também nós, recentemente, numa população de doentes tratados de acordo com as orientações KDOQI, encontramos níveis séricos de PTH intacta, normais ou elevados, em cerca de 1/3 dos doentes com doença óssea adinâmica

(ver figura abaixo), o que ilustra as limitações do diagnóstico não invasivo da doença óssea e metabólica no doente urémico (33).



Estes resultados surpreendentes, sobretudo quando obtidos numa população de hemodialisados, que manteve um rigoroso controlo da fosfatemia e da calcemia ao longo de 12 meses, e que foi tratada de acordo com as indicações KDOQI, sublinham a relevância da biópsia óssea na caracterização da osteodistrofia renal.

Como referimos no capítulo anterior, Barreto e colaboradores obtiveram resultados em total concordância com os descritos por nós, quer no que respeita à elevada prevalência de doença óssea adinâmica, quer na reduzida sensibilidade e especificidade da iPTH na caracterização da remodelação óssea (34).

Em 97 biópsias realizadas com o mesmo intervalo (dupla biópsia óssea, com um ano de intervalo) e igualmente em doentes tratados de acordo com os

objetivos KDOQI, os referidos autores encontraram doença óssea de baixa remodelação em 1/3 dos doentes com iPTH superior a 150 pg/ml (34).

4.1 Técnica da biopsia óssea com histomorfometria

Como já referimos, na nossa unidade, efetuámos mais de 500 biopsias ósseas, todas em regime de ambulatório, não havendo a registar qualquer morbilidade significativa.

A colheita do fragmento ósseo (que realizamos por abordagem transilíaca), deve ser feito por técnicos experientes, após correta anestesia do perióstio externo e interno (este último passo constitui o aspeto técnico mais relevante), em bloco operatório e com o maior rigor asséptico.

Após as primeiras 100 biopsias em que utilizámos um trocarte de Bordier, com 8 mm de diâmetro, passámos a utilizar um trocarte de Bordier modificado, com apenas 5 mm de diâmetro.

Apesar das menores dimensões do cilindro ósseo obtido com esta opção (a que se associa, obviamente, menor traumatismo), não se registou qualquer compromisso da potencialidade diagnóstica desta técnica invasiva.

Pelo contrário, na nossa experiência, a utilização de um trocarte de menor diâmetro, permite conservar a estrutura óssea tridimensional e obter leituras histomorfométricas mais fidedignas.

Utilizámos sempre a técnica de punção manual, apesar de termos disponível uma broca elétrica, que apenas utilizámos num doente na faixa pediátrica, sujeito a anestesia geral.

Na nossa experiência pessoal, a técnica de punção manual é muito menos dolorosa, provoca menos vibração e permite uma adequação da força de torção e de corte, à rigidez do tecido ósseo.

Por estas razões, esta é a abordagem técnica que propomos para o diagnóstico invasivo da osteodistrofia renal, e a que temos vindo a difundir em várias ações de formação nacionais (incluindo a elaboração de um filme,

difundido pela Sociedade Portuguesa de Nefrologia) e internacionais (com o apoio da ERA-EDTA: European Renal Association – European Dialysis and Transplant Association).

Na ausência de compromisso da coagulação (e caso seja feita a redução da anticoagulação nas sessões de hemodiálise prévia e posterior à realização da biopsia, nos doentes anticoagulados) não é de esperar mais do que um eventual pequeno hematoma no local da punção.

Tendo em conta que se trata de um método de diagnóstico invasivo, moroso (a leitura com exame histomorfométrico quantitativo completo demora cerca de 4 horas/biopsia, mesmo com recurso à leitura semiautomática) e dispendioso, devem ser otimizadas as informações obtidas.

Especial cuidado deve ser dispensado à marcação com tetraciclina, passo fundamental para a avaliação *dinâmica* da remodelação óssea (ver abaixo). A motivação dos doentes e o rigor na administração da tetraciclina, de acordo com o calendário proposto, são imprescindíveis para a obtenção de resultados fiáveis.

4.1.1 Histomorfometria óssea e definição dos diagnósticos histológicos

Após a colheita, o fragmento ósseo é fixado, desidratado e posteriormente impregnado e incluído, em metilmetacrilato.

O bloco assim obtido, de elevada dureza e resistência, é posteriormente cortado com facas de tungsténio em cortes finos de 5 e 10 µm de espessura.

Estes cortes são corados com diferentes colorações, específicas para otimizar cada uma das estruturas que pretendemos avaliar.

Habitualmente, utilizamos como colorações de rotina, o azul de toluidina, o tricrómio de Goldner, o von Kossa, a fosfatase ácida (para a coloração seletiva dos osteoclastos) e colorações específicas para a identificação dos depósitos de

alumínio (ácido auritricarboxílico e solocromo de azurina) e dos depósitos de ferro (usando o “Perls Prussian blue”).

Finalmente, observamos cortes mais espessos, de 10 μm de espessura, na luz ultravioleta, para identificar as marcações pelas tetraciclinas (ver abaixo). Esta avaliação permite-nos quantificar os parâmetros dinâmicos da formação e da mineralização óssea.

Na maioria dos casos, a avaliação qualitativa dos diversos aspetos da biopsia óssea (elementos celulares, volume ósseo, tecido osteóide, estrutura óssea, áreas de fibrose, localização e extensão dos depósitos de alumínio, e de ferro, marcações pela tetraciclina, etc.) são suficientes para o diagnóstico e para suportar uma intervenção terapêutica adequada (35) (7).

Quando realizamos histomorfometria completa, quantificamos, habitualmente, os seguintes parâmetros estáticos (expressos de acordo com a nomenclatura internacional uniformizada (36)):

- Volume ósseo (BV/TV) (%): percentagem total de volume de osso trabecular, ocupado por tecido ósseo mineralizado e não mineralizado;
- Volume osteóide (OV/BV) (%): percentagem de volume ósseo ocupado pelo tecido osteóide (tecido ósseo não mineralizado);
- Espessura osteóide (O.Th.) (μm): espessura média das bordaduras osteoides
- Fibrose (FB:V): percentagem do volume ósseo total ocupado por fibrose;
- Superfície osteóide (OS/BS) (%): percentagem da superfície trabecular coberta por tecido osteóide;
- Superfície de reabsorção (ES/BS) (%): percentagem de superfície trabecular com lacunas de Howship (correspondendo a zonas onde ocorreu previamente, ou ainda está em curso, um processo de reabsorção óssea);
- Superfície osteoblástica (Ob.S/BS) (%): percentagem da superfície trabecular coberta por tecido osteóide e osteoblastos;

- Superfície osteoclástica (Oc.S/BS) (%): percentagem da superfície trabecular coberta por osteoclastos;
- Número de osteoclastos (Oc.N/BS): número de osteoclastos por mm² da superfície óssea esponjosa.

e os seguintes parâmetros dinâmicos:

- Superfícies com marcação simples (sLS/BS) (%): percentagem da superfície trabecular com marcações;
- Superfícies com dupla marcação (dLS/BS) (%): percentagem da superfície trabecular com marcações duplas;
- Superfície de mineralização (MS/BS) (%): definida pela soma da extensão das duplas marcações com metade da extensão das marcações simples e expresso como percentagem da superfície óssea;
- Velocidade de aposição mineral (MAR) (µm/dia): distância entre 2 pontos médios de 2 marcações pela tetraciclina adjacentes (na mesma zona da superfície trabecular);
- Velocidade de formação óssea (BFR/BS) (µm³/µm²/dia): o volume de novo tecido ósseo adequadamente mineralizado, referenciado à área trabecular. Determina-se através do produto da velocidade de aposição mineral pelo total das superfícies marcadas pelas tetraciclinas;
- Frequência de ativação (Acf): relaciona-se com o BFR, mas também depende da quantidade de osso formado, em cada zona, durante um ciclo completo (como discutido acima, inclui as fases de reabsorção, de formação e a fase quiescente). Calcula-se dividindo o BFR pela espessura osteóide;
- Velocidade de aposição ajustada (Aj.AR) (µm/dia): corresponde à velocidade de aposição mineral (MAR) corrigida para a superfície osteóide;

- Tempo de maturação osteóide (OMt): corresponde ao quociente da espessura osteóide pela distância entre as marcações pelas tetraciclina (por dia);
- Intervalo de mineralização (Mlt): intervalo médio entre a deposição de matriz osteóide e a respetiva mineralização; obtém-se este parâmetro, ajustando o OMt à percentagem de superfície osteóide que expressa marcações pela tetraciclina;
- Velocidade de mineralização osteóide (OMR): o valor recíproco do intervalo de mineralização (Mlt).

Nos últimos anos, tem vindo a ser dada importância crescente a parâmetros histomorfométricos que refletem o volume ósseo cortical (frequentemente subvalorizado na histomorfometria convencional) e a qualidade do osso trabecular (espessura trabecular e distância intertrabecular).

Estes dados das biopsias ósseas merecem particular destaque na nova classificação “TMV” proposta pela KDIGO (ver capítulo 4.1.3.).

A biopsia óssea permite dividir a ODR em três grandes grupos:

- 1- doença óssea de elevada remodelação (classicamente denominada “osteíte fibrosa quística”);
- 2- doença óssea de baixa remodelação, englobando nesta categoria a doença óssea adinâmica e a osteomalácia;
- 3- ODR de tipo misto que se caracteriza pela presença, em simultâneo, de aspetos de elevada remodelação e de compromisso da mineralização.

Habitualmente, na interpretação de uma biopsia óssea, começamos por caracterizar o grau de ativação celular e a remodelação óssea, avaliando posteriormente a eficácia da mineralização e, finalmente, quantificamos os depósitos de alumínio e de ferro eventualmente presentes (37) (38).

4.1.1.1 Doença óssea de elevada remodelação

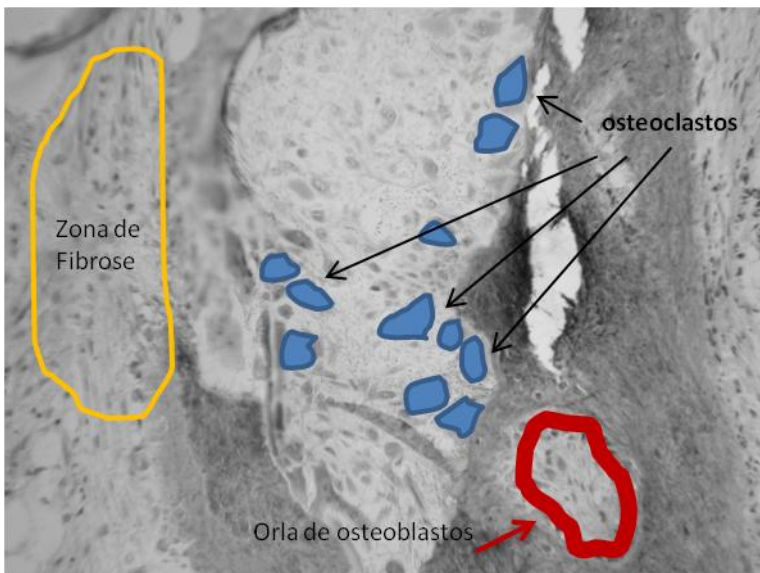
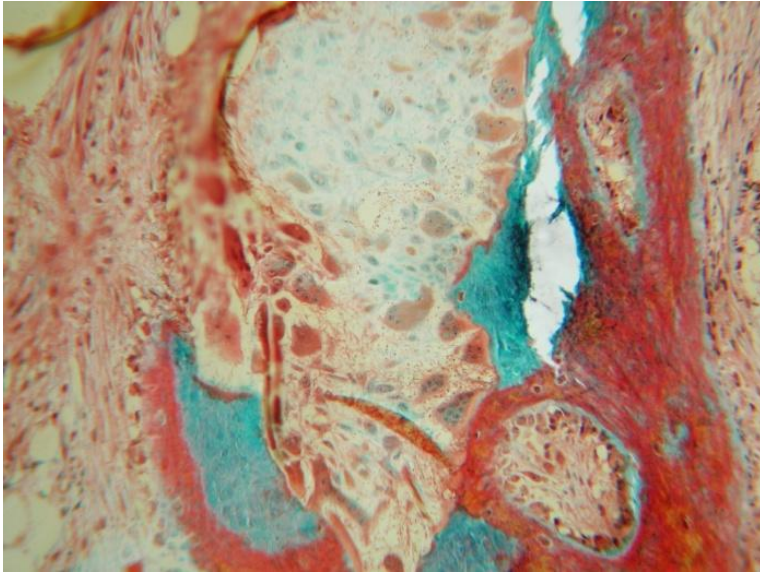
Os aspetos histológicos mais característicos do hiperparatiroidismo secundário (ou “osteíte fibrosa quística”) são:

1. O aumento do volume osteóide e da superfície osteóide (e sobretudo as modificações na estrutura do tecido osteóide, passando do habitual aspeto laminado para o aspeto plexiforme);
2. A presença de fibrose peritrabecular (que pode comprometer a eritropoiese e a resposta à eritropoietina através da ocupação do espaço medular);
3. Um número de osteoclastos e de osteoblastos ativados, superior ao normal;
4. Parâmetros histomorfométricos dinâmicos traduzindo remodelação óssea aumentada, nomeadamente, elevação da velocidade de aposição mineral (MAR), da velocidade de formação óssea (BFR/BS) e da frequência de ativação (Acf); e
5. Ausência de compromisso significativo da mineralização óssea.

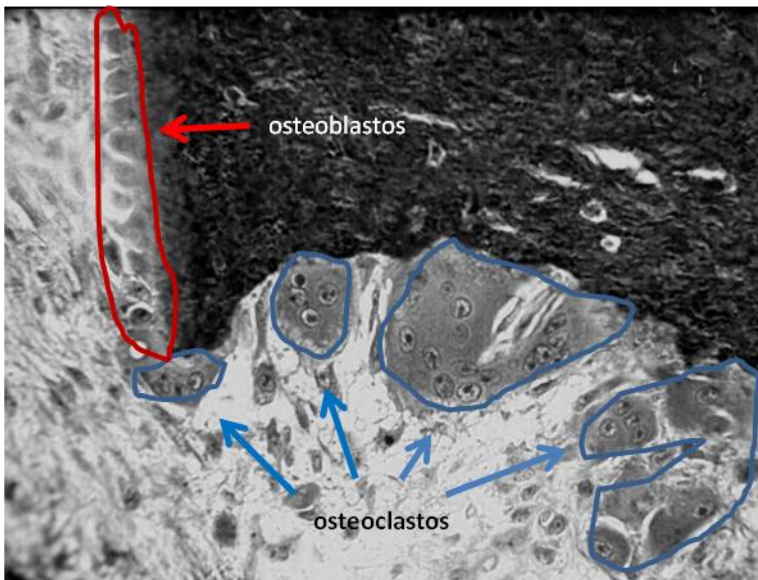
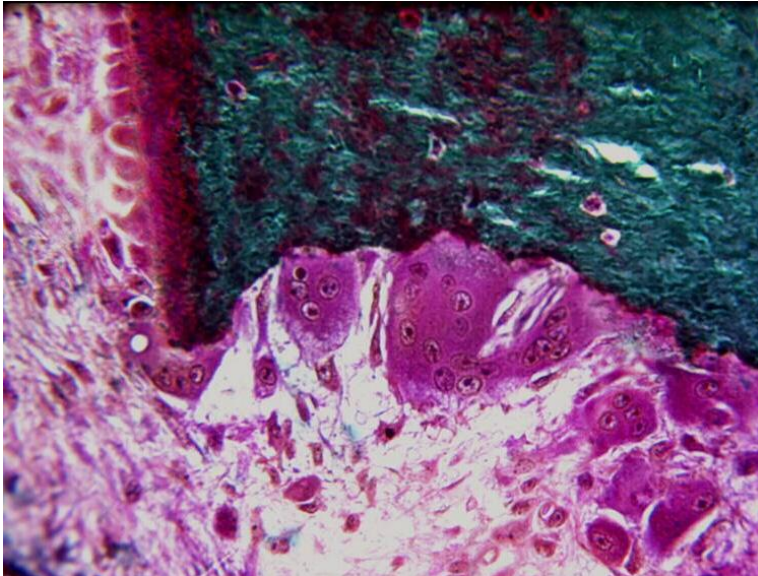
A ativação osteoclástica e osteoblástica condicionam, respetivamente, aumento da reabsorção e da formação óssea.

Habitualmente, estas duas fases do ciclo de remodelação óssea surgem emparelhadas e em estreita associação.

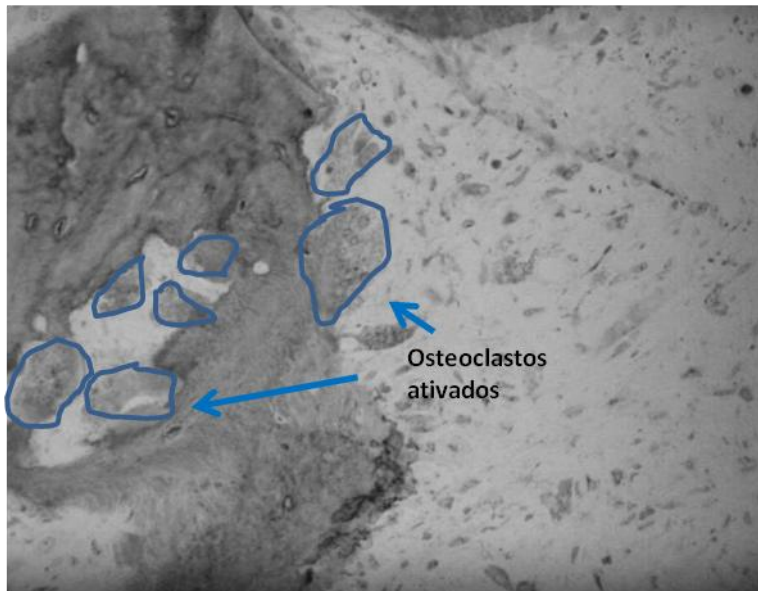
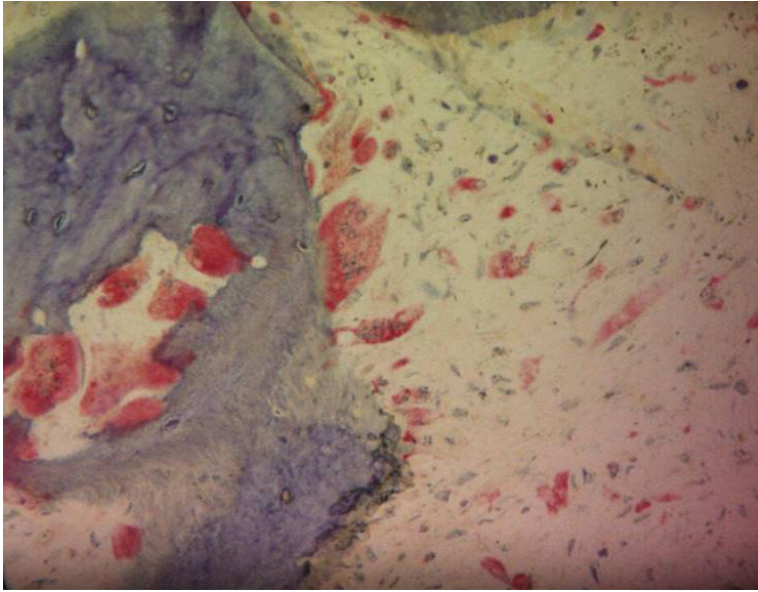
No entanto, nalguns casos podem encontrar-se desequilibradas num ou noutro sentido, e assim condicionar “balanços” positivos, neutros ou negativos no volume ósseo total (7) (38).



Exemplo de biopsia óssea de doente com grave doença óssea de elevada remodelação. Observam-se múltiplos osteoclastos (células multinucleadas) em processo de reabsorção óssea ativa. Também se identificam osteoblastos em banda em processo de formação óssea. Extensas zonas de fibrose peritrabecular. Tricrómio de Goldner; (63x)



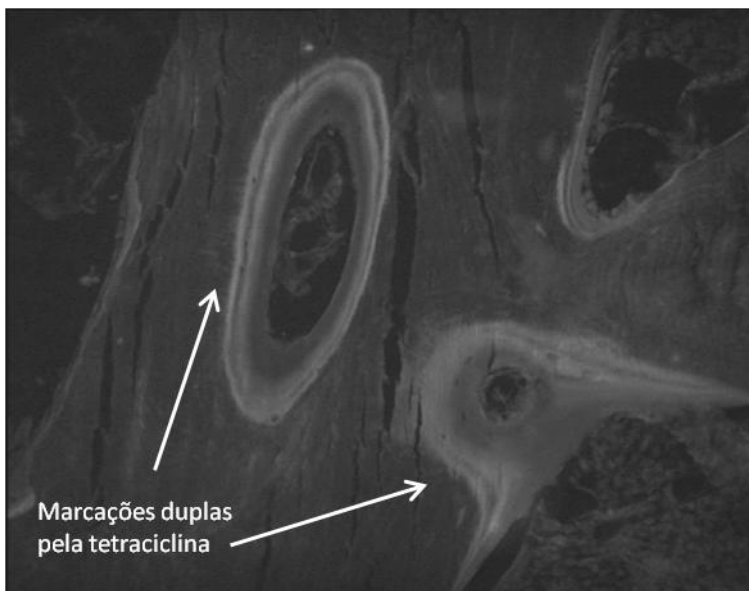
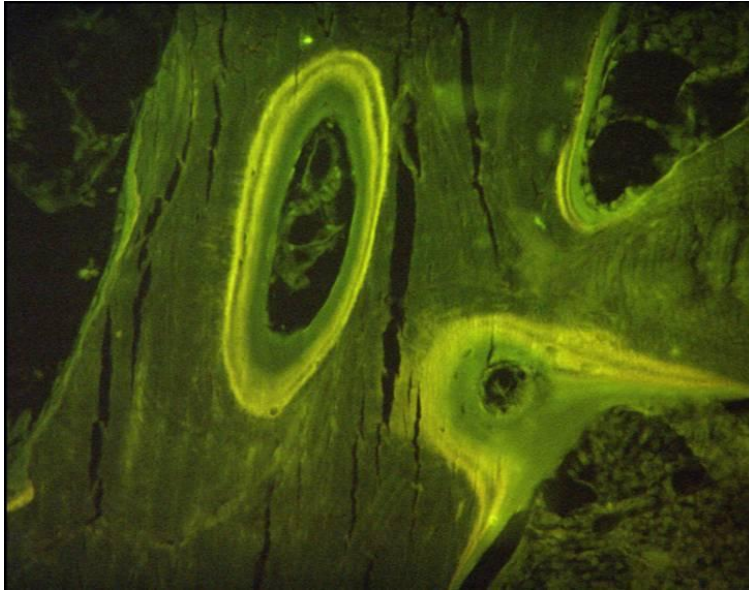
Zona da trabécula óssea onde coincidem duas superfícies em fases antagônicas, ilustrando um quadro de doença óssea de elevada remodelação. A faixa de formação óssea (vertical) está coberta por tecido osteóide, o qual está a ser sintetizado por uma orla de osteoblastos. Na porção horizontal da trabécula identificam-se várias células multinucleadas que correspondem a osteoclastos em processo de reabsorção óssea ativa. Tricrómio de Goldner (200x).



Pela coloração específica da fosfatase ácida, otimizada na nossa investigação (ver capítulo 4.1.4), identificam-se os osteoclastos em processo de reabsorção óssea ativa (200x).

As marcações pela tetraciclina, nestes quadros de elevada remodelação, caracterizam-se pela presença de extensas marcações, que cobrem a maior parte da superfície trabecular, sendo maioritariamente de tipo duplo.

Este tipo de marcação traduz a aceleração da formação óssea e exclui um compromisso significativo da mineralização.



Marcações pela tetraciclina observadas à luz fluorescente. Neste caso as marcações são predominantemente de tipo duplo, bem contrastadas e afastadas uma da outra, o que indica uma velocidade de formação óssea elevada (BFR-bone formation rate) (63x)

A osteíte fibrosa quística constitui a expressão óssea do hiperparatiroidismo secundário e surge (com gravidade variável) em cerca de 50% dos doentes urémicos na fase pré dialítica e início de diálise (IRC fase 5) (8) (39).

Em situações de osteíte fibrosa grave, a cortical óssea (formada por osso compacto) encontra-se frequentemente com extensas áreas de porosidade aumentada, resultantes do aumento da reabsorção óssea. Esta alteração da estrutura do osso cortical contribui para o aumento do risco de fratura atendendo à diminuição da resistência óssea (7) (37).

4.1.1.2 Doença óssea de baixa remodelação

No outro extremo do espectro da osteodistrofia renal, surge a doença óssea de baixa remodelação, cuja definição engloba os diagnósticos de doença adinâmica e de osteomalácia (40) (41) (7).

Ao longo da última década, tem-se assistido ao aumento progressivo da prevalência da doença óssea adinâmica nos doentes hemodialisados.

Nos 2 estudos mais recentes, publicados em 2008 e considerados com o nível mais elevado de evidência pelos peritos KDIGO (grau “A-High quality of evidence”) está bem patente este surpreendente aumento da prevalência da doença adinâmica (34) (33).

No primeiro destes estudos, realizado pelo nosso grupo, encontramos uma prevalência de doença adinâmica em 59% das biopsias realizadas no início do estudo.

De salientar que nesta percentagem não estão incluídos os únicos 3 doentes com depósitos significativos de alumínio na superfície trabecular, os quais foram excluídos do protocolo, de acordo com os critérios de inclusão previamente definidos (33).

No segundo manuscrito, da autoria de Barreto e colaboradores, é descrita uma prevalência de doença adinâmica sobreponível (60%), nas biopsias ósseas realizadas numa população de 97 doentes brasileiros.

No entanto, estes resultados já não são inesperados, tendo em conta que 46,5% dos doentes com doença adinâmica tinham extensos e significativos depósitos de alumínio, em mais de 25% da superfície trabecular (34).

4.1.1.2.1 Doença óssea adinâmica

A importância do diagnóstico de doença óssea adinâmica advém não apenas do aumento progressivo e sustentado da sua prevalência, como também do fato de ter sido associada a algias ósseas, hipercalcemia refratária, a calcifilaxia com graves calcificações extra ósseas, a diminuição do conteúdo ósseo em cálcio, ao aumento do risco de fraturas e à deficiente correção das micro fraturas espontâneas (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49).

Num estudo de London e colaboradores, evidenciou-se uma associação significativa entre a presença de calcificações vasculares (avaliadas por ecografia e radiologia convencional) e a diminuição da remodelação óssea, em 58 doentes hemodialisados.

A presença de calcificações vasculares extensas (em mais de três territórios vasculares) associou-se ao diagnóstico histológico de osso adinâmico (incluindo parâmetros dinâmicos, mediante a marcação pela tetraciclina) (50) (49).

Mais recentemente, Asci e colaboradores descreveram um aumento da associação de calcificações coronárias (avaliadas por tomografia computadorizada multicortes) nos doentes com extremos patológicos de remodelação óssea: osso adinâmico e doença de elevada remodelação.

Estes autores descreveram uma curva em forma de “U”, relacionando a presença de calcificações coronárias e a remodelação óssea, em 207 doentes hemodialisados (estádio 5d) (51).

Esta correlação ilustra o papel relevante do tecido ósseo, no metabolismo mineral e no risco de calcificações extra esqueléticas, observadas no doente urémico.

Frequentemente, a doença óssea adinâmica é de etiologia iatrogénica, resultando de paratiroidectomia cirúrgica prévia, ou de excesso de terapêutica com cálcio e/ou vitamina D (52).

Este mecanismo iatrogénico foi documentado desde fases precoces de instalação da IRC, ainda na fase pré-dialítica (49) (53).

Para além da diminuição de secreção de PTH, frequentemente observada nos doentes urémicos com patologia óssea adinâmica, foi ainda evidenciada, *in vitro*, uma menor proliferação dos osteoblastos destes doentes (54).

A terapêutica com alumínio, ferro, estrôncio e magnésio também favorece a diminuição da remodelação óssea, dependendo das doses e tempo de exposição a estes metais (2) (55) (9) (56) (57) (24) (58) (59).

Durante a década de 80, registou-se um aumento exponencial da prevalência da doença óssea de baixa remodelação (quer da doença adinâmica, quer da osteomalácia).

Esta evolução foi descrita por quase todos os investigadores e foi claramente ilustrada na série de Faugere e Malluche (60), que em 1803 biopsias ósseas, registaram um aumento deste diagnóstico histológico de 5% em 1984 para 26% em 1988.

Neste período, os hemodialisados estiveram, frequentemente, expostos a doses elevadas de captadores de fósforo de base alumínica (hidróxido de alumínio) e, ocasionalmente, a soluções dialisantes com elevada concentração neste metal (55).

Posteriormente, desde o início da década de 90, a doença óssea adinâmica adquiriu relevo crescente, sendo mesmo o diagnóstico histológico de ODR mais frequente na série de Sherrard (49). Neste grupo de doentes, foram encontrados depósitos significativos de alumínio (superiores a 25% da superfície trabecular) em apenas um terço dos doentes.

No caso da exposição ao alumínio, (que abordaremos em detalhe no capítulo 4.1.5.), ainda que significativamente mais rara, continua, ocasionalmente, a constituir uma causa de doença de baixa remodelação óssea (61) (62) (7) (41) (55) (63).

Atualmente, na nossa experiência, e na dos principais grupos que se dedicam à osteodistrofia renal, a exposição ao alumínio deixou de ser um fator relevante no desenvolvimento de doença adinâmica (33) (64).

Pelo contrário, o progressivo aumento de doentes diabéticos e/ou idosos em hemodiálise, contribui, decisivamente, para a prevalência crescente de doentes com diagnóstico de doença óssea adinâmica (22) (52) (39) (23) (65) (41) (33) (64).

Após transplantação renal, observou-se o aparecimento de quadros de doença óssea adinâmica, de novo, provavelmente secundários a doses elevadas de corticoterapia (62).

Outros imunossuppressores utilizados após transplantação renal foram igualmente associados a aumento do risco de doença óssea adinâmica (66) (67) ou a agravamento de doença adinâmica pré-existente.

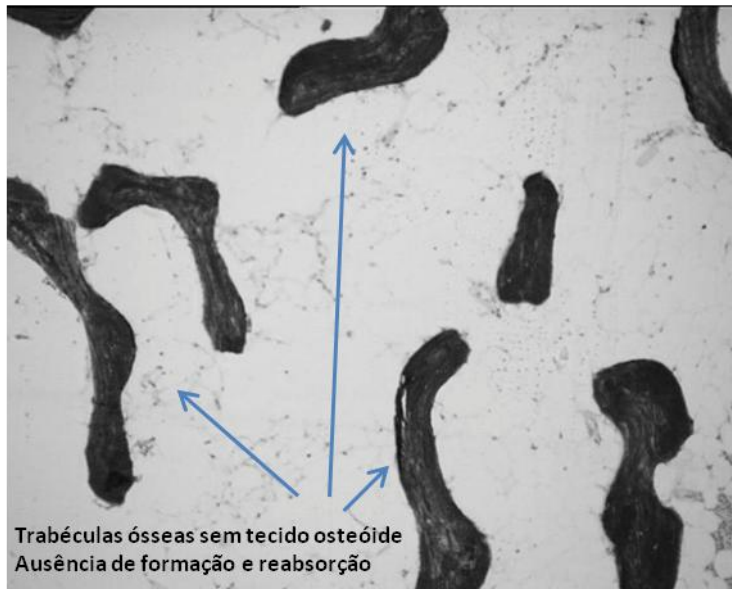
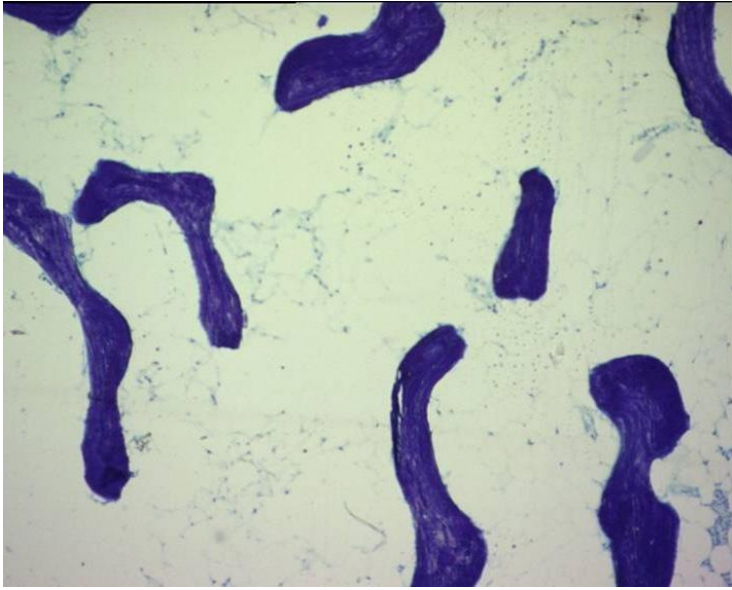
A doença óssea adinâmica foi ainda associada, com frequência aumentada, a concentrações elevadas de cálcio no dialisante (igual ou superior a 6 mg/dl) (68) (69) (41) (70).

Outros fatores, que têm sido associados ao desenvolvimento de doença óssea adinâmica, são a desnutrição, a doença hepática crónica (nomeadamente quadros de alcoolismo), o hipotireoidismo, infeções pelo vírus da imunodeficiência adquirida e a acidose (52) (71).

Finalmente, como discutiremos nos capítulos 5.3, 5.4 e 7, os resultados de uma das nossas linhas de investigação, apontam para uma menor ativação dos osteoblastos e dos osteoclastos, nos doentes hemodialisados com membranas mais biocompatíveis e com coeficientes de ultrafiltração mais elevados.

A remoção (por ultrafiltração ou adsorção) de citocinas promotoras da ativação destas células, bem como a redução dos níveis séricos de beta 2-microglobulina, justificam, em nossa opinião, os resultados obtidos (72) (73) (74) (75).

Este diagnóstico histológico de doença adinâmica, caracteriza-se pela acentuada depressão da remodelação óssea, frequentemente sem osteoblastos nem osteoclastos ativos evidenciáveis, mesmo com recurso a colorações específicas (para as fosfatases alcalina e ácida, respetivamente).



Grave doença óssea de baixa remodelação ou adinâmica. Apenas se identifica tecido ósseo mineralizado. As trabéculas ósseas apresentam-se como “ilhas” com total perda do habitual aspeto anastomosado e rendilhado que caracteriza o osso trabecular. Não se identificam quaisquer células em processo de formação (osteoblastos) ou de reabsorção óssea (osteoclastos). Azul de toluidina (25x).

O tecido osteóide está frequentemente ausente, ou, na melhor das hipóteses, encontra-se apenas em finas bandas, na superfície de algumas trabéculas ósseas.

As marcações pelas tetraciclinas são escassas ou estão totalmente ausentes, sendo fundamental, nestas circunstâncias, confirmar que o doente realizou esta medicação nos dias calendarizados.

A doença óssea adinâmica, pela perda de remodelação óssea que a caracteriza, acompanha-se, quase invariavelmente, de acentuada diminuição do volume ósseo total.

Esta redução observa-se quer no osso cortical (que fica, frequentemente reduzido a uma fina lâmina óssea) quer no osso esponjoso (onde as trabéculas apresentam uma espessura muito fina e perda das anastomoses intertrabeculares).

4.1.1.2.2 Doença adinâmica com osteoclasia

Em 2002 Gal-Moscovici e Popovtzer descreveram uma forma particular de doença adinâmica, na qual a par das características acima descritas para a doença de baixa remodelação (ausência de osteoblastos ativados, de tecido osteóide por mineralizar e de marcações pela tetraciclina) estavam presentes osteoclastos ativados em processo de reabsorção óssea.

Estes autores designaram este quadro histológico de doença adinâmica com osteoclasia (76).

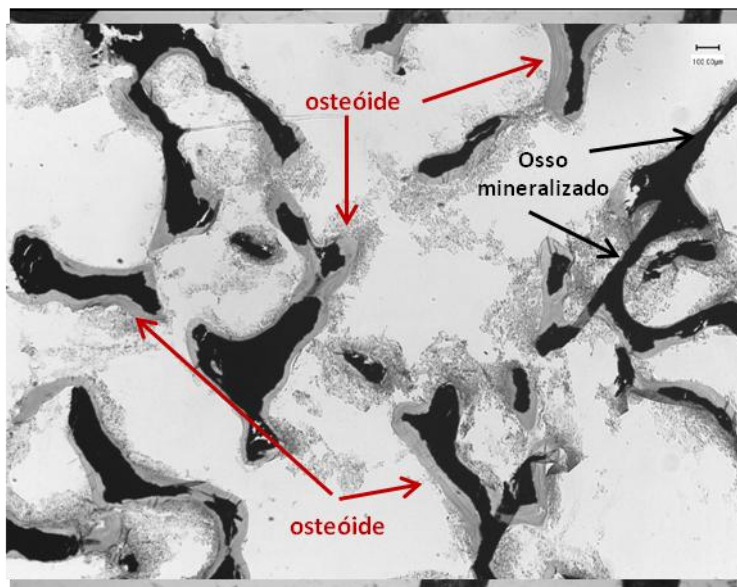
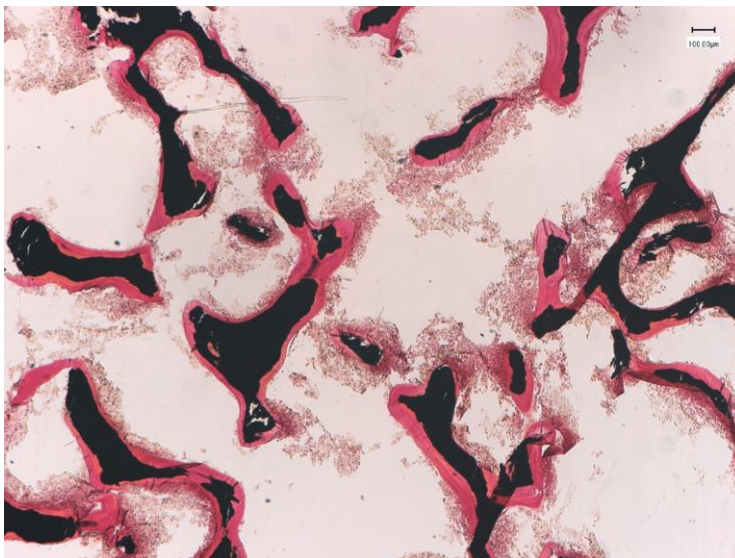
No entanto, esta variante da doença adinâmica nunca foi reconhecida como diagnóstico autónomo relevante.

Ainda que raramente, nas biopsias ósseas em que realizámos histomorfometria, também encontrámos ocasionalmente, alguma expressão osteoclástica, num quadro nitidamente de adinamia óssea.

Os mesmos achados foram relatados pelo grupo brasileiro de Rocha e colaboradores, com os quais estamos inteiramente de acordo no que respeita à sua interpretação: provavelmente resultam de estados de transição entre diferentes diagnósticos histológicos, particularmente de doença de elevada remodelação para doença óssea adinâmica (77).

4.1.1.2.3 Osteomalácia

A osteomalácia caracteriza-se pela presença de extensas e espessas faixas de tecido osteóide, o qual apresenta aspeto laminado, traduzindo longos períodos síntese e de deposição osteóide. O compromisso da mineralização óssea, que caracteriza esta patologia, conduz a um acentuado aumento da superfície e do volume osteóide. Este quadro traduz-se por um “intervalo de mineralização (Mlt)” muito aumentado e uma “velocidade de mineralização osteóide (OMR)” anormalmente reduzida (78).



Num quadro de osteomalácia observa-se um grave compromisso da mineralização apesar da formação óssea estar habitualmente diminuída. A incapacidade de transformar o tecido osteóide (a vermelho na

foto, coloração de Von Kossa) em osso mineralizado condiciona um acentuado aumento da superfície osteóide e do volume osteóide. Habitualmente, como no exemplo da foto, não existe fibrose intertrabecular (25x).

A remodelação óssea está habitualmente diminuída, motivo pelo qual a osteomalácia é incluída, habitualmente, no conjunto das doenças ósseas de baixa remodelação.

As marcações pela tetraciclina são escassas e, quando presentes, têm habitualmente um aspeto “desfocado”.

A osteomalácia, no quadro urémico, tem sido associada à deposição óssea de alumínio após exposição aguda (maciça), ou crónica, a este metal (41) (79) e ainda a níveis muito baixos de calcitriol, que comprometem a mineralização óssea (80).

De igual modo, a desnutrição, sobretudo quando associada a hipofosfatemia foi associada a osteomalácia (ver capítulo 4.2.1, onde são discutidas diferenças na incidência de osteomalácia, na população ibero-americana) (41) (81).

Também as patologias que cursam com aumento do FGF-23 (uma potente fosfatidina, já anteriormente discutida, nomeadamente no capítulo 3.1.3) como por exemplo a osteomalácia tumoral, o raquitismo hipofosfatémico ligado ao cromossoma X e o raquitismo hipofosfatémico autossómico dominante, caracterizam-se por osteomalácia secundária a hipofosfatemia severa, com hiperfosfatúria desadequada, e elevado risco de fratura (82).

As situações de osteomalácia são muito raras na atualidade (menos de 1% na nossa experiência), desde que foram eliminados riscos de exposição crónica e maciça ao alumínio (40).

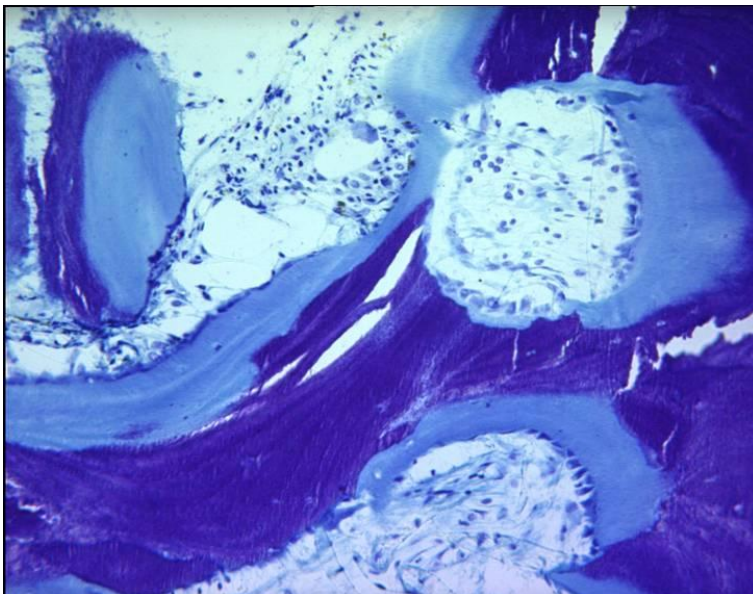
Continua a observar-se apenas em casos pontuais, após exposição prolongada e maciça a metais (alumínio, ferro), ou em situações de carência grave em vitamina D (83) (84).

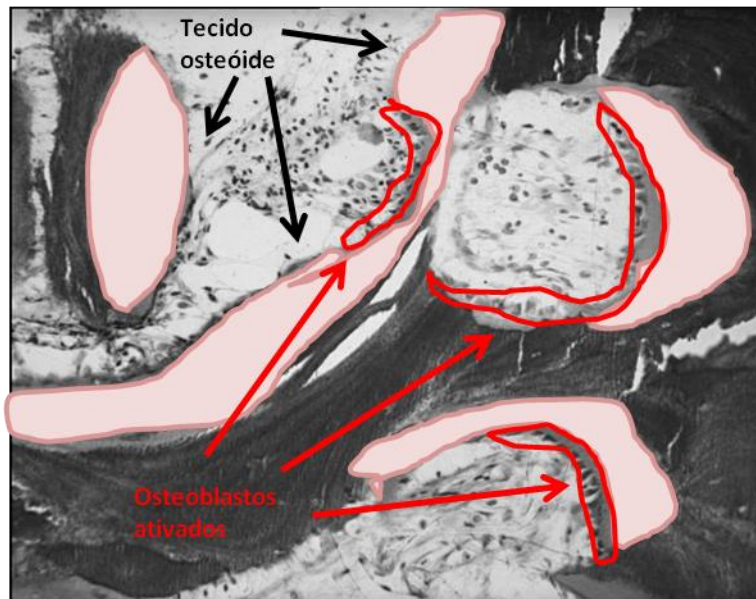
4.1.1.3 Osteodistrofia renal de tipo misto

Finalmente, a osteodistrofia renal de tipo misto apresenta os aspectos descritos acima para o hiperparatireoidismo secundário, acompanhados de aumento da espessura e do volume do tecido osteóide e com marcações pela tetraciclina indicadoras de compromisso da mineralização óssea (com aspecto “desfocado”).

De salientar que os doentes com HPTH 2º severo apresentam, frequentemente, um significativo aumento da espessura osteóide e da superfície osteóide, mas sem atingir os critérios de diagnóstico da osteomalácia.

Nestas circunstâncias, este incremento do volume osteóide traduz, apenas, o aumento de síntese de tecido osteóide e a dificuldade do processo de mineralização ocorrer, exatamente, no mesmo intervalo de tempo.





Nesta lâmina de biopsia óssea sobressai o acentuado aumento da espessura do tecido osteóide (identificado a rosa), o que traduz um compromisso da mineralização. No entanto, ao contrário de que se observa na osteomalácia, neste caso a formação óssea está muito aumentada (superfícies osteoblásticas identificadas a vermelho) e encontram-se extensas zonas de fibrose peritrabecular. Estes achados caracterizam a chamada “osteodistrofia renal de tipo misto” na qual coexistem aspetos de doença óssea de elevada remodelação com aspetos de osteomalacia. Azul toluidina (63x).

Nestas circunstâncias, o diagnóstico é ainda facilmente distinguido da osteomalácia, tendo em conta que no HPTH 2º se observa um marcado aumento da superfície osteoblástica, da superfície osteoclástica e da fibrose intertrabecular, bem como das marcações pela tetraciclina.

Frequentemente, o diagnóstico de osteodistrofia renal de tipo misto, corresponde a uma fase de transição entre dois diagnósticos histológicos bem definidos (por exemplo um quadro de osteomalácia em fase de resolução, que passa a acompanhar-se de um aumento da remodelação óssea).

A osteodistrofia renal de tipo misto era o diagnóstico histológico de cerca de 35 a 40% das biopsias ósseas realizadas até 1995. Desde essa data, a prevalência deste diagnóstico tem diminuído progressivamente, não atingindo, atualmente, mais de 10 % em nenhuma das grandes séries publicadas na última década (39).

Esta evolução, que traduz uma acentuada redução do compromisso da mineralização óssea, resulta da menor exposição ao alumínio, bem como da melhoria na nutrição (aporte proteico, fósforo e vitamina D) observada na maioria dos doentes dialisados (85) (11) (1) (40) (33).

4.1.2 Histomorfometria óssea no diagnóstico diferencial da osteodistrofia renal (manuscrito 8)

A biopsia óssea com histomorfometria pode, em diversas circunstâncias, ser a única forma de estabelecer um diagnóstico correto para suportar determinada atitude terapêutica.

Como discutimos ao longo do capítulo 3, os marcadores não bioquímicos da remodelação óssea apresentam especificidade e sensibilidade reduzidas, no diagnóstico dos diversos tipos de osteodistrofia renal.

Mesmo quando associamos vários destes marcadores e os analisamos conjuntamente, o aumento da especificidade e da sensibilidade (bem como dos valores preditivos positivos e negativos) são frequentemente insuficientes para tratar um doente concreto (16) (78).

Também a imagiologia apresenta, frequentemente, limitações acentuadas, como já tivemos oportunidade de abordar, ao longo do capítulo anterior. Na verdade, os exames radiográficos do esqueleto, podem ser completamente normais e semelhantes, em doentes com osteíte fibrosa de grau ligeiro a moderado, em doentes com osteomalácia ou na presença de doença óssea adinâmica.

Deste modo, a radiologia é de utilidade limitada, na avaliação e caracterização da osteodistrofia renal nas fases mais incipientes do hiperparatiroidismo secundário, altura em que preconizamos dever ser feita uma abordagem diagnóstica, e terapêutica precoce, de forma a obter resultados compensadores.

No manuscrito seguidamente apresentado, ilustramos estes conceitos, a propósito de três casos clínicos, discutidos conjuntamente.

Sublinhamos a necessidade de um diagnóstico invasivo para uma terapêutica adequada, a qual seria impossível de implementar sem a realização da biopsia óssea.

Os três doentes referidos neste estudo tinham um aumento da iPTH média superior a 6 vezes o limite superior do normal, acompanhada de aumento da fosfatase alcalina (superior a 5 vezes o limite superior do normal).

Clinicamente, as queixas eram sobreponíveis em todos os doentes, e caracterizavam-se por “algias ósseas e osteoarticulares” (predominantemente de tipo degenerativo), sem sinais inflamatórios. Em 2 dos 3 doentes já tinham ocorrido fraturas patológicas.

Curiosamente, e apesar destas semelhanças na sintomatologia clínica e no perfil de alterações laboratoriais, os 3 doentes apresentavam diagnósticos histológicos claramente distintos, os quais implicaram atitudes terapêuticas diferentes: um caso de osteomalácia, outro de hiperparatiroidismo secundário severo e o terceiro evidenciando uma doença óssea adinâmica.

A relevância deste manuscrito reside, precisamente, na evidência do papel da biopsia óssea no diagnóstico da osteodistrofia renal destes 3 doentes. Sem a avaliação histológica do osso não descalcificado, teria sido impossível diagnosticar e tratar os corretamente os doentes apresentados.

Epidemiology of renal osteodystrophy in Iberoamerica

J. Bernardino Díaz López¹, Vanda Jorgetti², Hena Caorsi³, Anibal Ferreira⁴, Alfonso Palma⁵, Primitiva Menendez¹, Inés Olaizola³, Silvia Ribeiro⁴, Carlos Jarava⁵, Eleonora Moreira⁶ and Jorge B. Cannata Andía¹

¹Bone and Mineral Research Unit, Hospital Central de Asturias, Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica, Oviedo, Spain, ²Universidade de Sao Paulo, Brazil, ³Centro de Nefrología de Montevideo, Uruguay, ⁴Nephrology Unit Hospital, Curry Cabral, Lisbon, Portugal, ⁵Hospital Virgen Macarena, Seville, Spain and ⁶Universidade Federale de Minas Gerais, Brasil

Introduction

Renal osteodystrophy continues to be a therapeutic dilemma for the nephrologists [1]. The mechanisms involved on its development are multifactorial and many aspects still remains controversial [1–3]. Classically, the various forms of renal osteodystrophy encompass predominant hyperparathyroid bone disease, mixed uraemic osteodystrophy, low turnover osteomalacia and adynamic bone disease [2–3].

The heterogeneity in bone lesions has been attributed to many factors but during the last decades two main factors have been implicated, the co-existence of aluminium toxicity in bone and the inevitable secondary hyperparathyroidism seen in the uraemia [2–4]. During recent years, the management of patients undergoing dialysis have experimented great changes, but they have not been uniform in all countries. As a result of that, it is reasonable to think, we should find differences in the types of renal osteodystrophy in different decades and also in different geographical areas. In this paper we report the prevalence of the various bone lesions found in chronic dialysis patients in different Iberoamerican countries.

Subjects and methods

Five centres of Iberoamerica who presented their bone histology data at the second International Symposium on Advances in Renal Osteodystrophy held in Oviedo in March 1997 were invited to fill in a questionnaire, with data related with their methodology and the results of bone biopsies performed in dialysis patients.

A total number of 1209 bone biopsies from five different countries (Brazil, Uruguay, Argentina, Portugal, Spain) were analysed throughout 12 years in four bone histology units (Sao Paulo [Brazil], Lisbon [Portugal], Seville [Spain],

Oviedo [Spain]). The number of bone biopsies by geographic area reference centres are presented in Table 1.

Bone histology

In this study all the included biopsies were obtained from chronic dialysis patients for clinical indications (signs and symptoms of renal osteodystrophy). All patients, except 15 from Lisbon and 26 from Argentina and Oviedo, were studied using tetracycline double labelling. Bone biopsies were taken from anterior iliac crest in all but two patients in Oviedo (performed in femur). All bone samples were fixed in 70% alcohol and embedded in methylmethacrylate. Sections of 5 µm (8 µm for tetracycline) were stained with Toluidine blue in Sao Paulo and Lisbon, with Masson Goldner at Lisbon, Oviedo and Seville, and also stained with Von Kossa in Oviedo. In addition, for detection of aluminium, 5 µm sections were stained with the aurin tricarboxylic acid (aluminon) stain in all centres. Solochrome azurine staining was performed together with aluminon in Lisbon and Oviedo.

Patients were classified according to histological analysis of the bone samples, into one of the following four categories. (A) Predominant hyperparathyroid bone disease: when the fraction of trabecular surface exhibiting tetracycline labelling was high, and abundance of woven osteoid, and peritrabecular and marrow fibrosis was observed, with a marked increase in the number of osteoblasts, osteoclasts and eroded surface. (B) Mixed uraemic osteodystrophy: characterized by signs of secondary hyperparathyroidism and areas of increased volume and thickness of osteoid. (C) Low turnover osteomalacia: typified by a marked increase in surface, volume and thickness of osteoid and decrease in bone formation with spare number of bone cells. (D) Adynamic bone disease: characterized by marked decrease in active remodelling sites and tetracycline uptake with a paucity of osteoid and bone cells.

Regarding morphometric criteria, the four reference centres agree in considering high osteoid volume values of $OV/BV \geq 15\%$, and fibrosis when $FbV/TV \geq 0.5\%$. However, the values of bone formation rate at tissue level, used to define low bone turnover were different, from $< 0.08 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$ in Sao Paulo, to $< 0.03 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$ in Seville. There were also differences in the cut-off values used to consider aluminium deposition in bone as positive staining. With aluminon all centres, except Seville, considered alumi-

Correspondence and offprint requests to: J. Bernardino Díaz López, Bone and Mineral Research Unit, Hospital Central de Asturias, Julián Clavería s/n, E-33006 Oviedo, Spain.

4.1.1 A nova classificação KDIGO da osteodistrofia renal: TMV

Face ao elevado número de variáveis histomorfométricas consideradas, aquando da leitura completa de cada biopsia óssea, bem como da moderada disparidade entre definições, unidades e mesmo critérios de leitura dos diferentes centros, o grupo do KDIGO (que integrámos nesta fase), optou por criar uma nova grelha de classificação da osteodistrofia renal.

Pretendeu-se criar uma nova ferramenta, que permitisse uniformizar os critérios de medição histomorfométrica e simplificar significativamente a apresentação e interpretação dos resultados histomorfométricos.

Com este objetivo, o resultado da histologia óssea, num doente urémico, foi dividido em 3 grandes vetores (os quais podem ser avaliados de forma qualitativa ou quantitativa):

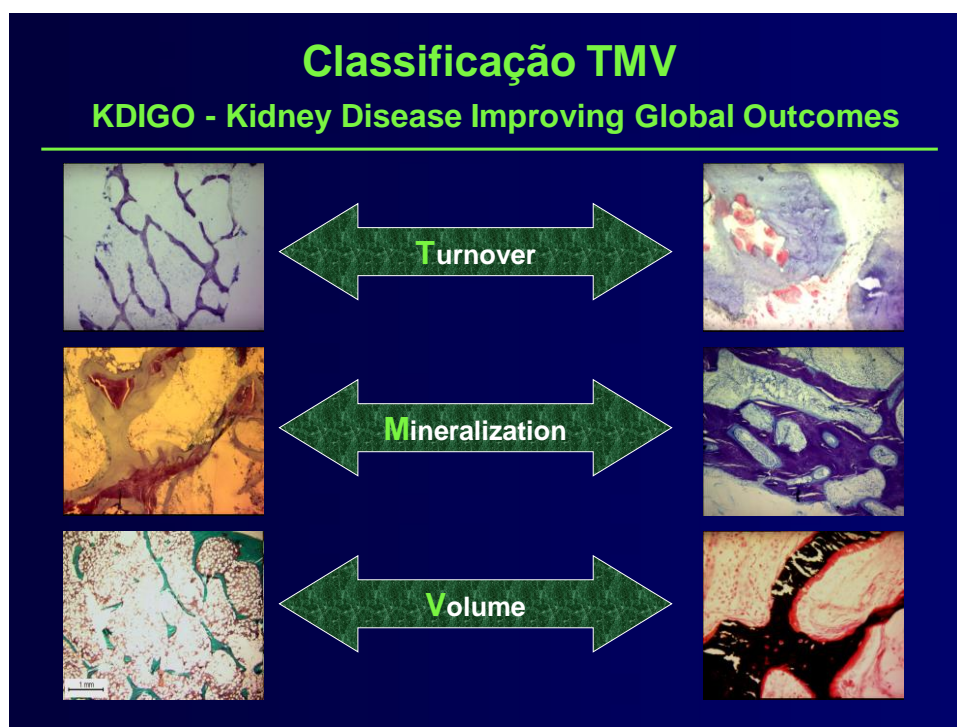
1. T (“turnover”): dá-nos informação sobre a remodelação óssea;
2. M (“mineralization”): refere-se à mineralização, que pode estar comprometida (ex: doentes com osteomalácia) e
3. V (“volume”): informa-nos sobre o volume ósseo total e as frações de osso trabecular e de osso cortical.

Esta nova classificação da osteodistrofia renal, denominada “TMV”, foi proposta em 2006 pelo grupo KDIGO, passando a englobar e reorganizar todos os diagnósticos histológicos, utilizados até essa data (86).

Apesar desta nova proposta de classificação da osteodistrofia renal ser facilmente apreendida e integrada nas decisões clínicas, faltava aferi-la em relação aos diagnósticos previamente utilizados, bem como à morfologia óssea dos doentes biopsados.

A validação desta nova classificação, mediante a correlação entre parâmetros histomorfométricos, marcadores bioquímicos da remodelação óssea e evolução clínica dos doentes, constitui uma das linhas de investigação, a que temos dedicado particular atenção nos últimos 5 anos, integrados num projeto de investigação da KDIGO (18) (19).

A nova classificação TMV define 3 graus para a remodelação (T-turnover): baixo, normal ou elevado; 2 graus para a mineralização (M-mineralization): normal ou anormal; e 3 graus para o volume ósseo (V-volume): baixo, normal ou elevado (17).



De acordo com esta classificação, a remodelação óssea (T-turnover), baseia-se apenas na avaliação da velocidade de formação óssea (BFR/BS). Todos os outros parâmetros estáticos e dinâmicos, que também avaliam a remodelação, são considerados complementares.

Importa salientar que, como discutiremos no capítulo 4.3.2., a quantificação isolada e pontual da remodelação óssea é menos relevante que a avaliação da evolução da mesma, no sentido da normalidade ou em sentido oposto.

A mineralização óssea (M-mineralization), na nova classificação KDIGO, à semelhança do que já anteriormente se definia, caracteriza-se por um aumento significativo do tempo de maturação osteóide (OMt), ou do intervalo de mineralização (MIt).

A avaliação do volume ósseo (V-volume) constitui a principal inovação na classificação KDIGO, visto que este parâmetro não era habitualmente valorizado na histomorfometria convencional.

Para além do volume ósseo total, a avaliação, de forma separada, do volume ósseo cortical e do volume ósseo trabecular, ganha particular relevância nos doentes urémicos.

Como já discutimos a propósito da avaliação da densidade óssea por métodos não invasivos, nestes doentes, frequentemente, as alterações são predominantemente no osso cortical ou no osso trabecular. Por exemplo, nos quadros de doença óssea de elevada remodelação severa, é habitual a redução significativa do volume ósseo cortical (que fica reduzido a uma fina lâmina) a par de um marcado aumento do volume ósseo trabecular (1) (27).

Para validar a nova classificação TMV, e avaliar se a mesma permite um aumento da sensibilidade e especificidade dos marcadores não invasivos da osteodistrofia renal, integramos o grupo da KDIGO responsável por este projeto. Efetuámos uma análise retrospectiva, multicêntrica, internacional, na qual foram avaliadas 647 biopsias ósseas de doentes hemodialisados ou em programa de diálise peritoneal (IRC estágio 5d) (18).

Este estudo, patrocinado pela National Kidney Foundation, representa a avaliação mais vasta alguma vez realizada, na área da histomorfometria óssea, para correlacionar os dados histomorfométricos com os resultados de diversos marcadores séricos da remodelação óssea.

Todos os soros referentes a estes doentes, tinham sido colhidos simultaneamente com a realização da biopsia óssea, conservados a -20°C, nunca descongelados e os doseamentos foram agora realizados, em simultâneo, num único laboratório central.

Das 647 biopsias ósseas avaliadas, apenas 7% apresentavam osso normal, de acordo com a classificação TMV. O compromisso da mineralização (em diferentes graus) observou-se em 55% dos doentes.

Infelizmente, apesar dos múltiplos marcadores séricos da remodelação óssea avaliados neste projeto (PTH intacta, PTH “bio intacta”, isoforma óssea da fosfatase alcalina e o propeptido intacto do procologénio tipo I) nenhum deles, nem a sua combinação, permitiu discriminar, de forma satisfatória, os diferentes tipos de osteodistrofia, nestes doentes (18) (19).

Encontrámos áreas sob as curvas ROC (“receiver operator curves”) com um mínimo discriminatório de 0,70 para alguns destes marcadores, mas apenas na distinção entre remodelação baixa versus não baixa e alta versus não alta. No entanto, um mínimo diagnóstico de 0,85 nas áreas sobre a curva ROC não foi atingido por nenhum marcador sérico isolado, ou associação de marcadores não invasivos (19).

Deste modo, podemos concluir da nossa investigação que a utilização da nova classificação TMV foi validada numa vasta população de doentes (IRC fase 5d) (18).

No entanto, apesar da maior facilidade de utilização desta classificação e do grande número de doentes incluídos neste estudo, os marcadores séricos não invasivos continuaram a não conseguir discriminar entre os diversos tipos de lesões histológicas ósseas, nos doentes urémicos (19) (20).

4.1.2 Otimização da coloração dos osteoclastos pela técnica da fosfatase ácida (manuscrito 9)

A identificação dos osteoclastos, mesmo quando estão em processo de reabsorção óssea ativa, é uma tarefa difícil, tendo em conta que estas células são

raras no osso normal e estão frequentemente ausentes no osso com remodelação diminuída.

Por estes motivos, a superfície osteoclástica e a contagem de osteoclastos (por unidade de superfície ou de volume) podem ser facilmente subavaliadas, por um observador menos experiente em histomorfometria óssea.

Recentemente, numa investigação integrada no projeto - “KDIGO-diagnóstico invasivo da osteodistrofia renal”- a que já nos referimos anteriormente, tivemos a oportunidade de comparar os resultados histomorfométricos, da leitura duma amostragem das mesmas lâminas, que rodaram por cada um dos 5 centros internacionais envolvidos. Numa avaliação preliminar (resultados ainda não publicados), pudemos confirmar que as contagens de osteoclastos e a quantificação da superfície de reabsorção foram os parâmetros estáticos que apresentaram maior variabilidade inter-centro.

Tendo em conta que o processo de remodelação óssea resulta do emparelhamento e da continuidade entre a reabsorção e a formação, parece-nos fundamental caracterizar ambas as fases deste ciclo.

Os osteoclastos multinucleados resultam da fusão de precursores mononucleados derivados de unidades formadoras de colónias de granulócitos-macrófagos, de origem na medula óssea, sob a ação de estímulos locais e sistémicos, muitos deles dependentes dos osteoblastos e da matriz óssea envolvente.

Estas células ativadas são o mediador final da reabsorção óssea, efetuada após o reconhecimento da matriz óssea pela integrina $\alpha_v\beta_3$, na qual participam enzimas libertadas pelos próprios osteoclastos, como a fosfatase ácida e a catapesina.

De salientar que, como discutiremos no capítulo 5 a propósito das nossas investigações nesta área, no quadro urémico encontram-se níveis séricos aumentados de diversas citocinas envolvidas na remodelação óssea (nomeadamente interleucina 1, interleucina 2, interleucina 6 e interleucina 11) (87) (88) e ainda aumento dos respetivos recetores solúveis ou antagonistas (64) (89), o que parece ter um papel relevante na etiopatogénese da ODR urémica.

Habitualmente, a doença óssea de baixa remodelação, (na qual, como discutimos anteriormente, devem ser incluídas a doença adinâmica e a osteomalácia), cursa com acentuada redução da ativação das células, envolvidas na formação e na reabsorção óssea.

Nestes quadros, é frequente não conseguirmos identificar quaisquer osteoclastos em processo de reabsorção óssea ativa. Também a superfície osteoblástica está habitualmente muito deprimida, quando comparada com os intervalos da normalidade.

No entanto, existem patologias, mesmo com baixa remodelação, que cursam aparentemente com osteoclasia, isto é, com aumento da atividade osteoclástica (às quais já fizemos referência no capítulo 4.1) (76).

Estes quadros resultam, frequentemente, de evoluções entre diferentes tipos de osteodistrofia, em resposta à terapêutica instituída (de causa iatrogénica). Como já referimos, e à semelhança do defendido pelos nossos colegas brasileiros (77) entendemos que estas observações correspondem a estados de transição e não a uma nova classe diagnóstica da osteodistrofia renal.

Não podemos esquecer que a histologia óssea de osso não descalcificado, no doente urémico, representa uma fotografia, obtida em determinado momento, da evolução da doença.

Nestas circunstâncias, a doença adinâmica com osteoclasia pode resultar da melhoria significativa da doença adinâmica (o que raramente ocorre) ou, pelo contrário, e mais frequentemente, da evolução da doença de elevada remodelação para doença adinâmica (fruto do “excesso” de intervenção terapêutica) (77) (52).

Mas, não é apenas nos quadros de baixa remodelação, que é relevante identificar e eventualmente quantificar os osteoclastos e a superfície osteoclástica.

Também na doença óssea de elevada remodelação é relevante a identificação dos osteoclastos, bem como a caracterização das zonas de predomínio destas células, no osso trabecular ou no osso cortical (52).

Estas diferentes distribuições da reabsorção óssea (cortical versus trabecular) vão condicionar, por exemplo, diferentes riscos de fratura óssea.

Conscientes da importância da identificação dos osteoclastos e da relevância da avaliação da reabsorção óssea, resolvemos realizar por rotina, desde a primeira biopsia, em todos os nossos exames, a coloração específica pela fosfatase ácida, que aprendemos em Paris, no Hôpital Lariboisière, com a Professora Marie Christine de Vernejoul e com a técnica Caroline Morieux (90).

A fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico (TRACP) é uma proteína catiônica, presente nos osteoclastos, nos macrófagos e em células dendríticas. Os osteoclastos ativados expressam TRACP nas suas vesículas intracelulares (preenchidas por produtos de fagocitose resultantes da degradação óssea) e libertam esta enzima para a zona de reabsorção óssea ativa.

A TRACP é uma metaloproteína que tem a capacidade de catalisar a síntese de radicais de oxigênio, os quais destroem as ligações peptídicas das proteínas da matriz óssea (91) (92), com particular relevância na degradação do colagénio tipo I (93).

Paralelamente, a TRAP induz a desfosforilação de fosfoproteínas ósseas como a osteopontina, amplificando desse modo a capacidade de degradação do tecido ósseo (94).

Curiosamente, visto a osteopontina ser responsável pela ancoragem dos osteoclastos à superfície de reabsorção, a degradação desta proteína pela TRACP, poderá constituir um mecanismo relevante de regulação e autolimitação da reabsorção óssea.

As condições físicas associadas ao método histoquímico para evidenciar a atividade da TRACP nas biopsias ósseas, são particularmente relevantes, visto estarmos em presença duma proteína termo lábil (95) (96).

Por este motivo, e conscientes da necessidade de padronizar o nosso método de deteção dos osteoclastos ativados, resolvemos tentar otimizar o método histoquímico de coloração pela TRACP.

Selecionámos os fragmentos ósseos de 10 doentes com hiperparatiroidismo secundário severo (já confirmado aquando da avaliação de rotina das lâminas ósseas) e obtivemos múltiplas secções de 5 µm.

Efetuíámos o método histoquímico para identificar a presença de TRACP, durante o tempo fixo de 30 minutos, mas a diferentes temperaturas: 37°, 45°, 60°, 70° e 80°C.

Ao contrário do que era descrito na literatura, identificámos a temperatura de 60°C como aquela que permite otimizar a coloração dos osteoclastos pela TRACP, permitindo o máximo de contraste (surgindo os osteoclastos ativos corados de vermelho vivo) e facilitando a identificação destas células.

As temperaturas superiores a 70°C induzem, frequentemente, a perda da secção óssea (que se descola da lâmina de vidro), o aparecimento de múltiplos artefactos intracelulares, bem como a rutura e perda de integridade dos osteoclastos.

Por este motivo não devem ser utilizadas temperaturas superiores a 60°C. Pelo contrário, temperaturas da reacção inferiores a este valor, conduzem a uma coloração ténue de muitos osteoclastos, dificultando a sua identificação e impossibilitando a utilização de métodos histomorfométricos automatizados.

A otimização e padronização da coloração pela TRACP, como resultado desta nossa investigação, passou a permitir a contagem, (de forma consistente e sem grande variabilidade inter-observador), do número de osteoclastos e da superfície osteoclástica, por método automático (mediante o recurso a qualquer dispositivo histomorfométrico com separações por cores).

Optimization of the tartrate-resistant acid phosphatase detection by histochemical method

M.J. Galvão,¹ A.R. Santos,¹ M.D. Ribeiro,² A. Ferreira,^{1,3} F. Nolasco^{1,3}

¹Laboratório de Morfologia Renal, Serviço de Nefrologia, Hospital de Curry Cabral

²Serviço de Anatomia Patológica, Hospital Distrital de Chaves

³Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, Portugal

Abstract

According to the new kidney disease improving global outcomes (KDIGO) guidelines, the term of renal osteodystrophy, should be used exclusively in reference to the invasive diagnosis of bone abnormalities. Due to the low sensitivity and specificity of biochemical serum markers of bone remodelling, the performance of bone biopsies is highly stimulated in dialysis patients and after kidney transplantation. The tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) is an iso-enzyme of the group of acid phosphatases, which is highly expressed by activated osteoclasts and macrophages. TRACP in osteoclasts is in intracytoplasmic vesicles that transport the products of bone matrix degradation. Being present in activated osteoclasts, the identification of this enzyme by histochemistry in undecalcified bone biopsies is an excellent method to quantify the resorption of bone. Since it is an enzymatic histochemical method for a thermolabile enzyme, the temperature at which it is performed is particularly relevant. This study aimed to determine the optimal temperature for identification of TRACP in activated osteoclasts in undecalcified bone biopsies embedded in methylmethacrylate. We selected 10 cases of undecalcified bone biopsies from hemodialysis patients with the diagnosis of secondary hyperparathyroidism. Sections of 5 µm were stained to identify TRACP at different incubation temperatures (37°, 45°, 60°, 70° and 80°C) for 30 min. Activated osteoclasts stained red and trabecular bone (mineralized bone) was contrasted with toluidine blue. This approach also increased the visibility of the trabecular bone resorption areas (Howship lacunae). Unlike what is suggested in the literature and in several international protocols, we found that the best results were obtained with temperatures between 60°C and 70°C. For technical reasons and according to the results of the present study, we recommended that, for an

incubation time of 30 min, the reaction should be carried out at 60°C. As active osteoclasts are usually scarce in a bone section, the standardization of the histochemistry method is of great relevance, to optimize the identification of these cells and increase the accuracy of the histomorphometric results. Our results, allowing an increase in osteoclasts contrast, also support the use of semi-automatic histomorphometric measurements.

Introduction

Uremic patients present significant morbidity of bone and mineral metabolism, which has been associated with osteoporosis, bone fractures, vascular calcification, and increased mortality. Some abnormalities can be found since early stages of chronic renal failure (CKD), but they are particularly relevant in dialysis patients and after kidney transplantation. Contrarily to what observed in general population, in uremic patients the biochemical markers of bone remodelling have a low specificity and sensitivity in the diagnosis of bone turnover. Many of these patients are anuric or with severe CKD, not allowing the use of urine markers of bone remodelling.

For these reasons, the undecalcified bone biopsy is the method of choice for evaluation of renal osteodystrophy,^{1,2} allowing the characterization of bone remodelling, osteoid mineralization and bone volume (cortical and trabecular) as defined by the new "turnover, mineralization, volume" (TMV) classification of kidney disease improving global outcomes (KDIGO).⁴

Resorption activity is usually much more difficult to quantify than all the other bone histomorphometric parameters, because osteoclasts are usually scarce in a bone section. For this reason, the standardization of a histochemistry method to optimize the identification of active osteoclasts would be highly relevant. This was the objective of the present investigation, based on the expression of acid phosphatase by active osteoclasts.

Tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) belongs to the acid phosphatases (AcP) – EC 3.1.3.2. The catalytic activity of these enzymes target phosphoesters in acidic environments.⁵ TRACP is a cationic ferric glycoprotein with a molecular mass of about 35 kDa and a monomeric peptide structure.⁶ TRACP expression is found in cells of the mononuclear phagocyte system, most abundantly in bone-resorbing osteoclasts, alveolar macrophages and dendritic cells.⁵

TRACP activity was first detected in the ruffled border membrane. Later immunohistochemical studies detected TRACP in intracellu-

Correspondence: Maria João Galvão, Hospital de Curry Cabral, Serviço de Nefrologia, Laboratório de Morfologia Renal, Rua da Beneficência, N°8, 1069-639 Lisboa, Portugal.
Tel. +35.1.217924229 - Fax: +35.1.217924319.
E-mail: mariajoalopesgalvao@hotmail.com

Key words: tartrate-resistant acid phosphatase, osteoclasts, bone resorption, histochemistry, bone biopsy, renal osteodystrophy.

Contributions: all authors contributed to the planning of this study, experimental procedures, analysis of data obtained and in the writing of this paper. All authors approve the final version.

Conflict of interest: the authors declare no potential conflict of interest.

Received for publication: 2 August 2010.
Accepted for publication: 9 November 2010.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 License (by-nc 3.0).

©Copyright M.J. Galvão et al., 2011
Licensee PAGEPress, Italy
European Journal of Histochemistry 2011; 55:e1
doi:10.4081/ejh.2011.e1

lar vesicles but not in the ruffled border region. However, contradictory results were found using immunogold technique, showing strong staining in both structures. There is an actual agreement that TRACP is mainly produced and secreted from osteoclasts during bone resorption.⁵

TRACP has a binuclear iron center and, like other metallo-proteins, catalyzes the formation of reactive oxygen species (ROS), compounds with the ability to destroy peptide bonds.⁷ These compounds are secreted by osteoclasts participating in the process of bone matrix degradation.⁸

In general, ROS have been shown to stimulate osteoclastic bone resorption, both in vivo and in vitro, and enhance recruitment of osteoclasts.⁹

Both ROS generation and AcP activity of TRACP use the redox active iron for the catalysis. However, the AcP activity has an acidic pH optimum and ROS are generated in a neutral PH. Single amino acid TRACP mutants that are completely inactive as phosphatases maintain the ability to produce ROS, suggesting that the two activities are functionally independent.⁵ Beck *et al.*⁹ demonstrated that the AcP activity of TRACP is inhibited by the substrate of ROS generating activity and vice versa which confirm the use of the same active site.

TRACP is also responsible for dephosphorylation of bone phosphoproteins like osteopontin, a protein involved in binding osteoclasts to the bone trabecula.¹⁰ This action suggests that

TRAP is also involved in the regulation of bone resorption. Osteoclasts, also through the secretion of hydrochloric acid and proteases, degrade bone matrix, mainly through the breakdown of links of collagen type I.¹¹ The products of degradation of bone matrix are phagocytised and transported intracellularly by intracytoplasmic vesicles. TRACP is found in these vesicles suggesting that the fragmentation of the material occurs, not only extracellularly in Howship lacunae, but also intracellularly.⁷

The role of TRACP in bone metabolism has been elucidated by TRACP knock-out and over expressing mouse models. Both models exhibit a specific bone phenotype. Mice lacking TRACP have mild osteopetrosis resultant of defective bone resorption.¹² Mice over expressing TRACP have increased bone resorption and formation resulting in mild osteoporosis.¹³

All these characteristics of TRACP make this enzyme an important factor in the diagnosis of renal osteodystrophy.

The enzymatic method used in this study belongs to the category of intramolecular rearrangements. In this category, an initial colourless soluble substrate, after hydrolysis, undergoes a molecular rearrangement producing an insoluble coloured final product. The rearrangement is due to the reaction of the substrate with a diazonium salt (like pararosaniline) forming a chromophore azo group allowing the detection of the reaction.¹⁴

Bancroft and Stevens¹⁴ suggested a method similar to that used in this study. The main differences are the absence of tartaric acid and manganese sulphate in the incubation solution, and the referred temperature at 37°C.

The first publication of this method applied specifically to undecalcified bone samples was by Evans *et al.*¹⁵ The method described differs from ours, in the use of tartaric acid and incubation time (1 h). Also, the referred temperature was 37°C. TRACP is resistant to tartrate while other enzymes present in the bone (which hydrolyze the same substrate) are not.¹⁶ The manganese has an activator effect on TRACP.¹⁷ The study of undecalcified bone biopsies is done through various histochemical methods that allow the evaluation of parameters such as the trabecular and cortical areas/volumes, bone mineralization and osteoid tissue, the trabecular surface with deposits of aluminum and/or iron, the osteoblastic surface and activated osteoclasts.⁸ Activated osteoclasts arise in small quantity in a normal bone biopsy, and they are even absent in many cases of adynamic bone, which makes their identification particularly difficult. The quantification of activated osteoclasts enables the determination of the degree of bone resorption,¹⁸ becoming thus essential for the study of bone metabolism.

The method used in this study was opti-

mized in the Laboratório de Morfologia Renal of the Nephrology Service, Hospital Curry Cabral, Lisboa, Portugal for the study of undecalcified bone biopsy embedded in methylmethacrylate (MMA). This study aimed at determining the optimal temperature (at a fixed incubation time of 30 min) for the identification of TRACP in osteoclasts in undecalcified bone biopsies and embedded in MMA.

Materials and Methods

Undecalcified bone biopsies from 10 uremic patients with the diagnosis of secondary hyperparathyroidism (due to the higher number of activated osteoclasts) were selected.²⁰

These biopsies were processed according to the protocol of the Laboratório de Morfologia Renal of the Nephrology Service, Hospital Curry Cabral:²¹ fixation – 70% alcohol – 8 days at room temperature (RT); dehydration – 96% alcohol – 24 h at RT, 100% alcohol – 24 h at RT, acetone – 3 days at RT; impregnation – impregnation solution – 3 days at -20°C; polymerization – inclusion solution – 24 to 48 h at RT.

Both impregnation and inclusion solutions had the same basis.

Solution A

MMA (Merck, Darmstadt, Germany); sodium hydroxide (BDH, Poole, England) 0.5N; add slowly in a proportion of 2MMA:1Sodium hydroxide, well mixed and let it rest a few min until the solution presented two phases. Then, we reject the brown part in the bottom and kept the colourless liquid. This procedure was repeated until the solution only presented one phase, then stored at -20°C for 24 hs.; we filtered the solution and stored again at -20°C.

Solution B

Solution A – 300 mL; benzoyl peroxide (Merck) – 2 g; Stored at -20°C for 24 h, then filtered and stored again at -20°C.

Solution C

Solution B – 300 mL; 2-hydroxymethylmethacrylate (Merck) – 150 mL; polyethylenglycol 400 (Merck) – 50 mL.

Impregnation solution

Solution C – 15 mL; 5% NN-dimethylaniline (BDH) in isopropyl alcohol (Merck) – 90 µL.

Inclusion solution

Solution C – 15 mL; 5% NN-dimethylaniline (BDH) in isopropyl alcohol (Merck) – 120 µL.

From each biopsy five sections of 5 µm were performed. The sections were cut in a semi-

automatic microtome (Leica RM-2155, Wetzlar, Germany) equipped with a tungsten blade, profile d (Reichert-Jung, NY, USA). The sections were placed on slides with Haupt's gelatine. Haupt's gelatine was prepared by dissolving 1 g of gelatine (Merck) in 100 mL of distilled water at 55°C and, after cooling, 15 mL of glycerol (Merck) and 2 g of phenol (Merck) were added.

The slides were involved in a polyethylene film and placed in a press in the incubator at 60°C for two days.

The MMA was not dissolved prior to staining the sections.

Method of TRACP detection

The sections of each biopsy were incubated at different temperatures (37°C, 45°C, 60°C, 70°C and 80°C) with the incubation solution in a humid chamber for 30 min.

Incubation solution: i) pararosaniline (Merck) 4% (in hydrochloric acid 20%) – 1 mL; ii) sodium nitrite (Merck) 3,75% - 3 mL; iii) AS-TR naphthol phosphate (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) 1,6% in dimethylformamide (Merck) – 2 mL; iv) 0.1 M acetate buffer pH5 – 20 mL; sodium acetate 0.1 M – 70 mL; acetic acid 0.6% - 30 mL (always confirm the pH before use); v) manganese sulphate (Merck) 10% - 6 drops; vi) tartaric acid (Sigma-Aldrich) - 260 mg.

The solution has to be filtered before adding the tartaric acid.

This solution can be stored at -20°C for several months. Before use, the solution must be kept at room temperature and filtered.

After washing with distilled water and dried with filter paper the contrast was obtained with toluidine blue (Sigma-Aldrich). After drying with filter paper, the slides were placed in xylene and mounted with Entellan (Merck).

The slides were observed at an optical microscope at the magnifications of 375x by two of the authors without the knowledge of case or temperature of the staining.

The slides were classified as: ++ intensive-ly stained, + stained, 0 unstained, +- stained with artefacts, 0- unstained with artefacts. Cases were the sections fell of the slides were considered as NA (not applicable).

The study was approved by the ethical committee of the Hospital Curry Cabral, and each patient signed an informed consent form.

Results

As expected, activated osteoclasts stained red (allowing to distinguishing certain cellular characteristics such as multinucleation) and trabecular bone stained blue. Activated osteoclasts stained with a red colour of high inten-

sivity, which allows the performance of semi-automatic bone histomorphometry.

Table 1 shows that at 37°C and 45°C there was in all cases, an absence of staining of osteoclasts. At 60°C and 70°C the results were similar. These two temperatures provided the best results.

Figures 1 (60°C) and Figure 2 (70°C) show the strong staining of osteoclasts obtained at both temperatures. At 80°C the results were variable. There were cases in which the sections fell from the slides. In other cases, at this high temperature, it was observed a constant presence of artefacts such as precipitation of crystals with a heterogeneous staining that included some pale areas in the osteoclasts cytoplasm, as shown in Figure 3.

Discussion

Relevant bone abnormalities can be found since early stages of chronic renal failure (CKD). They are particularly relevant in dialysis patients and after kidney transplantation. The non-invasive diagnosis of bone turnover,

presents relevant limitations (lack of specificity and sensitivity). For these reason, the major objective of our investigation was to determine the bone formation and resorption, the bone mineralization and bone volume in un-decalcified bone biopsies (according to the TMV classification). The bone resorption activity is very difficult to evaluate and quantify due to the imbalance with bone formation. The measurement of active resorption surface, number of osteoclasts and eroded surface can be optimized by a specific staining for osteoclasts, as TRACP.

The staining results at different temperatures of 37°C, 45°C, 60°C and 70°C were homogeneous.

At 80°C there was no homogeneity, probably because this temperature is close to the denaturation temperature of TRACP. Also, this temperature seems to be too aggressive, since in three cases occurred the loss of sections.

The best results were obtained at 60°C and 70°C. However, at 70°C in cases where sections are not well adherent may exist the risk of falling from slides.

Compared with the method described by Bancroft and Stevens,¹⁴ where the recommended temperature is 37°C but with a very wide time range from 15 to 60 min, our approach and results are clearly different. In fact, we

fixed the time of the reaction (in 30 minutes) while optimizing the temperature of the process.

Also, comparing to the method presented by Evans *et al.*,⁵ there is a shortening of the reaction time by increasing the temperature.

The reason why higher temperatures give better and faster results is unclear and difficult to explain, but the effects of the processing and type of methacrylate used in enzymes may explain it.

Given the small number of activated osteoclasts in bone biopsies of patients with normal bone and, especially, in patients with adynamic bone disease (which now represent about 40% of the dialyzed population), the identification of TRACP expressed by these cells is crucial for qualitative and quantitative diagnosis. Standardizing the histochemistry reaction and optimizing the bright red uniform staining, (but keeping intact the cellular structure of osteoclasts) is particularly relevant when making bone histomorphometry, either by manual method or semi-automated method.²³

According to our results, we recommended that for a time of 30 min, incubation should be carried out at 60°C. At this temperature the staining, identification and possible quantification of osteoclasts, based on TRACP expression, are optimized.

Table 1. Staining classification.

Case #	37°C	45°C	60°C	70°C	80°C
1	0	0	++	+	0-
2	0	0	++	++	+
3	0	0	+	++	NA
4	0	0	++	++	+
5	0	0	++	++	0-
6	0	0	++	+	NA
7	0	0	+	++	0-
8	0	0	++	+	0-
9	0	0	+	++	+
10	0	0	++	++	NA

++, intensively stained; +, stained; 0, unstained; +-, stained with artefacts; 0-, unstained with artefacts; NA, not applicable.



Figure 1. TRACP staining, incubation at 60°C. All osteoclasts are stained red and no artifact is observed. Scale bar: 4 µm.

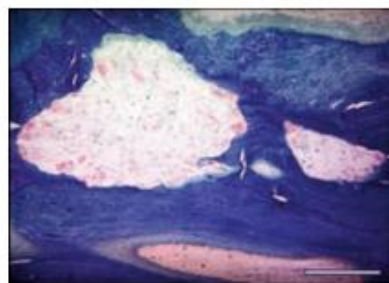


Figure 2. TRACP staining, incubation at 70°C. All osteoclasts are stained red and no artifact is observed. Scale bar: 4 µm.



Figure 3. TRACP staining, incubation at 80°C. Stained osteoclasts with decolorized areas (black arrow) and artefacts (red arrow). Scale bar: 4 µm.

References

1. Ferreira MA. Biochemical markers of bone turnover in the diagnosis of renal osteodystrophy: what do we have, what do we need? *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:29-32.
2. Ferreira MA. Diagnosis of renal osteodystrophy: when and how to use biochemical markers and non-invasive methods; when one biopsy is needed. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:8-14.
3. Malluche HH, Faugere MC. Atlas of mineralized bone histology. 1986, Karger Publ., Basel, Switzerland.
4. Moe S, Druke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2006;69:1945-53.
5. Kaija H, Patrikainen L, Alatalo SL, Väänänen HK, Vihko PT. Acid Phosphatases. In: Seibel M, Robins S and Bilezikian J (eds) *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*. 2nd ed, 2006. Academic Press, USA.
6. Vincent JB, Crowder MW, Averill BA. Spectroscopic and kinetics studies of a

- high-salt-stabilized form of the purple acid phosphatase from bovine spleen. *Biochemistry* 1991;30:3025-34.
7. Halleen JM, Räsänen S, Salo JJ, Reddy SV, Roodman GD, Hentunen TA, et al. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Biol Chem* 1999;274:22907-10.
 8. Ries WL, Key LL, Rogriguiz RM. Nitroblue tetrazolium reduction and bone resorption by osteoclasts in vitro inhibited by a manganese-based superoxide dismutase mimic. *J Bone Miner Res* 1992;7:931-9.
 9. Beck JL, Durack MC, Hamilton SE, de Jersey J. Irreversible inactivation of purple acid phosphatase by hydrogen peroxide and ascorbate. *J Inorg Biochem* 1999;73:245-52.
 10. Ek-Rylander B, Flores M, Wendel M, Heinegård D, Andersson G. Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Biol Chem* 1994;269:14853-6.
 11. Blair HC. How the osteoclast degrades bone. *Bioessays* 1998;20:837-46.
 12. Hayman AR, Jones SJ, Boyde A, Foster D, Colledge WH, Carlton MB, et al. Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development* 1996;122:3151-62.
 13. Angel NZ, Walsh N, Forwood MR, Ostrowski MC, Cassady AI, Hume DA. Transgenic mice overexpressing tartrate-resistant acid phosphatase exhibit an increased rate of bone turnover. *J Bone Miner Res* 2000;15:103-10.
 14. Bancroft J. Enzyme histochemistry. In: Bancroft J and Stevens A (eds). *Theory and practice of histological techniques*. 2nd ed. 1982 Churchill Livingstone, London, UK.
 15. Evans RA, Dunstan CR, Baylink DJ. Histochemical identification of osteoclasts in undecalcified sections of human bone. *Miner Electrolyte Metab* 1979;2:179-85.
 16. Minkin C. Bone acid phosphatase: Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* 1982;34:285-90.
 17. Hayman AR, Warburton MJ, Pringle JA, Coles B, Chambers TJ. Purification and characterization of a tartrate-resistant acid phosphatase from human osteoclastomas. *Biochem J* 1989;261:601-9.
 18. Dunstan CR, Evans RA. Quantitative bone histology: a new method. *Pathology* 1980;12:255-64.
 19. Figueras SS, Barba MM. Bases histológicas de la histomorfometría ósea. In: Serrano S, Aubia J and Marinosa M (eds.) *Patología ósea metabólica*. 1990, Sandoz, Barcelona, Spain.
 20. Malluche HH, Ritz E, Lange HP, Kutschera J, Hodgson M, Seiffert U, et al. Bone histology in incipient and advanced renal failure. *Kidney Int* 1976;9:355-62.
 21. Galvão MJ, Ferreira A, Carvalho F, Costa AM. Técnica da biópsia óssea de osso não descalcificado com histomorfometria – utilidade na caracterização da osteodistrofia renal. *Rev Port Imunohistoquímica* 1996;7:11-2.
 22. Ferreira A, Carvalho F, Coelho A, Felicissimo P, Galvão MJ, Marques da Costa A. A utilidade da biópsia óssea com histomorfometria na caracterização da osteodistrofia renal. *Rev Port Nefrol Hipert* 1993;7:69-82.

4.1.3 Caracterização dos depósitos de alumínio na superfície trabecular

A identificação de depósitos de alumínio na superfície trabecular constituiu, no passado, uma das principais indicações para a realização de biopsias ósseas, em doentes urémicos.

Fruto da utilização de captadores de fósforo de base alumínica, ou (muito mais raramente) do deficiente tratamento da água utilizada nas soluções dialisantes, muitos doentes em programa crónico de diálise apresentavam acentuados depósitos ósseos de alumínio (97).

Quando um doente é exposto ao alumínio (por longos períodos ou em doses maciças, por períodos curtos), o tecido ósseo constitui o mais importante depósito deste metal (protegendo da toxicidade pelo alumínio, outros órgãos, como o tecido cerebral e o sistema hematopoiético).

O papel da exposição ao alumínio no desenvolvimento da doença óssea adinâmica foi inequivocamente demonstrado pela primeira vez em 1982, registando-se, desde essa data, múltiplos estudos que correlacionam a intoxicação por este metal com a depressão da remodelação óssea (98) (99).

Mais do que o conteúdo total de alumínio no osso, é o seu local de deposição que é relevante na interferência com a remodelação óssea e com a mineralização do tecido osteóide (100).

São os depósitos de alumínio na superfície de mineralização que vão interferir com a atividade osteoblástica e com a maioria das células envolvidas na remodelação óssea (100) (10).

Face à relevância clínica dos depósitos de alumínio na superfície trabecular e à necessidade de, frequentemente, termos de quantificar a evolução destes depósitos em resposta à terapêutica, optámos por otimizar a sua coloração.

Com este objetivo, abandonámos a coloração pelo ácido auritricarboxílico (método que ainda é usado, atualmente, em quase todos os laboratórios de histomorfometria óssea) e passámos a usar, na nossa rotina, o solocromo de azurina.

As principais limitações do ácido auritricarboxílico residem:

1) na frequente dificuldade de contrastar os depósitos de alumínio, que aparecem, habitualmente, corados de vermelho pálido sobre o fundo amarelado da trabécula (ver foto abaixo);

2) na grande variabilidade de resultados entre diferentes laboratórios; e

3) no facto do contraste pelo ácido auritricarboxílico desaparecer rapidamente com o passar do tempo (ao fim de poucas semanas), impossibilitando recontagens e/ou controlos de qualidade das medições efetuadas, (mediante intercâmbio de lâminas entre diferentes laboratórios de histomorfometria) (37).

Pelo contrário, a coloração pelo solocromo de azurina permite obter um contraste nítido e permanente dos depósitos de alumínio. Como principal limitação a ter em conta, sublinhamos o facto desta coloração pelo solocromo de azurina também pôr em evidência os depósitos de ferro (no caso destes existirem).

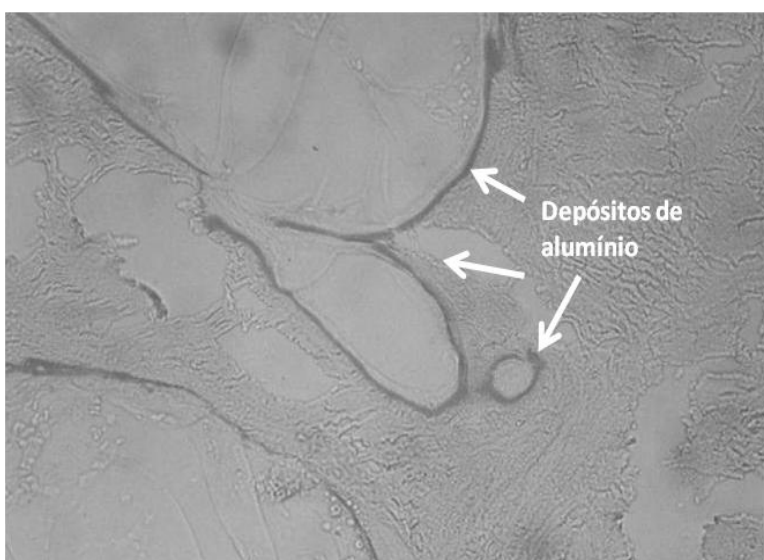
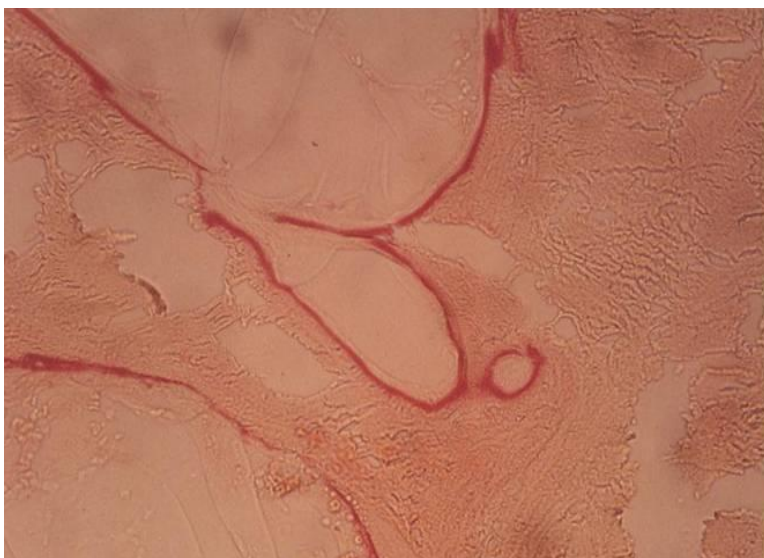
Por este motivo, quando utilizamos a coloração do solocromo de azurina, devemos sempre excluir a presença de depósitos de ferro na superfície trabecular (ver capítulo seguinte) (37).

A sensibilidade do solocromo de azurina no diagnóstico dos depósitos ósseos de alumínio é igualmente muito superior à do ácido auritricarboxílico (15) (101).

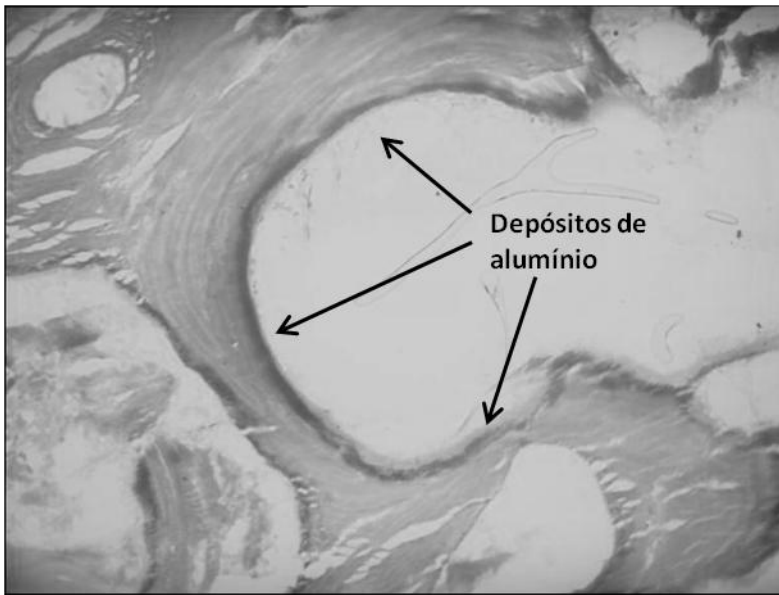
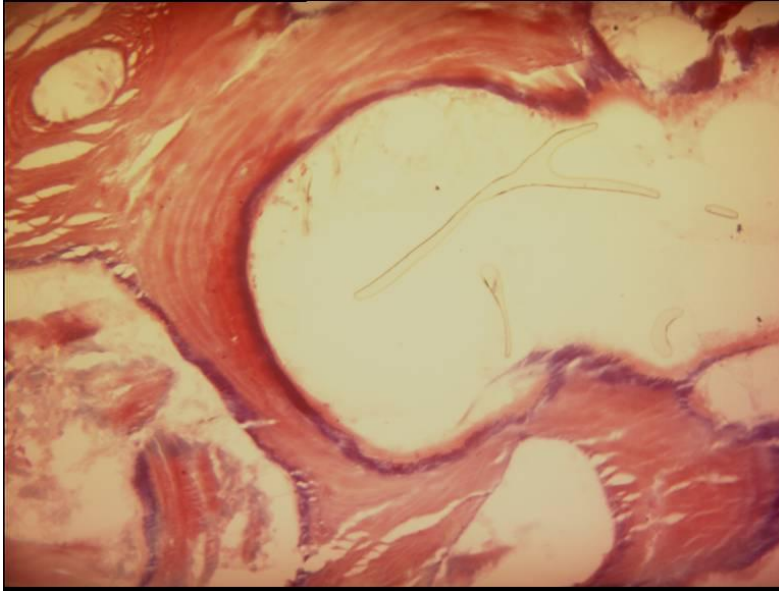
Numa publicação conjunta, que fizemos com o grupo do Prof. Cannata, tivemos oportunidade de documentar este facto: todas as biopsias avaliadas em Oviedo, com positividade para o ácido auritricarboxílico, eram positivas para o solocromo de azurina.

Pelo contrário, 35 casos positivos para o solocromo não coraram pelo ácido auritricarboxílico.

Obviamente foram excluídos, nestas biopsias, depósitos significativos de ferro, os quais poderiam justificar estes resultados (102).



Neste fragmento ósseo os depósitos de alumínio atingem a quase totalidade da superfície trabecular. O contraste destes depósitos, que surgem a vermelho (ver setas acima), tende a esbater-se com o tempo, ficando reduzido a ténues linhas rosa pálido difíceis de medir. Coloração pelo ácido auritricarboxílico (63x).



Observam-se extensos depósitos de alumínio na quase totalidade da superfície trabecular, as quais são identificadas por uma linha azul-escura – roxo, pela coloração do solocromo de azurina. Esta coloração tem a vantagem de não se modificar com o passar do tempo. (63x)

4.1.4 Caracterização dos depósitos de ferro na superfície trabecular

Os depósitos de ferro no tecido ósseo mimetizam os efeitos depressores do alumínio sobre a remodelação e a mineralização óssea, quer no modelo animal, quer em doentes urémicos (103) (104).

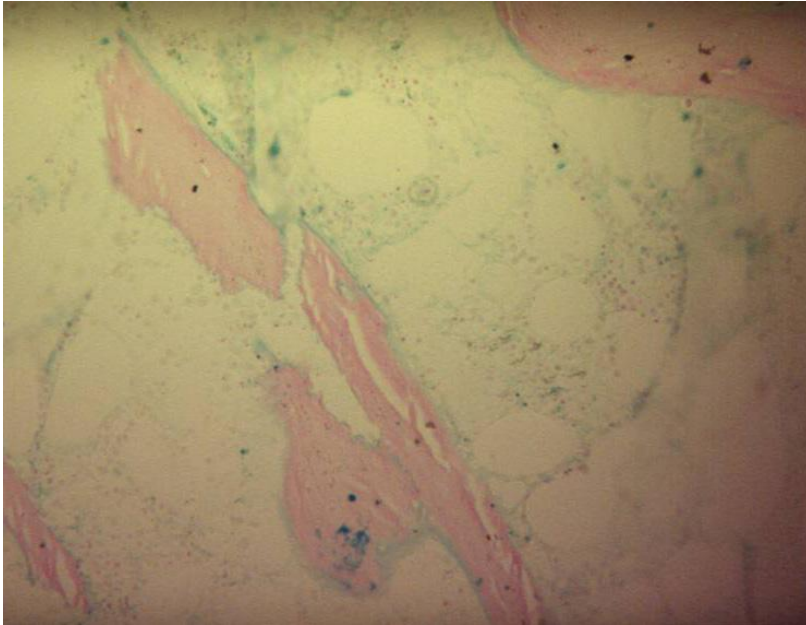
Para evidenciar a presença de depósitos de ferro no tecido ósseo, utilizamos a coloração de PERLS (“Perls Prussian blue”), que efetuamos por rotina em todas as biopsias ósseas realizadas no nosso laboratório.

A presença de marcações simultaneamente positivas pelo solocromo de azurina e pelo PERLS identifica depósitos de ferro. Pelo contrário, caso a positividade seja apenas pelo solocromo de azurina, então os depósitos serão de alumínio.

Esta abordagem tem ganho particular relevância na última década, face ao nítido aumento dos depósitos ósseos de ferro, em associação com a terapêutica com este metal, frequentemente em altas doses, para correção da anemia.

Na nossa casuística, temos encontrado, com frequência crescente, casos de doença óssea adinâmica (e num caso, provável agravamento da osteomalácia) associados a extensos e significativos depósitos ósseos de ferro.

A localização dos depósitos de alumínio e de ferro é sobreponível, observando-se preferencialmente na superfície trabecular (predominantemente na frente de mineralização) (1).



Os depósitos de ferro são identificados pela presença de finas linhas de tonalidade azul claro na superfície trabecular, através da coloração de PERLS (63x).

4.2 Resultados do diagnóstico invasivo da ODR nos doentes portugueses

4.2.1 Comparação com população ibero-americana (manuscrito 10)

Tivemos a oportunidade de comparar os resultados da osteodistrofia renal em 5 países, representativos da zona ibero-americana (Portugal, Espanha, Brasil, Argentina e Uruguai) (102).

Esta foi a primeira publicação comparando os resultados do diagnóstico invasivo da doença óssea e metabólica nos doentes portugueses, com os obtidos noutros centros internacionais (102).

As 113 biopsias ósseas portuguesas, oriundas do nosso laboratório e correspondentes a doentes biopsados no início da década de noventa, apresentaram um diagnóstico histológico sobreponível ao descrito nas 126 biopsias de doentes espanhóis (das quais 58 foram lidas no laboratório de Oviedo e 68 no de Sevilha): 70,5% e 65,9% dos doentes de Portugal e de Espanha, respetivamente, apresentavam doença óssea de elevada remodelação. No que respeita ao diagnóstico de doença adinâmica, os valores foram, respetivamente, 22,1% e 20,6%, para os dois países.

Em Portugal apenas 3,3% dos doentes apresentavam osteomalácia (valor sobreponível aos 3,2% de Espanha).

Estes resultados foram claramente diferentes dos observados nos países da América do sul, onde os quadros histológicos com compromisso da mineralização (osteomalácia e doença óssea mista) representaram 37,3% a 51,7% dos casos.

Curiosamente, se forem consideradas apenas as biopsias ósseas do Brasil e Uruguai realizadas após 1990, os resultados já se aproximam bastante do encontrado nos 2 países ibéricos. Estes dados apontam para a correção, pelo menos parcial, de fatores inibidores da mineralização, como são a deficiência em fósforo (associada a desnutrição / subnutrição proteica), a deficiência em vitamina D ou a intoxicação alumínica.

A importância dos depósitos de alumínio no desenvolvimento de osteomalácia, foi documentado pelo facto de mais de metade dos doentes com este diagnóstico, terem depósitos significativos de alumínio (superiores a 25% da superfície trabecular na coloração do solocromo de azurina).

Nos doentes espanhóis o alumínio estava presente na totalidade dos casos de osteomalácia.

Os resultados desta primeira investigação epidemiológica e histomorfométrica nos doentes portugueses, sublinham a relevância de fatores nutricionais, ambientais, terapêuticos e tóxicos, no estabelecimento da osteodistrofia renal.

Table 1. Number of bone biopsies analysed in the different reference centres (rows), according to geographic area of the dialysis patient origin (columns). In brackets period of years of the bone biopsies

	Brazil 11 states	Uruguay 21 dialysis centres	Portugal 14 dialysis centres	Portugal 1 dialysis centre	Argentina Cordoba dialysis centre	Spain 17 dialysis centres	Spain 1 dialysis centre
Sao Paulo (1985–1996)	782	150					
Lisbon (1992–1996)			113				
Oviedo (1990–1996)				10	29	58	
Seville (1993–1996)							68

Table 2. Characteristics of patients, sex, age, time and type of dialysis, according to the country of origin

	Brazil	Uruguay	Argentina	Portugal	Spain
Number	782	150	29	123	126
(male; female)	(405; 377)	(68; 82)	(12; 17)	(71; 52)	(62; 64)
Age, X ± SD	42 ± 14	54 ± 13	45 ± 13	47 ± 14	49 ± 14
Duration on dialysis (years)	5.7 ± 3.5	4.4 ± 2.7	7.2 ± 3.8	7 ± 4.3	7.6 ± 3.7
% on CAPD	3%		–	–	3%
Diabetics %	–	4.7%	–	–	4%

nium overload when values of Al/BS were $\geq 20\%$, Seville used values $\geq 25\%$. In addition, Lisbon and Oviedo considered positive for solochrome staining when the Al/BS was equal or higher than 25%.

Statistical analysis

Data have been expressed as the mean \pm SD for continuous variables using percentages for categorical variables. For multiple comparison of means and percentages, analysis of variance and Chi² (Pearson) were used. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Results

The characteristics of patients, type and time in dialysis are shown in Table 2. There were no differences between sexes in mean age, type of dialysis treatment or percentage of diabetics. Only in Spain the mean time on dialysis was larger in women than in men (8.4 ± 3.8 vs 6.3 ± 3.7 , $P < 0.05$). The percentages of diabetic patients and patients dialysed by CAPD were low in some centres and absent in other centres. Between centres, there were significant differences in mean age (analysis of variance $P < 0.001$), being the youngest in the Brazilian patients and the oldest patients from Uruguay (Table 2). There were also significant differences in the mean time on dialysis between centres ($P < 0.001$), patients from Uruguay were those who showed the lowest time on dialysis, and patients from Argentina, Portugal and Spain showed the longest time on dialysis (Table 2).

The incidence of the different types of bone disease according to geographic origin is shown in Table 3. There were differences in the distribution of the different bone lesions between centres (Chi², $P < 0.001$) (Table 3). Low turnover osteomalacia and mixed uraemic osteodystrophy were more common in Brazil, Uruguay and Argentina than in Portugal and Spain. By contrast, predominant hyperparathyroid bone disease was more frequent in Portugal and Spain.

There were few differences in the various bone lesions which could be attributed either to the type of dialysis or to the presence of diabetes. In Brazil, patients on CAPD exhibited more histological signs of adynamic bone disease (47% vs 21%, $P < 0.001$) and less low turnover osteomalacia (10% vs 25%, $P = 0.047$) than patients on HD. In Seville, the five diabetic patients undergoing haemodialysis, presented low bone turnover lesions (four adynamic bone disease and one low turnover osteomalacia). In this centre, the preval-

Table 3. Histological diagnosis (%) according to the country of origin

	PBD	MIX	OM	ABD
Brazil	31.3	21.9	25.1	21.7
Uruguay	46.7	18.6	18.7	16
Argentina	38	31	20.7	10.3
Portugal	70.5	4.1	3.3	22.1
Spain	65.9	10.3	3.2	20.6

PBD (predominant hyperparathyroid bone disease, including mild hyperparathyroid); MIX (mixed uraemic bone disease); OM (low turnover osteomalacia); ABD (adynamic bone disease).

ence of low bone turnover lesions in diabetic patients was significantly higher compared with the group of non-diabetic patients ($P < 0.01$).

In countries such as Brazil and Uruguay, in which a high enough number of bone biopsies were performed before and after 1990, a significant variation in the distribution of bone lesions was observed between the two periods of study (Figure 1). The incidence of low turnover osteomalacia decreased after 1990 in both countries, with a significant increment ($P < 0.01$) in the proportion of mixed uraemic osteodystrophy in Brazil and hyperparathyroid bone disease in Uruguay.

Table 4 shows the proportion of bone surface covered by aluminium in the different types of bone disease according to country of origin, reference centre of analysis and criterion for positive aluminium deposition in bone. When comparing centres using aluminon staining, there were significant differences (Chi^2 , $P < 0.0001$) in the proportion of positive aluminon in the hyperparathyroid, and adynamic bone diseases. The lowest percentage of aluminium in the surface was seen in the two centres of Spain. In all centres, independently of the aluminium staining technique used, the extent of aluminium deposited in bone was greater

in patients presenting low-bone turnover, either low turnover osteomalacia or adynamic bone disease, than in the predominant hyperparathyroid bone disease. In those centres who used solochrome of azurine to evaluate aluminium deposition in bone (Lisbon and Oviedo), this method was more sensitive than aluminon to detect aluminium in the bone surface in all types of renal osteodystrophy. In the bone samples analysed in Oviedo ($n = 97$), all aluminon positive samples were solochrome positive, but in 35 cases the staining was positive for solochrome but negative for aluminon (22 cases of predominant hyperparathyroid bone disease, seven cases of mixed uraemic osteodystrophy, and six cases of low turnover bone disease, two low turnover osteomalacia and four adynamic bone disease).

Discussion

The present study provides an evaluation of the distribution of the types of renal osteodystrophy from different centres of five Iberoamerican countries. This study shows geographical differences in the prevalence of the various histological forms of renal osteodys-

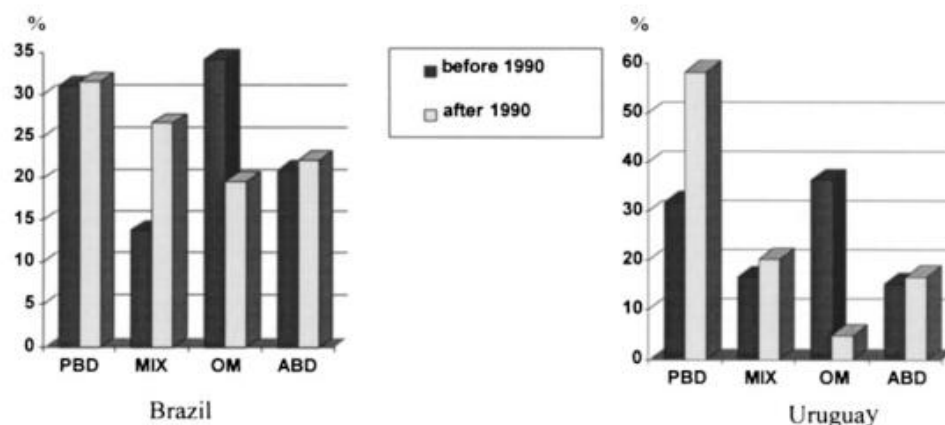


Fig. 1. Histological diagnosis (%) in Brazil and Uruguay according to years of bone biopsies (before 1990 in black, and after 1990 in white). PBD (predominant hyperparathyroid bone disease, including mild hyperparathyroid); MIX (mixed uraemic bone disease); OM (low turnover osteomalacia); ABD (adynamic bone disease).

Table 4. Percentage of bone Al positive in bone in each type of ODR (exact binomial 95% confidence interval in brackets), by country of origin, reference centre analysis and criterion of bone Al positive

	PBD	MIX	OM	ABD
Brazil	44 (38–51)	56 (48–64)	69 (62–76)	75 (68–82)
Uruguay	43 (31–55)	46 (28–66)	71 (51–87)	92 (73–99)
Portugal ^{a,b}	43 (32–54)	80 (28–99)	50 (7–93)	81 (62–94)
Argentina ^a	27 (6–61)	56 (26–86)	100 (54–100)	33 (1–91)
Argentina ^c	0 (0–28)	22 (3–60)	83 (36–100)	0 (0–71)
Oviedo ^a	45 (29–62)	87 (47–100)	100 (16–100)	62 (25–91)
Oviedo ^c	7 (2–20)	37 (8–75)	100 (16–100)	25 (3–65)
Spain-Seville	7 (1–19)	80 (28–99)	100 (16–100)	28 (10–53)

^aAluminium considered positive either by aluminon and solochrome staining, ^bincluding 10 cases analysed in Oviedo, ^c% of bone aluminium positive by aluminon staining only.

trophy. Predominant hyperparathyroid bone disease was the most frequent bone lesion in dialysis patients from Spain and Portugal (66% and 70%, respectively), whereas mixed and low turnover osteomalacic lesions accounted for < 14%. By contrast, the centres of South America showed a high prevalence of mixed and low-bone turnover lesions, (37–51% of the dialysis patients). However, in Brazil and Uruguay, when only bone biopsies after 1990 were considered, there was a significant reduction in the low-bone turnover osteomalacia. In Uruguay, the pattern of renal osteodystrophy in patients with bone biopsies performed after 1990 was similar to the pattern observed in Portugal and Spain, except for the high proportion (20%) of patients with mixed uraemic osteodystrophy.

In this study, patients studied using bone biopsy were selected because they were symptomatic, hypercalcaemic, or presented some clinical, radiological, or laboratory finding which makes it advisable to use this procedure. Therefore, all the results shown in this study must be analysed taking into account this important selection criterion and they cannot be compared with other studies performed in non-selected dialysis populations [5,6]. In this study there were no similar number of patients from different countries (small number from Argentina) and also a few CAPD and diabetic patients. Despite the above mentioned limitations the analysis of different centres' results gives useful knowledge of some aspects of renal osteodystrophy in different countries. The differences in the types of renal osteodystrophy observed between countries and among the same countries over time, could not be explained by differences in sex, age, time on HD or CAPD, or percentage of diabetic patients. The main reason for the observed differences and also for the changes in the pattern of renal osteodystrophy appears to be related to the variation in aluminium-overload. Supporting this explanation, is the high percentage of positive aluminium staining in bone biopsies from Brazil and Uruguay (59%, 95% CI 56–62%), countries in which the magnitude of aluminium exposure has been reported to be very high [7]. This high level of aluminium related toxicity contrasts with the values observed in Spain (19%, CI 13–27%), using the same histological criteria and staining techniques. These differences were more relevant in the cases of hyperparathyroid and adynamic bone diseases (see Table 4).

The differences in the evolution of the pattern of bone lesions observed in Brazil and Uruguay could be partly related to the improvement in the dialysis water treatment [8]. In Brazil the use of deionization in dialysis centres has increased from 75% in the period 1985–1990 to almost 95% in 1991–1996, but the number of centres using reverse osmosis still are very low (< 10%). Uruguay has also made a great improvement in the treatment of water used for dialysis. In Brazil the low phosphorus intake may have also played an independent role as a cause of low bone turnover disease [9].

The present study shows that the percentage of patients with adynamic bone disease is ~20%, which

is close to the percentage found in previous extensive surveys from several geographical areas [10–12]. These findings differ from other reports [5,6] that found higher percentages of patients with adynamic bone disease, even from the same geographical area [6]. The main reasons to explain the differences found among the present study and others [10–12] compared with previous reports from Canada [5] and Spain [6], could be multifactorial, but the low percentage of CAPD and diabetic patients, and the selection criteria to perform the bone biopsy may be the most important. Many studies have shown that patients on CAPD exhibited more histological signs of adynamic bone disease and less predominant hyperparathyroid bone disease than patients on HD [10,13]. In the present study, also the few Brazilian patients on CAPD showed significant higher incidence of adynamic bone disease than the HD patients, and four out of the five diabetic patients from Seville showed adynamic bone disease.

The criteria selection for bone biopsies, in our study is comparable to the extensive surveys of Malluche, and Faugere and Ballantini [10,12] showing also that more than a quarter of the biopsies with adynamic bone disease still have high percentage of aluminium covering the bone surface.

On the other hand, as we have previously published [14] we have found a great variation in the proportion of positive aluminium bone deposition according to the histochemical staining method used. Solochrome azurine was a more sensitive method than aluminon to detect aluminium in bone samples [14–16]. Using solochrome staining, two thirds of the patients from Portugal and Spain with adynamic bone disease had a stainable bone surface aluminium > 25%, pointing out that aluminium still may play a role in the pathogenesis of adynamic bone disease. In several circumstances aluminon staining could not be a sensitive method to adequately detect bone aluminium-overload in dialysis patients.

In summary, the present study demonstrates differences between countries in the prevalence of different forms of renal osteodystrophy, possibly mainly due to differences in the bone aluminium-overload and other factors, such as nutrition may play a role in some countries like Brazil. Therefore, the degree of control of the aluminium-exposure sources seems to be determinant in the evolution of the different types of renal osteodystrophy in recent years.

Acknowledgements. The studies in bone metabolism had received support from Fondo de Investigaciones Sanitarias, and Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo (Spain), Conicor (Argentina), and University of Sao Paulo (Brasil). The authors thank Dr Walter Douthat, Dr Pablo Massari, Dr Carlos Gómez-Alonso, Mercedes Serrano Arias, Angeles Gonzalez Carcedo, Maria Joao Galvao and Ana Fernández Rebollar for their contributions to this study.

References

1. Malluche HH, Faugère MC. Renal bone disease 1990: an unmet challenge for the nephrologist. *Kidney Int* 1990; 38: 193–211
2. Llach F, Bover J. Renal osteodystrophy in the kidney. Brenner

- BM, ed. Vth Edition. WB Saunders Company. USA. 1996; 2187-2273
3. Cannata JB, Torres A. *Osteodistrofia renal*. Farreras Rozman, Medicina Interna, XIIIth Edition. Doyma. Barcelona. 1995; 1080-1083
 4. Antonsen JE, Sherrard DJ. Renal osteodystrophy: Past and present. *Seminars Dial* 1996; 9: 296-302
 5. Sherrard DJ, Hercz G, Pei Y, Maloney NA, Greenwood C, Manuel A, et al. The spectrum of bone disease in end-stage renal failure—an evolving disorder. *Kidney Int* 1993; 43: 436-442
 6. Torres A, Lorenzo V, Hernández D, Rodríguez JC, Concepción MT, Rodríguez AP et al. Bone disease in predialysis, hemodialysis, and CAPD patients: Evidence of a better bone response to PTH. *Kidney Int* 1995; 47: 1434-1442
 7. Ambrosoni PM. Intoxicación aluminica. Métodos diagnósticos. *Nefrología* 1993; XIII: S83-S88
 8. Cannata Andía JB, Douthat W, Acuña Aguerre G, Fernández Martín JL. Aluminium toxicity: the role of prevention. *Life Chem Rep* 1994; 11: 207-213
 9. Jorgetti V, Ricco Soeiro M, Mendes V, Pereira C, Crivellari ME, Coutiris G et al. Aluminium-related osteodystrophy and desferrioxamine treatment: role of phosphorus. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9: 668-674
 10. Malluche HH, Faugere M-C. Risk of adynamic bone disease in dialyzed patients. *Kidney Int* 1992; 42: S62-S67
 11. Monier-Faugere M-C, Malluche HH. Trends in renal osteodystrophy: a survey from 1983 to 1995 in a total of 2248 patients. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: S111-S120
 12. Ballanti P, Wedard BM, Bonucci E. Frequency of adynamic bone disease and aluminium storage in Italian uraemic patients—retrospective analysis of 1429 iliac crest biopsies. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 662-667
 13. Pei Y, Hercz G, Greenwood C, Segre G, Manuel A, Saiphoo C, Fenton S, Sherrard D. Risk factors for renal osteodystrophy: A multivariate analysis. *J Bone Miner Res* 1995; 10: 149-156
 14. Fernández-Martín JL, Menéndez P, Acuña G, Canteros A, Gómez C, Cannata JB. Staining of bone aluminium: comparison between aluminon and solochrome azurine and their correlation with bone aluminium content. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: S80-S85
 15. Denton J, Freemont AJ, Ball J. Detection and distribution of aluminium in bone. *J Clin Pathol* 1984; 37: 136-142
 16. Kaye M, Hodsmann AB, Malynowsky L. Staining of bone for aluminium: use of acid solochrome azurine. *Kidney Int* 1990; 37: 1142-1147

4.1.1 Evolução da prevalência dos depósitos ósseos de alumínio

Até à década de 90, a maioria dos doentes com o diagnóstico de doença óssea adinâmica, apresentavam extensos e significativos depósitos ósseos de alumínio, traduzindo intoxicação por este metal (100).

Como já referimos, mais do que o conteúdo ósseo total em alumínio, é a localização deste metal na superfície de mineralização, que contribui para a inibição da formação e/ou da mineralização óssea, conduzindo ao desenvolvimento de doença óssea adinâmica ou de osteomalácia, respetivamente (100) (7).

Também nós, nas primeiras 106 biopsias ósseas realizadas na nossa unidade, encontrámos extensos depósitos ósseos de alumínio em 85% dos casos (24 doentes) com o diagnóstico de doença óssea adinâmica / baixa remodelação (40).

Pelo contrário, na última década, e à semelhança do descrito por outros grupos, a presença de depósitos significativos de alumínio na superfície trabecular dos nossos doentes tem sido uma raridade (39). Num estudo recente, efetuado em 100 doentes portugueses, apenas 3 apresentavam significativos depósitos ósseos de alumínio (33).

4.1.2 Avaliação prospetiva da ODR após transplantação renal (manuscrito 11)

Em nossa opinião, a caracterização da osteodistrofia renal após transplantação ganha particular relevância, pelo fato desta patologia, neste contexto, depender de múltiplos fatores etiopatogénicos, muitos deles de sentido oposto (por exemplo estimuladores e inibidores da remodelação óssea) (105).

O tecido ósseo do doente transplantado é modulado por diferentes fatores (com efeitos no volume, estrutura e mineralização óssea) como, por exemplo, os que dependem do género e idade do doente, da função renal pós-transplantação,

do tipo de osteodistrofia apresentada antes da transplantação (incluindo tempo de permanência em diálise e comorbilidades associadas), da terapêutica imunossupressora realizada, da eventual suplementação vitamínica, etc. (105).

Na população em geral, a partir da terceira década de vida, observa-se um desequilíbrio entre a formação e a reabsorção (com vantagem para esta última), o qual é mais evidente nas mulheres transplantadas, após a menopausa (105).

A hipofosfatemia, acompanhada de hiperfosfatúria, constitui uma das alterações metabólicas mais frequentes na fase precoce (primeiro mês) após transplantação renal. A incidência da hipofosfatemia, nesta fase, tem sido descrita, por vários grupos, em mais de 90% dos casos.

No entanto, mesmo quando a fosfatemia tende a normalizar, é muito frequente a manutenção de hiperfosfatúria, que se prolonga frequentemente para além do quinto ano após transplantação.

A hipofosfatemia associou-se a aumento da apoptose dos osteoblastos, o que poderá justificar, pelo menos em parte, a elevada incidência de doença óssea adinâmica, no período precoce após transplantação renal (106).

A hiperfosfatúria após transplantação renal (condicionando ou não hipofosfatemia prolongada), resulta da diminuição da reabsorção de fósforo nas células epiteliais dos tubos contornados proximais (106).

Esta diminuição é, muito frequentemente, de causa multifatorial (107), sendo de salientar como principais mecanismos etiopatogénicos: o hiperparatiroidismo secundário persistente (e desadequado perante um rim com função tubular restabelecida) (108) (109), níveis séricos elevados de fosfatidinas (como o FGF-23) (110), deficiência em vitamina D (111) (112), corticoterapia (109) e imunossupressão com inibidores da calcineurina ou com rapamicina (106).

Com tantos fatores envolvidos e, frequentemente, com tempos de atuação muito diversos, facilmente se compreende a nossa proposta de ver considerada,

mais frequentemente, a avaliação invasiva da doença óssea, após transplantação renal (113).

Parece-nos que a realização de biopsias ósseas para avaliação da osteodistrofia renal deve ser realizada, com maior frequência, nos doentes transplantados, até porque, nesta fase, os resultados do exame invasivo podem condicionar respostas mais rápidas e duradouras a diferentes alternativas terapêuticas (114).

Apesar do restabelecimento de grande parte da função renal após a transplantação renal, mais de 80% dos doentes transplantados continuam a apresentar alterações significativas da histologia óssea, 5 anos após a transplantação (115).

Para além da terapêutica com corticóides, os quais, como referimos, exercem um efeito depressor da remodelação óssea, também os inibidores da calcineurina têm sido associados, persistentemente, à redução do volume ósseo após transplantação renal (105) (116) (117).

Os protocolos terapêuticos com os inibidores da calcineurina quer utilizando a ciclosporina quer o FK-506, parecem conduzir a resultados sobreponíveis, que conduzem a um significativo aumento da atividade osteoclástica, com redução do volume ósseo total (114) (118).

O grupo de Malluche e colaboradores descreveram, numa população de 57 transplantados renais, sujeitos a biopsia óssea (em média 5,6 anos após o transplante), que o volume ósseo total e a remodelação óssea diminuía em paralelo, à medida que aumenta a duração do período pós transplantação (119).

Todos os doentes fizeram imunossupressão com prednisolona, azatioprina e ciclosporina e 91% tinham níveis séricos de calcitriol normais, aquando da realização da biopsia óssea.

Em 21 destes 57 doentes observava-se um compromisso da mineralização, que atingiu os critérios para o diagnóstico histológico de osteomalácia, em 9 casos (119).

Curiosamente, evidenciaram-se depósitos ósseos de alumínio, significativos em 9 doentes, maioritariamente do conjunto dos que apresentavam compromisso da mineralização óssea. (119).

Numa avaliação recente, também incidindo numa população de 57 doentes sujeitos a transplantação renal, 47,4% dos indivíduos apresentavam ainda osteodistrofia renal com doença de elevada remodelação, nas biopsias ósseas realizadas, em média, 43 meses após transplantação. Nesta avaliação, apenas 8,7% dos doentes apresentava parâmetros histomorfométricos normais (120).

Pelo contrário, numa população de 16 transplantados renais mexicanos, sem retenção azotada ao fim de 84 meses (aquando da realização da biopsia óssea), foi documentada uma elevada prevalência de doença óssea adinâmica, associada a redução da densidade óssea (com redução significativa do índice “Z”) quer na coluna lombar quer no colo do fémur.

Um aspeto relevante deste estudo foi que mesmo os doentes com adinamia óssea apresentavam, na sua maioria, níveis circulantes de iPTH significativamente elevados em relação ao normal.

Nestes 16 doentes, para além dos eventuais efeitos da corticoterapia na depressão da remodelação óssea, observavam-se significativos depósitos ósseos de ferro na superfície trabecular (em 10 de 16 doentes), os quais poderão ter contribuído, decisivamente, para o desenvolvimento de doença adinâmica (104).

Resultados diferentes foram descritos numa população de 20 doentes venezuelanos, sujeitos a transplantação renal cerca de 5 anos antes, nos quais predominou a redução do osso trabecular, o aumento da atividade osteoclástica e da reabsorção óssea, a par da inibição da formação óssea e do prolongamento do tempo de mineralização.

No seu conjunto, estes dados histomorfométricos apontam para um compromisso da mineralização e um desequilíbrio a favor da reabsorção, conduzindo à acentuada redução da densidade óssea (que foi confirmada, nesta investigação, por densitometria) (121).

Mais recentemente, numa população de doentes transplantados renais, com marcadores bioquímicos de hiperparatiroidismo secundário, incluindo valores elevados de PTH intacta e de hipercalcemia, os resultados das biopsias ósseas realizadas, mostraram em 9 destes doentes, como esperado, doença óssea de elevada remodelação. No entanto, surpreendentemente, 8 doentes (com PTH elevada) tinham doença óssea adinâmica (122).

Em biopsias ósseas realizadas nos primeiros 3 meses após transplantação renal, foi documentada uma redução da osteoblastogénese e um aumento da apoptose dos osteoblastos, que poderão contribuir decisivamente para o desenvolvimento, nesta fase, de doença óssea adinâmica (123).

No seu conjunto, os resultados acima discutidos ilustram a grande variabilidade de diagnósticos de osteodistrofia renal, que podem ser encontrados após transplantação renal.

Esta diversidade e a influência de múltiplos fatores etiopatogénicos interdependentes entre si, sublinham a necessidade de recorrermos, mais frequentemente, à realização de biopsias ósseas nesta população, como defendemos no início deste capítulo, e tal como é proposto nas orientações da KDIGO (Kidney International 2009;76,Suppl 113, página S100).

Infelizmente, as investigações prospetivas da osteodistrofia renal, mediante a realização de dupla biopsia óssea, para caracterizar a evolução da doença óssea após transplantação renal, são uma raridade na literatura médica.

O grupo brasileiro de Aluísio Carvalho e colaboradores publicou em 2004 os resultados referentes a 20 doentes transplantados renais, sujeitos a dupla biopsia óssea, com 6 meses de intervalo.

Dos 12 doentes que apresentavam doença adinâmica na biopsia basal 5 normalizaram a remodelação óssea, enquanto nos restantes se observou uma evolução favorável da taxa de formação óssea.

De entre os 8 doentes com osteíte fibrosa aquando do transplante renal, 5 doentes vieram a reduzir, de forma patológica, a remodelação óssea (3 destes

doentes apresentavam depósitos significativos de alumínio ou de ferro, na superfície trabecular) (66).

Na nossa investigação, tivemos igualmente a possibilidade de proceder à avaliação da evolução da osteodistrofia renal após transplantação renal, num estudo prospetivo, realizado em colaboração com a unidade de transplantação do hospital de Santo António (Porto).

Apesar de apenas oito doentes terem completado o protocolo (com biopsia óssea no dia 0 e após 6 meses de transplantação), os resultados histomorfométricos mostraram uma evolução muito semelhante em todos os casos, observando-se um aumento da mineralização óssea e da superfície osteoblástica, a par duma significativa redução da atividade osteoclástica e da superfície trabecular com depósitos de alumínio.

Embora estas diferenças não tenham atingido significado estatístico (muito provavelmente pela pequenez da amostra avaliada), importa realçar que a evolução da osteodistrofia renal foi muito favorável neste grupo de 8 doentes, 6 dos quais apresentavam à data da transplantação, significativos e extensos depósitos ósseos de alumínio, (124).



Renal Osteodystrophy: Histologic Evaluation After Renal Transplantation

L. Martins, J. Queirós, A. Ferreira, A.C. Henriques, A.M. Samento, M.C. Pereira, and S. Guimarães

SUCCESSFUL RENAL transplantation (RT) is able to solve most problems of uremic or dialyzed patients (pt). However, renal osteodystrophy (RO) is often a long-lasting problem, and bone disease can even worsen after RT. In fact, significant changes in bone histology have been seen up to 5 years after the procedure in more than 80% of pt with a well-functioning kidney graft.¹ Several factors, including age,^{2,3} sex,^{4,5} underlying renal disease,³ time of dialysis,⁶ type and severity of RO pre-RT,^{2,6} and also immunosuppressive drugs^{4,7} may contribute to persistence or worsening of RO.

Therefore, bone disorders still are a relevant morbidity factor for RT, often difficult to handle. Dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) is useful to measure bone mineral density,⁵ but mineralized bone biopsy (BB) is the gold standard to evaluate type and severity of RO. Only a few have prospectively evaluated bone histology after RT. We conducted a prospective study on renal transplant pt to analyze the histologic evolution of RO after RT.

PATIENTS AND METHODS

Eight pt who completed the study were submitted to a first BB on day 0 and a second BB 6 months after RT. The second BB was performed after 500 mg dimethylchlorotetracycline/day, double labeling (3 days on, 10 days off, 3 days on). Transiliac bone biopsies using the trephine of Bordier-Meunier with an internal diameter of 8 mm were obtained in all pt. The bone specimens were fixed for 24 hours in methanol, dehydrated, and embedded in methylmethacrylate. Undecalcified sections of 5- μ m thickness were made using a microtome (Model Leica RM 2155, Germany) equipped with a tungsten carbide knife. Three nonconsecutive sections were stained with Toluidine blue, acid phosphatase, and von Kossa. Two were stained with a specific histochemical stain for detection of aluminum in bone (azurin solochrome) and one with a PERLS histochemical stain for detection of iron in bone. Each bone section was read twice by two different persons, without knowledge of clinical or biochemical information on the pt. All sections were analyzed quantitatively for static parameters of bone formation and bone reabsorption. Histomorphometric measures were carried out using a semiautomatic image analyzer (Q-Win, Leica, Germany) coupled with a Leitz microscope. Approximately 40 different fields were analyzed for the same bone biopsy. Normal bone histomorphometric values are from Vernejoul et al.⁸ The bone histomorphometric parameters below, expressed according to the standardized nomenclature,⁹ were measured in trabecular bone.

All the pt were checked for intact parathyroid hormone (iPTH),

total alkaline phosphatase (tAP), serum calcium (Ca), and serum phosphate (P) at time 0 and at 6 months. Serum creatinine was also checked at 6 months. No patient received calcium or calcitriol therapy after kidney transplantation. The immunosuppressive regimen used was cyclosporine A (CsA) and prednisone in all pt; one pt also had azathioprine; two pt also had antithymocytic globulin; and another two also had micophenolate mofetil. Steroids were used as three initial bolus of 500 mg methylprednisolone, followed by 0.5 mg/kg per day of prednisone, tapered to 10 mg/d at the end of the third month (our maintenance dose). None experienced acute rejection episodes, so no further steroid bolus were used.

For the statistical analysis, paired *t* test and Wilcoxon test were used.

RESULTS

Our study group was composed of five females and three males, with a mean age of 50.4 ± 9.8 years old (ranging from 27 to 57). Their mean time on dialysis (all of them were on hemodialysis) was 43.4 ± 31.3 months (5 to 97 months). The underlying renal disease was unknown in two pt, chronic glomerulonephritis in one pt, polycystic kidney disease in three pt, and chronic interstitial nephritis in two pt.

The mean and range of initial iPTH was 348.4 ± 440.1 pg/mL (38.3 to 1288), and the final iPTH was 76.9 ± 45.0 pg/mL (19 to 149), with the difference statistically significant ($P = .012$). The mean initial tAP was 75.5 ± 19.7 U/L, and the final tAP was 95.8 ± 32.8 U/L, although this increment was not significant ($P > .05$). There was a significant elevation on Ca during these 6 months (2.12 ± 0.16 vs 2.36 ± 0.13 mmol/L; $P = .001$) and a highly significant decrease on P between the two measurements (6.40 ± 0.95 vs 3.13 ± 0.24 mg/dL; $P < .001$). The mean serum creatinine at month 6 was 1.2 ± 0.3 mg/dL.

The histologic diagnosis from the initial and the final BB is shown on Table 1. Between the two BB, we verified an

From the Departments of Nephrology (L.M., J.Q., A.C.H., A.M.S., S.G.), and Transplant (M.C.P.), Hospital de Santo António, Porto, Portugal and Nephrology (A.F.), Hospital Curry Cabral, Lisboa, Portugal.

This work was supported by a Portuguese Government grant (Health Ministry).

Address reprint requests to Dr L.S. Martins, Nephrology Department, Hospital Santo António, 4050 Porto, Portugal.

Table 1. Bone Histology and Their Evolution Between the Two BB

Patient	First BB	Second BB
1	Moderate HPTH; extensive Al deposits; normal mineralization	Mild HPTH; decrease in Al deposits; mineralization not significantly compromised
2	Mild HPTH, severe osteoporosis, extensive Al deposits	HPTH persists (predominant bone formation); Al deposits diminished; normal mineralization
3	Severe HPTH, without Al deposition; normal mineralization	Quite normal histology and normal bone volume
4	Moderate HPTH; significant Al deposits; normal mineralization	Improved HPTH, evolving to low-turnover bone disease; Al deposits decreased; osteoporosis
5	Quite normal bone histology; without significant Al deposition	Quite normal histology
6	Severe HPTH (predominant bone formation); extensive Al deposits; normal mineralization	Moderate HPTH; Al deposits decreased; mineralization mildly compromised
7	HPTH on the past, evolving to adynamic bone disease; extensive Al deposits; osteoporosis	Normal bone volume (osteoporosis improved); Al deposits diminished; normal mineralization
8	Low-turnover bone disease; normal bone volume; significant Al deposits	Mild HPTH; important decrease in Al deposits; normal bone volume

HPTH = hyperparathyroidism; Al = aluminum.

increase in mineralized bone, an increase in osteoblastic and osteoid surfaces, a decrease in osteoclastic surface and osteoclast number, and a decrease in aluminum surface. However, these changes were not statistically significant (see Table 2).

DISCUSSION

RT normalizes phosphate urinary excretion and calcitriol production,² two of the most important deficiencies of the uremic state implicated in RO. Also, aluminum overload is efficiently removed by a functioning RT, although this can take more than 1 year.² Dialysis-related amyloidosis complaints usually rapidly improve, although the cystic lesions persist.² However, severe pre-RT hyperparathyroidism (HPTH), especially nodular hyperplasia, may not improve after RT; indeed this may cause severe hypercalcemia and graft dysfunction,¹⁰ making surgery necessary. Moreover, steroids given for RT have a well-known effect on bone, leading to bone mass loss⁴ and contributing to avascular bone necrosis. CsA has also been associated with osteopenia⁷ and with a disabling bone pain syndrome.¹¹ In addition, adynamic bone disease has increased in the last years,³ and although its significance is uncertain, it may contribute to osteopenia observed after RT.

As easily understood from our results, some of the pt had severe aluminum load pre-RT, which expectedly decreased on second BB. However, high-turnover bone disease, although not extremely severe, was the most frequent cause

of RO. These results are in accordance with the literature.^{2,3} Pre-RT severe osteoporosis was also identified in two pt. Intact PTH and tAP decreased between the two measurements, as previously described,¹² and P showed the expected lowering. On the contrary, Ca significantly increased during this time interval, never reaching risky levels. This increment may be long lasting and probably is due to nonsolved HPTH.¹⁰ All the pt always had a good graft function.

A significant loss in bone mass early after RT was made evident by DEXA measurements, predominantly at the lumbar spine. Up to 6.8%¹² or even up to 10%² reduction on bone mass in the first 5 or 6 months has been seen. Fortunately, this extremely high rate of bone loss progressively falls: there are studies showing a trend toward improvement after the sixth month⁵ and recovery at month 12,⁵ or normalization of bone mass only 2 years after RT.² The less encouraging results show that the loss still exists more than 8 years after RT, with a bone loss rate of 1.7% per year.¹³

However, there is a lack of studies with histologic analysis clarifying how the dynamic process of bone remodeling really is functioning after RT. Some of the few published works described a reduction in bone reabsorption, but with low bone formation rate, as early as 6 months¹² and even several months later.¹⁴ Our study, with the handicap of only eight pt enrolled, showed a trend toward improvement in bone histology. Although the histologic changes between

Table 2. Bone Histomorphometry and Its Evolution Between the Two BB

	First BB	Second BB	P value
Mineralized surface (%)	32.99 ± 15.78	34.46 ± 11.08	.780
Osteoid surface (%)	4.11 ± 2.86	4.73 ± 2.68	.676
Trabecular surface (%)	37.10 ± 16.25	39.20 ± 12.02	.699
Osteoblastic surface (%)	5.72 ± 6.67	6.59 ± 5.46	.769
Osteoclastic surface (%)	3.05 ± 2.34	1.78 ± 1.87	.176
Trabecular surface with aluminum (%)	39.83 ± 35.38	30.98 ± 28.73	.228
Number of osteoclasts/mm ²	3.43 ± 2.79	2.45 ± 1.96	.302

the two BB did not reach statistical significance, we observed a trend toward improvement in bone formation and mineralization, with reduction of bone reabsorption and also important aluminum removal.

In conclusion, we can say that 6 months after RT there is already a trend toward improvement in RO, which can probably be clearly apparent a few months later, according to DEXA results. A longer follow-up is needed to confirm these results.

REFERENCES

1. Bonomini V, Felleli C, DiFelice A, et al: *Adv Exp Med Biol* 178:207, 1984
2. Massari PU: *Kidney Int* 52:1412, 1997
3. Cannata-Andía JB: *Kidney Int* 54:1000, 1998
4. Wolpaw T, Deal CL, Fleming-Brooks S, et al: *Transplantation* 58:1186, 1994
5. Almond MK, Kwan JTC, Evans K, et al: *Nephron* 66:52, 1994
6. Nehme D, Rondeau E, Paillard F, et al: *Nephrol Dial Transplant* 4:123, 1989
7. Movsowitz C, Epstein S, Fallon M, et al: *Endocrinology* 123:2571, 1988
8. Vernejoul MC, Belenguer R, Halkidou H, et al: *Bone* 6:15, 1985
9. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al: *J Bone Min Res* 2:595, 1987
10. Julian BA, Quarles LD, Niemann KM: *Am J Kidney Dis* 19:99, 1992
11. Torregrosa JV, Campistol JM: *Nephrol Dial Transplant* 14:1364, 1999
12. Julian BA, Laskow DA, Dubovsky J, et al: *N Engl J Med* 325:544, 1991
13. Pichette V, Bonnardeaux A, Prudhomme L, et al: *Am J Kidney Dis* 28:105, 1996
14. Velasquez-Forero F, Mondragón A, Herrero B, et al: *Nephrol Dial Transplant* 11(suppl 3):58, 1996

Para além dos quadros de osteodistrofia renal acima descritos, a necrose avascular da cabeça do fémur constitui a patologia óssea mais debilitante associada à transplantação.

No início da década de oitenta, esta patologia observava-se em cerca de 15% dos doentes transplantados, durante os primeiros 3 anos após transplantação (125).

Posteriormente, observou-se uma significativa redução na sua prevalência (126).

A necrose avascular surge não apenas após a transplantação de órgãos, mas igualmente noutras patologias sujeitas a corticoterapia prolongada, como o lúpus eritematoso sistémico e a asma brônquica (127) (128).

Por este motivo, a necrose avascular tem sido associada, diretamente, à utilização prolongada da corticoterapia, propondo-se como possível mecanismo etiopatogénico o aumento da pressão hidrostática intraóssea, induzida pelos extensos depósitos de gordura, com compromisso secundário da vascularização sanguínea.

Em alternativa, os corticóides, pelo seu comprovado efeito inibidor da remodelação óssea, podem impedir a consolidação de micro fraturas e comprometer a integridade óssea (129) (130).

Embora a imunossupressão com ciclosporina A tenha sido, inicialmente, associada a menor incidência de necrose avascular (provavelmente por condicionar uma diminuição das doses cumulativas de corticóides) (131), os resultados posteriores de estudos *in vitro* e *in vivo* foram contraditórios.

Enquanto alguns autores demonstram um efeito inibidor da ciclosporina sobre a remodelação óssea (132), outros, pelo contrário, evidenciaram um aumento da reabsorção óssea com balanço ósseo final negativo (133).

Este último grupo conseguiu ainda, num modelo animal, inibir a perda de massa óssea induzida pela ciclosporina, através da administração simultânea de calcitriol (112).

A osteodistrofia renal após transplantação renal apresenta múltiplas especificidades, algumas das quais foram acima discutidas (106).

A hipofosfatemia secundária à hiperfosfatúria (sendo esta última desencadeada por níveis elevados de PTH e de FGF-23, bem como pela corticoterapia, deficiência em vitamina D e eventual acidose metabólica) é um achado muito frequente.

Também a terapêutica com bifosfonatos, com o objetivo de prevenir a perda de massa óssea, associada à corticoterapia prolongada após transplantação renal, deve merecer cuidadosa avaliação prévia (em nossa opinião mediante a realização de biopsia óssea).

Esta terapêutica após transplantação renal, pode conduzir ao agravamento da doença adinâmica, tal como foi demonstrado, por Coco e colaboradores, num estudo prospetivo, aleatorizado, com dupla biopsia óssea (134).

Ao fim de 6 meses, todos os doentes tratados com pamidronato apresentavam doença óssea adinâmica, enquanto os restantes casos, tratados sem pamidronato, mantiveram uma prevalência deste diagnóstico sem modificações em relação à biopsia óssea basal.

As alterações histológicas associadas à terapêutica com bifosfonatos podem ser muito características, surgindo os osteoclastos (ainda que ativados e com acentuada expressão da fosfatase ácida) afastados das trabéculas ósseas e longe das lacunas de reabsorção.

4.2 Histomorfometria óssea na validação de “novas terapêuticas” da osteodistrofia renal

Para além do diagnóstico preciso do tipo de osteodistrofia renal, presente em determinada fase da evolução clínica de um doente urémico, a histomorfometria óssea é de grande relevância na validação de novas terapêuticas do metabolismo ósseo e mineral.

Tendo em conta que o tecido ósseo constitui o reservatório mais relevante dos iões fósforo, cálcio e magnésio, bem como o órgão responsável pela síntese de importantes mediadores (como o FGF 23) ou o tecido alvo de várias hormonas, vitaminas e citocinas que atuam no osso (como a PTH, a vitamina D, a IL6, a osteoprotegerina, o RANKL, etc.), facilmente se percebe a relevância da histomorfometria óssea, na avaliação da eficácia e da segurança de novas intervenções terapêuticas.

Tivemos a possibilidade de integrar a equipa de investigadores que avaliou os efeitos no osso e no metabolismo mineral, mediante o recurso a duplas biopsias ósseas com histomorfometria, de dois novos captadores do fósforo, utilizados nos doentes urémicos em estágio 5d.

Ambos os estudos consistiram em ensaios prospetivos, aleatorizados, com um ano de duração e dupla biopsia óssea (no início e no final). Em ambos foi utilizada como braço de comparação com os novos captadores de fósforo, a terapêutica da hiperfosfatemia convencional, (com carbonato de cálcio).

No primeiro destes estudos foi avaliada a eficácia e segurança do carbonato de lantânio (no que respeita aos efeitos sobre o osso e o metabolismo mineral), como agente captador de fósforo. Este foi um estudo internacional, que envolveu 12 países de 4 continentes (135).

Na segunda investigação, avaliámos a eficácia e segurança (também a nível ósseo e do metabolismo mineral) do cloridrato de sevelamer, outro captador de fósforo sem base cálcica (33).

Este segundo projeto assumiu particular relevância para nós, tendo em conta o nosso envolvimento nesta investigação e o facto de ser um estudo inteiramente realizado em Portugal, que veio a merecer a classificação máxima (“Grade A”) no que respeita à qualidade metodológica, pelos peritos do KDIGO (Kidney International 2009;76,Suppl 113, Table 23, páginas S64 e S112).

4.2.1 Carbonato de lantânio versus carbonato de cálcio (manuscrito 12)

Esta investigação constituiu o primeiro estudo multicêntrico, prospetivo, aleatorizado, com dupla biopsia óssea, para avaliar a eficácia e segurança de um captador de fósforo, publicado na literatura médica (135).

Neste estudo, de fase 3, pretendemos monitorizar o controlo da hiperfosfatemia, comparando, a utilização do carbonato de cálcio (terapêutica convencional) com o carbonato de lantânio.

Realizámos biopsias ósseas basais e após 12 meses de terapêutica, com cada um dos captadores de fósforo. Mensalmente foram efetuadas determinações séricas de diversos marcadores bioquímicos da remodelação óssea.

Tendo em conta que o lantânio é um metal, e face aos efeitos acessórios associados à terapêutica com hidróxido de alumínio, interessava-nos excluir a presença de depósitos de lantânio na superfície de mineralização óssea, bem como avaliar a eventual associação desta terapêutica com osteomalácia ou com doença adinâmica.

Realizou-se uma biopsia óssea basal em 98 doentes, que foram aleatorizados, em igual número (49 doentes) pelos 2 braços do protocolo (carbonato de lantânio versus carbonato de cálcio).

Após 12 meses, foi possível realizar a segunda biopsia óssea em 33 doentes tratados com carbonato de lantânio e em 30 doentes tratados com carbonato de cálcio. Foram estes 63 pares de biopsias ósseas que foram alvo da nossa análise final.

Os resultados histomorfométricos eram semelhantes, nos 2 grupos, na biopsia basal. O diagnóstico histológico mais frequente nesta fase inicial, foi a osteodistrofia renal de tipo misto.

No grupo de doentes tratados com carbonato de lantânio, observou-se uma evolução favorável, no sentido da normalidade da remodelação óssea, na segunda biopsia óssea (realizada após 1 ano de terapêutica), em 5 dos 7 doentes

que apresentavam doença de baixa remodelação e em 4 dos 5 doentes que apresentavam doença de elevada remodelação, na biopsia óssea basal.

Estes resultados significam que, dos 12 doentes com remodelação óssea anormal na biopsia basal (no grupo tratado com carbonato de lantânio), 9 normalizaram a remodelação óssea após 1 ano de terapêutica.

Após um ano de terapêutica, apenas 1 doente evoluiu para doença adinâmica no grupo tratado com carbonato de lantânio, sendo a mesma evolução observada em 6 doentes do grupo tratado com carbonato de cálcio.

Se considerarmos os resultados globais anormais da histomorfometria nas biopsias basais de cada um dos dois grupos, as diferenças são ainda mais evidentes: no grupo do carbonato de lantânio a histologia óssea anormal evoluiu de 12 doentes (36%) para 6 doentes (18%), comparando as biopsias pré terapêutica e após 1 ano de medicação.

Nas mesmas condições, observou-se uma evolução, em sentido contrário, nos doentes tratados com carbonato de cálcio: enquanto na biopsia basal 13 doentes (43%) apresentavam histologia óssea anormal, este número aumentou para 16 doentes (53%) ao fim de 1 ano de terapêutica, com este captador de fósforo.

Desta investigação, podemos concluir que a terapêutica com carbonato de lantânio foi bem tolerada, permitiu um bom controlo da hiperfosfatemia (semelhante à obtida com o carbonato de cálcio) e que, nas doses por nós utilizadas (dose média de 1250 mg/dia), ao fim de 1 ano, não se acompanhou de aumento dos quadros de doença adinâmica nem de compromisso da mineralização óssea.

A multicenter study on the effects of lanthanum carbonate (Fosrenol™) and calcium carbonate on renal bone disease in dialysis patients

PATRICK C. D'HAESE, GOCE B. SPASOVSKI, ALEKSANDER SIKOLE, ALASTAIR HUTCHISON, TONY J. FREEMONT, SYLVIE SULKOVA, CHARLES SWANEPOEL, SVETLANA PEJANOVIC, LLUBICA DJUKANOVIC, ALESSANDRO BALDUCCI, GIORGIO COEN, WALDYSAW SULOWICZ, ANIBAL FERREIRA, ARMANDO TORRES, SLOBODAN CURIC, MILAN POPOVIC, NADA DIMKOVIC, and MARC E. DE BROE

Department of Nephrology-Hypertension, University of Antwerp, Belgium; Department of Nephrology, Clinical Centre Skopje, Macedonia; Manchester Royal Infirmary, Manchester, United Kingdom; Musculo-skeletal Research Group, Manchester, United Kingdom; Department of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic; Groote Schuur Hospital, Cape Town, South Africa; Clinical Centre of Serbia, Institute of Urology of Nephrology, Belgrade, Yugoslavia; Centro di Nefrologia e Dialisi, Ospedale San Giovanni, Roma, Italy; Servizio di Nefrologia Renale Ipertensione Arteriosa, Università La Sapienza, Roma, Italy; Department of Nephrology, Cracow, Poland; Fresenius Medical Care, Vila Franca de Xira, Portugal; Servicio de Nefrologia Hospital, Universitario de Canarias, La Laguna, Tenerife; Institute for Internal Diseases, Novi Sad, Yugoslavia; Clinic of Rheumatology and Clinical Immunology, Belgrade, Yugoslavia; and Centre for Renal Diseases, Zvezdara University Hospital, Belgrade, Yugoslavia

A multicenter study on the effects of lanthanum carbonate (Fosrenol™) and calcium carbonate on renal bone disease in dialysis patients.

Background. Lanthanum carbonate (LC) (Fosrenol™) is a novel new treatment for hyperphosphatemia. In this phase III, open-label study, we compared the effects of LC and calcium carbonate (CC) on the evolution of renal osteodystrophy (ROD) in dialysis patients.

Methods. Ninety-eight patients were randomized to LC ($N = 49$) or CC ($N = 49$). Bone biopsies were taken at baseline and after one year of treatment. Acceptable paired biopsies were available for static and dynamic histomorphometry studies in 33 LC and 30 CC patients. Blood samples were taken at regular intervals for biochemical analysis and adverse events were monitored.

Results. LC was well tolerated and serum phosphate levels were well controlled in both treatment groups. The incidence of hypercalcemia was lower in the LC group (6% vs. 49% for CC). At baseline, subtypes of ROD were similarly distributed in both groups, with mixed ROD being most common. At one-year follow-up in the LC group, 5 of 7 patients with baseline low bone turnover (either adynamic bone or osteomalacia), and 4 of 5 patients with baseline hyperparathyroidism, had evolved toward a normalization of their bone turnover. Only one lanthanum-treated patient evolved toward adynamic bone compared with 6 patients in the CC group. In the LC group, the number of patients having either adynamic bone, osteomalacia, or hyperpara decreased overall from 12 (36%) at baseline

to 6 (18%), while in the calcium group, the number of patients with these types of ROD increased from 13 (43%) to 16 (53%).

Conclusion. LC is a poorly absorbed, well-tolerated, and efficient phosphate binder. LC-treated dialysis patients show almost no evolution toward low bone turnover over one year (unlike CC-treated patients), nor do they experience any aluminum-like effects on bone.

Hyperphosphatemia continues to be a challenge for the clinical nephrologist, as it may lead to extraosseous calcification of both vascular and nonvascular tissues, secondary hyperparathyroidism, and osteitis fibrosa, particular types of renal osteodystrophy (ROD) responsible for significant morbidity [1, 2]. To prevent hyperphosphatemia, most patients with end-stage renal failure require an exogenous phosphate binder.

Aluminium-containing phosphate binders have been widely used in the past. The systemic absorption of aluminium hydroxide over time, however, can lead to the development of the so-called aluminium-related bone diseases (either osteomalacia or adynamic bone), dementia, and more subtle disorders at the level of the parathyroid gland, hematopoiesis, and myopathy [3, 4].

The use of calcium salts for phosphate binding is complicated by the development of hypercalcemia and an increased risk of metastatic calcifications in a substantial fraction of patients, particularly those taking vitamin D analogs and those with adynamic bone disease [5-7].

Key words: phosphate binder, osteodystrophy, bone histomorphometry, chronic renal failure, open-label study.

© 2003 by the International Society of Nephrology

Alternative phosphate binders have been developed in recent years with the aim of avoiding side effects during phosphate control. Polyallylamine-hydrochloride (sevelamer, RenaGel®) is a nonabsorbed cationic polymer that binds phosphate anions through ion exchange and hydrogen binding. This class of compounds was originally developed to lower plasma lipids; this effect is still seen with sevelamer [8]. Compared to calcium-based phosphate binders, evidence has shown that with sevelamer, fewer coronary and aortic calcifications are seen [9]. However, the efficacy of this polymer in lowering phosphate levels is still a matter of debate, as the target serum phosphate level of 5.5 mg/dL cannot be reached in the majority of patients, especially when the compound is used as monotherapy [10]. Moreover, as a lipid-binding compound, sevelamer has the ability to sequester fat-soluble vitamins and nutrient compounds [11]. Although no problems in this respect have emerged so far, more information on long-term safety is required.

Because the solubility product of trivalent iron and phosphate is extremely low, polynuclear iron preparations constitute another group of alternative phosphate binders. The use of trivalent iron has recently generated substantial interest; it is effective and well tolerated, but is still in the early stages of clinical development [12].

A third alternative is lanthanum carbonate. Lanthanum, discovered in 1839 by Mosander, is a rare earth element (molecular weight: 139 kD). As this trivalent hard acid cation has a high affinity for phosphate (phosphate binding capacity *in vitro* >97%), is minimally absorbed gastrointestinally, is not excreted by the kidneys, and is well tolerated, the investigation of lanthanum as a phosphate binder is warranted [13]. The excretion of absorbed lanthanum by the biliary system contrasts with aluminium, which is excreted almost entirely (>95%) in the urine and, consequently, is associated with an increased risk of toxicity in patients with renal disease [14]. Plasma lanthanum concentrations have rarely exceeded one part per billion. There has been no evidence of lanthanum toxicity in any of the clinical studies hitherto performed.

In light of the past tragic experience with aluminium in dialysis patients, information on the effects of lanthanum carbonate on bone is necessary. The present bone biopsy-based study aimed to: investigate the effect of phosphate management by the administration of lanthanum carbonate compared with calcium carbonate on renal bone disease; check the lanthanum accumulation in bone; and evaluate long-term safety and tolerability of lanthanum in dialysis patients after one year of treatment.

METHODS

Patients

Key inclusion criteria were male or female patients aged >18 years who had started dialysis treatment (he-

modialysis or CAPD) within the 12 weeks prior to study entry, or had been diagnosed with chronic renal failure and were scheduled to begin dialysis prior to randomization. No preset limit was applied to serum PTH on entry to the study and there was no restriction of concomitant vitamin D therapy. Patients with significant hypocalcemia or concurrent illness were excluded.

A total of 98 patients ('intent to treat' patients) were randomized to the study medication and received at least one dose of lanthanum carbonate ($N = 49$) or calcium carbonate ($N = 49$). In this group all aspects of efficacy, safety, and tolerability were monitored. Safety was assessed at each study visit by recording adverse events and vital signs. Full blood biochemical and hematologic parameters were monitored and the plasma levels of lanthanum were measured at visits throughout the study.

Patients were recruited from 18 centers in 12 countries. The mean \pm SD age was 55 ± 14.3 years; 59 (60%) patients were males. There was no relevant difference between treatment groups with respect to underlying nephrologic diagnosis: diabetes (26%); glomerulonephritis (9%); other known disease (12%); unknown cause (14%); cystic kidney disease (14%); hypertension (14%); and urologic disease (10%).

A total of 68 patients ($N = 34$ in each group) completed the study (i.e., underwent a bone biopsy at baseline and follow-up). Patients discontinued the study because of the investigator's decision ($N = 1$); protocol violation ($N = 1$); kidney transplantation ($N = 10$); death ($N = 11$); serious adverse events ($N = 2$); and others ($N = 5$). Of the patients randomized, 63 pairs of bone biopsies were suitable for histomorphometric measurements, 33 of which belonged to the lanthanum group and 30 to the calcium group.

Written informed consent was obtained from all patients and the study was conducted in compliance with the declaration of Helsinki and approved by Local Ethical Committees at each of the participating centers.

Study set up

The study was conducted over a one-year period. Following screening, all phosphate binders were stopped and double tetracycline labeling administered, with an interval of 8 to 12 days. A baseline bone biopsy was taken 2 to 6 days following the second label. Patients were then randomized in a 1:1 ratio to receive lanthanum or calcium carbonate. All patients were titrated to a lanthanum dose (up to 3750 mg/day) or calcium (up to 9000 mg/day) that achieved optimal reduction of serum phosphate levels, and were maintained at this dose, or titrated further when necessary. The second biopsy was obtained following double tetracycline labeling and one year of treatment, or at time of discontinuation if >6 months treatment received. A follow-up period was included, during which patients were examined and all

adverse events reviewed 28 days after discontinuation of the study medication (or early withdrawal from the study).

Laboratory methods

Blood and bone biochemistry. Blood samples were taken at study visits throughout the study period for the determination of a series of routine biochemistry and hematology screening tests. In addition, a panel of serum parameters relevant to bone [i.e., phosphorus, calcium, bone specific and total alkaline phosphatase, iPTH, 25-(OH)-, vitamin D, and 1,25-(OH)₂ vitamin D] were measured using the appropriate kits and methodologies.

Lanthanum was measured in plasma and bone by means of inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) using methodologies developed and optimized at the Centre for Analytical Sciences (CAS) at the University of Sheffield, United Kingdom.

Bone histomorphometry. In each patient, a single transiliac bone biopsy (± 1 cm length; 5 or 7 mm diameter) was taken after double tetracycline labeling. The biopsy was divided into two parts. One part (mainly cortical bone) was used to measure the bulk lanthanum content. The remaining part was fixed in absolute ethanol and then embedded in a methylmethacrylate-based resin for histology and histomorphometric analysis. Undecalcified 7- μ m thick sections were stained with Toluidine blue [15]. Seven- μ m sections were mounted unstained in immersion oil for visualization of tetracycline labels.

Criteria for classification of the various types of ROD were:

- Adynamic bone disease:** Bone formation rate (BFR) <5% of age- and sex-corrected mean and osteoclast surface (OcS) <20% of age- and sex-corrected mean.
- Hyperparathyroidism:** BFR >2x age- and sex-corrected mean and OcS >100x age- and sex-corrected mean.
- Normal:** BFR and OcS within 2SD of the age- and sex-corrected mean.
- Osteomalacia:** Mineralization lag time (MLT) >100 days and osteoid volume >5x age- and sex-corrected mean.
- Mixed ROD:** All bone biopsies that do not fulfill the criteria listed above.

RESULTS

Lanthanum carbonate taken with meals was well tolerated throughout the study period. The type and incidence of adverse events were well balanced between the two treatment groups, with 96% of patients in both groups reporting at least one treatment-emergent adverse effect. Gastrointestinal effects were the most common events and were typically mild (lanthanum: 53% vs. calcium: 49%). Withdrawal rates due to adverse events were comparable between lanthanum (24%) and calcium (22%).

There was, however, a higher incidence of hypercalcemia (serum calcium above upper limit of normal) (i.e., >2.65 mmol/L or >10.6 mg/dL) in the patients treated with calcium carbonate (49%) compared to those receiving lanthanum carbonate during the study period (6%).

There were no significant differences in hematologic or biochemical safety parameters over time. A more detailed description of clinical safety results will be presented elsewhere.

There were no significant differences in the concentration of the various biochemical bone-related parameters between the two groups; these parameters also did not significantly change during the study period (Fig. 1). Both treatment groups showed well controlled phosphorus levels throughout the trial, using doses up to 3750 mg/day for lanthanum (median dose 1250 mg/day), and 9000 mg/day (median dose 2000 mg/day) for calcium carbonate. With respect to vitamin D usage, no differences were noticed between treatment groups (lanthanum: 63% vs. calcium: 53%).

Patients of the lanthanum group had plasma lanthanum levels that were slightly increased for all doses administered, compared with baseline levels of patients receiving 1500 to 2250 mg lanthanum per day, with mean plasma lanthanum levels ranging from 0.51 to 1.08 μ g/L. Lanthanum levels did not depend on the dose administered and reached a plateau after 12 weeks of treatment. The patients treated with lanthanum carbonate for up to one year had a median bone concentration of 1.8 μ g/g, the highest value in any patient being 5.5 μ g/g. In the calcium carbonate group, bone lanthanum levels at the end of the study also showed a slight increase, with the highest value in any patient being 1.0 μ g/g.

The histomorphometric data are shown in Figure 2. Five out of 7 patients (71%) of the lanthanum group with either adynamic bone or osteomalacia at baseline (Fig. 2, upper panels), and 4 out of 5 patients (80%) with baseline hyperparathyroidism (Fig. 2, lower panels) evolved toward a normalization of their bone turnover as compared to only 3 out of 7 (42%) and 3 out of 6 (50%) of the calcium group.

Twenty-six (26) patients (79%) of the lanthanum group and 23 (77%) of the calcium group had a normal or increased bone turnover (hyperpara, mixed, normal) at baseline. Both groups showed markedly different responses. While 6 out of 23 patients (26%) of the calcium group developed adynamic bone disease, this was seen in only 1 out of 26 patients (4%) of the lanthanum group (Fig. 2, upper panels). This particular lanthanum-treated patient had been taking oral calcitriol throughout the study at varying doses (0.5 to 1.5 μ g TDS), despite having a PTH (baseline, 4.56 pmol/L to follow-up, 5.53 pmol/L) below the optimum level for an end-stage renal failure patient, and having a good control of serum phosphate

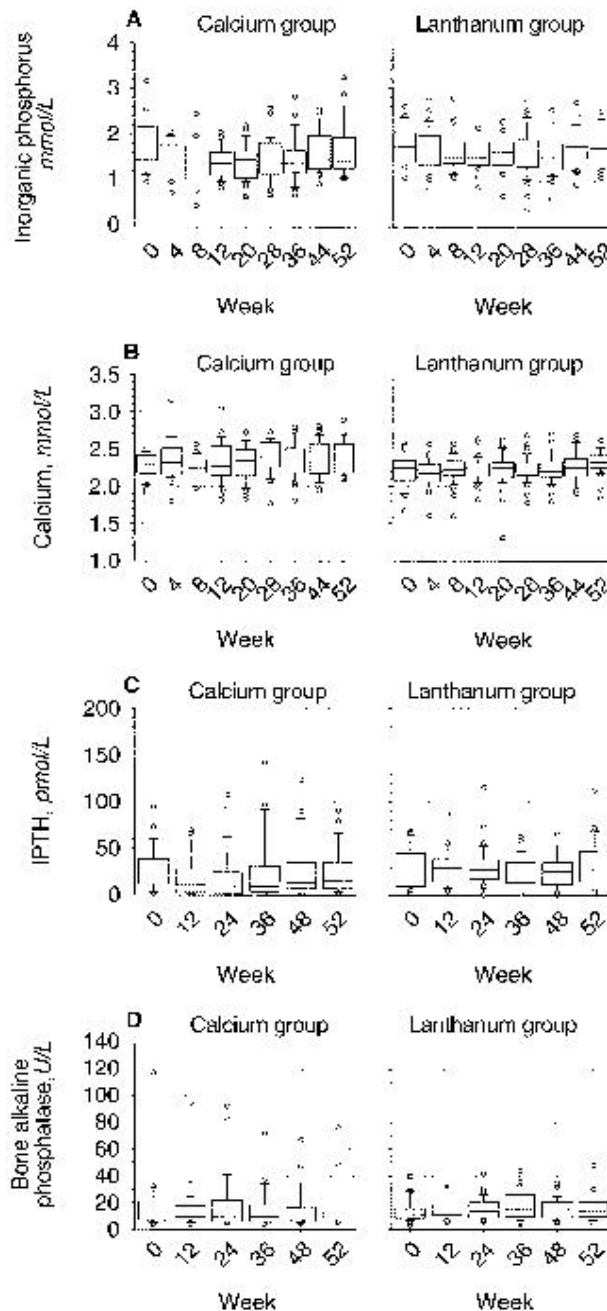


Fig. 1. Comparison and temporal evolution of some relevant bone-related parameters in both study groups.

(mean, 1.53 mmol/L) and serum calcium (mean, 2.38 mmol/L) throughout the study period.

Five patients (1 with osteomalacia and 4 with mixed bone disease at baseline) of the calcium group (17%) developed hyperpara compared to only 2 patients (mixed bone disease at baseline) of the lanthanum group (7.5%) (Fig. 2, lower panels).

The distribution of the various types of ROD assessed at baseline using the proposed criteria for classification was similar in both treatment groups (Fig. 2, lower panels).

Overall, in the lanthanum group the total number of patients having either adynamic bone, osteomalacia, or hyperpara decreased from 12 (36%) at baseline, to 6 (18%) at one-year follow-up, while in the calcium group, the number of patients with these types of ROD increased from 13 (43%) to 16 (53%) (Fig. 2, lower panels).

DISCUSSION

Treatment of uremic hyperphosphatemia remains a major challenge to the nephrologist because phosphate retention is associated with a variety of clinical problems, including secondary hyperparathyroidism and soft tissue mineralization.

Until now, aluminium-containing and calcium-based phosphate binders have been most frequently used in the treatment of hyperphosphatemia. Although highly efficacious, the chronic therapeutic use of these compounds goes along with serious side effects [3–5, 16]. Lanthanum carbonate has recently been proposed as a nontoxic and efficacious alternative.

In this phase III, open-label study, we compared the effects of a one-year treatment with either lanthanum carbonate or calcium carbonate on the evolution of renal bone disease in dialysis patients.

The serious adverse events for both treatment groups observed during the study period were balanced and were typical for a population with chronic renal failure receiving hemodialysis or peritoneal dialysis. Thus, data of the present study confirms the safe profile of lanthanum previously observed in phase II studies [17]. The incidence and types of adverse effects were similar in the two treatment groups. An exception to this was hypercalcemia, which was appreciably lower in the lanthanum-treated group compared to the calcium carbonate group (6% and 49%, respectively).

Despite the additional calcium intake in the calcium carbonate group, mean serum calcium levels did not differ significantly between the groups, which must be ascribed to careful monitoring of calcemia throughout the study and immediate adjustment of the dialysate calcium concentration or vitamin D intake. Nevertheless, the number of hypercalcemic episodes was substantially greater in the calcium carbonate group. This reduced propensity for hypercalcemic episodes on lanthanum carbonate must be considered a major benefit.

The serum phosphate levels were well controlled in both treatment groups throughout the study. There was little change in iPTH or bone alkaline phosphatase concentration in either treatment group during the study period.

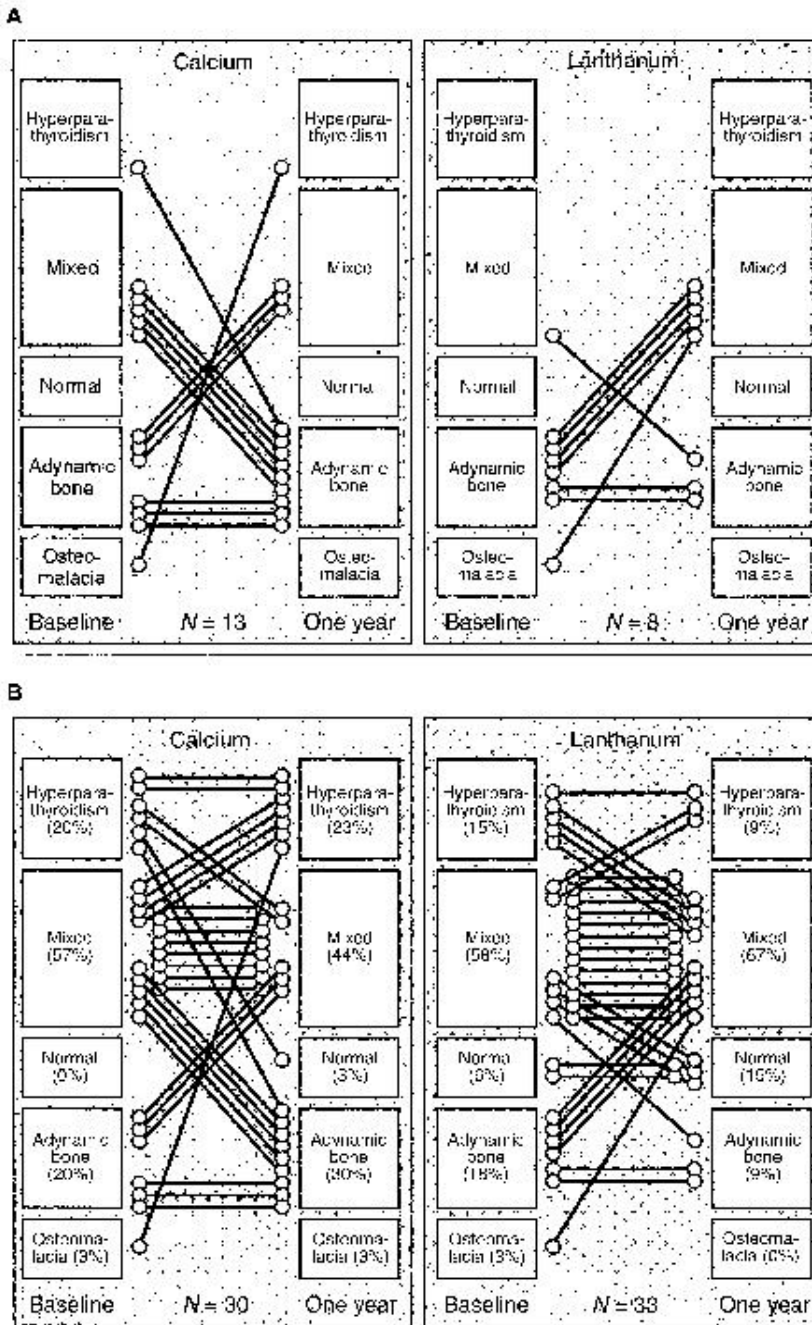


Fig. 2. Patients with either low bone turnover at baseline and those evolving toward low bone turnover at follow-up in both study groups are shown in the upper panels. Lower panels show temporal evolution of renal bone disease of all patients after one year of treatment with either lanthanum or calcium carbonate. Values between brackets indicate the prevalence of the various types of ROD.

Weighing any toxic effects of lanthanum against those experienced in the past with aluminium, the highly limited gastrointestinal absorption of lanthanum (0.00003% for lanthanum vs. 0.02% for aluminium), and the non-renal routes of excretion for the absorbed fraction of the dose of lanthanum should be considered [18]. This is reflected by the very low concentrations of lanthanum found

in bone and plasma after a one-year treatment, being 10- to 50-fold lower than those expected for aluminium [4]. Data furthermore has indicated that plasma lanthanum reached steady state early (i.e., after 12 weeks) in the study.

To the best of our knowledge, this is the first bone biopsy-based multicenter study to investigate and com-

pare the temporal effect of a phosphate binder on bone in dialysis patients. The extended group of study patients recruited from various centers in several countries can be considered a reliable reproduction of the current dialysis population.

Establishing that lanthanum did not induce aluminium-like toxic effects on bone was an important consideration when setting up the present study [4, 19, 20]. Bone histomorphometry clearly indicated that, in contrast to what has been reported for aluminium, lanthanum treatment for one year does not lead to the development of osteomalacia or adynamic bone. Patients in the calcium carbonate group were at a higher risk for the development of low bone turnover, as six patients of this group evolved toward adynamic bone disease, compared to only one subject from the lanthanum group. The majority of the patients (5 out of 7) of the lanthanum group having either osteomalacia or adynamic bone disease at baseline evolved toward a normalization of their bone turnover at follow-up.

At the group level, 12 patients of the lanthanum carbonate group (36%) had adynamic bone, osteomalacia, or hyperparathyroidism at baseline; this number fell to 6 (18%) at completion of the study. This was compared with 13 patients at baseline in the calcium carbonate group (43%), which increased to 16 (53%) at completion. Overall, lanthanum treatment led to a considerably better outcome than treatment with calcium.

CONCLUSION

Lanthanum carbonate was shown to be a safe, well-tolerated, and efficient phosphate binder. By comparison with calcium carbonate, treatment with lanthanum resulted in a normalization of the bone histomorphometric parameters during the study and there was almost no evolution toward low bone turnover at one-year follow-up. In addition, there was no suggestion of the adverse bone effects previously reported for aluminium hydroxide.

Reprint requests to: Prof. Dr. Marc E. De Broe, University Hospital Antwerp, Wilrijkstraat 10, B-2650 Edegem/Antwerp, Belgium.
E-mail: debroe@uia.ua.ac.be

REFERENCES

1. DELMEZ JA, SLATOPOLSKY E: Hyperphosphatemia: Its consequences and treatment in patients with chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 19:303-317, 1999
2. BLOCK GA, PORT FK: Re-evaluation of risks associated with hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in dialysis patients: recommendations for a change in management. *Am J Kidney Dis* 35(6): 1226-1237.
3. GOODMAN WG: Bone disease and aluminium: Pathogenic considerations. *Am J Kidney Dis* 6:330-335, 1985
4. DE BROE ME, COBURN JW, editors: *Aluminium and Renal Failure*. Dordrecht, Kluwer Acad Publ, 1990, pp 99-375
5. GOODMAN WG, GOLDIN J, KUIZON BD: Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis. *N Engl J Med* 342:1478-1483, 2000
6. LEVIN NW, HOENICH NA: Consequences of hyperphosphatemia and elevated levels of the calcium-phosphorus product in dialysis patients. *Curr Nephrol Hypert* 10:563-568, 2001
7. KURZ P, MONIER-FAUGERE MC, BOGNAR B, et al: Evidence for abnormal calcium homeostasis in patients with adynamic bone disease. *Kidney Int* 46:855-861, 1994
8. WILKES BM, REINER D, KERN M, et al: Simultaneous lowering of serum phosphate and LDL-cholesterol by sevelamer hydrochloride (RenGel) in dialysis patients. *Clin Nephrol* 50(6):381-386, 1998
9. CHERTOW GM, BURKE SK, RAGGI P, et al: Sevelamer attenuates the progression of coronary and aortic calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int* 62:245-252, 2002
10. HERGESELL O, RITZ E: Phosphate binders in uremia: pharmacodynamics, pharmacoeconomics, pharmacoethics. *Nephrol Dial Transplant* 17:14-17, 2002
11. FOURNIER A, BARSOUM J, FICKL R, et al: Sevelamer, Ca X P product and vitamin D. *Nephrol Dial Transplant* 16:429-436, 2001
12. HERGESELL O, RITZ E: Phosphate binders on iron basis: A new perspective. *Kidney Int* 56(Suppl 73):42-45, 1999
13. BULMAN RA: Europium and other lanthanides, in *Handbook on metals in clinical and analytical chemistry*, edited by Seiler HG, Sigel A, Sigel H, New York, Marcel Dekker, Inc., 1994, pp 351-363
14. YOKEL RA, McNAMARA PJ: Aluminium toxicokinetics: An updated MiniReview. *Pharmacol Toxicol* 88(4):159-167, 2001
15. CUETO-MANZO AM, KONEL S, HUTCHINSON AJ, et al: Bone loss in long term renal transplantation: Histopathology and densitometry analysis. *Kidney Int* 55:2021-2029, 1999
16. MALLUCHE HH, MAWAD H: Management of hyperphosphataemia of chronic kidney disease: Lessons from the past and future directions. *Nephrol Dial Transplant* 17:1170-1175, 2002
17. HUTCHISON AJ: Calcitriol, lanthanum carbonate and other phosphate binders in the management of renal osteodystrophy. *Perit Dial Int* 19(Suppl 2):408-412, 1999
18. JOUHANNEAU P, LACOUR B, RABBECK G, et al: Gastrointestinal absorption of aluminium in rats using ²⁶Al and accelerator mass spectrometry. *Clin Nephrol* 40(4):244-248, 1993
19. D'HAESE PC, COUTTENYE M-M, GOODMAN WG, et al: Use of the low-dose desferrioxamine test to diagnose and differentiate between patients with aluminium-related bone disease, increased risk for aluminium toxicity, or aluminium overload. *Nephrol Dial Transplant* 10:1874-1884, 1995
20. COBURN JW, NORRIS KC, NEBEKER HG: Osteomalacia and bone disease arising from aluminium. *Sem Nephrol* 6(1):68-89, 1986

4.1.1 Cloridrato de sevelamer versus carbonato de cálcio (manuscrito 13)

O cloridrato de sevelamer é um polímero não absorvível, que promove a eliminação intestinal de fósforo, funcionando como captador do fósforo ingerido (136).

Para além dos efeitos no metabolismo mineral, permitindo o controlo da hiperfosfatemia, o sevelamer, administrado por via oral, apresenta um perfil favorável no controlo da dislipidemia, ao reduzir os níveis séricos de colesterol total e de LDL-colesterol (137).

Nesta investigação, avaliámos os efeitos, no metabolismo ósseo, da terapêutica da hiperfosfatemia com um novo captador de fósforo (cloridrato de sevelamer) em comparação com a terapêutica convencional (carbonato de cálcio) (33).

Face à interferência do sevelamer na absorção de lípidos (e eventualmente de vitaminas lipossolúveis, como é o caso da vitamina D), bem como à ausência de aporte de cálcio através deste captador de fósforo, interessava-nos excluir que esta terapêutica se pudesse associar a compromisso da mineralização ou à diminuição do volume ósseo (33).

Realizámos um ensaio aberto, aleatorizado, prospetivo, com um ano de duração e dupla biopsia óssea (no início e no final do estudo), comparando a terapêutica com carbonato de cálcio versus o cloridrato de sevelamer.

Esta investigação foi feita em 119 doentes hemodialisados, o que corresponde à população mais vasta (até agora publicada) em doentes tratados de acordo com as propostas dos K-DOQI, sujeitos a dupla biopsia óssea, para avaliação dos efeitos ósseos de diferentes captadores de fósforo (33).

Os objetivos primários desta investigação, corresponderam à avaliação dos hipotéticos efeitos dos dois captadores de fósforo na remodelação e na mineralização óssea.

Os valores alvo definidos para a calcemia ($< 10,4$ mg/dl), para a fosfatemia (entre 3,1 e 5,0 mg/dl) e para a paratohormona intacta (entre 150 e 300 pg/ml) apresentavam limites sobreponíveis aos propostos nas orientações K-DOQI (em vigor aquando do desenho deste estudo).

Dos 119 doentes avaliados, 100 foram sujeitos à primeira biopsia óssea (basal), dos quais 91 foram aleatorizados 1:1 (após estratificação em função do grau de remodelação óssea) entre os 2 braços terapêuticos.

Dos 100 doentes biopsados no início do estudo, foram excluídos 9 doentes: em 3 casos por depósitos significativos de alumínio, e em 6 doentes por ausência de tecido ósseo suficiente para proceder à histomorfometria.

Realizou-se a segunda biopsia óssea, após 54 semanas de aleatorização, em 33 doentes tratados com sevelamer e 35 doentes tratados com carbonato de cálcio.

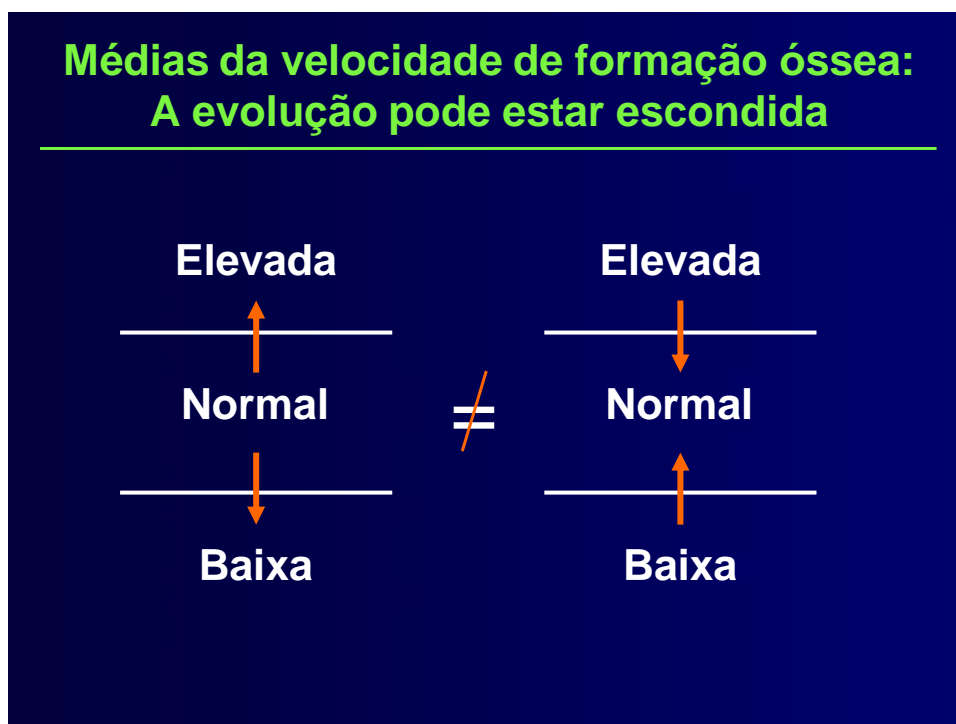
Importa sublinhar que, ao longo de todo o ano da investigação, foi possível manter estáveis os níveis séricos de cálcio, de fósforo e de iPTH, nos intervalos protocolados desde o início, e que não se observaram quaisquer diferenças significativas, em relação a estes parâmetros, entre os 2 braços terapêuticos do protocolo (33).

Na avaliação dos resultados deste estudo, optámos por apresentar os resultados histomorfométricos de forma inovadora, a qual veio, posteriormente, a ser igualmente adotada pelas orientações da KDIGO (Kidney International 2009;76,Suppl 113, Fig.3, página S17).

Esta nova abordagem começou por ser desenvolvida no nosso estudo sobre o carbonato de lantânio, apresentado no capítulo anterior (135) (138). Tendo em conta que nos parecia ser a forma mais correta de apresentar resultados histomorfométricos, com utilidade clínica imediata e facilmente perceptíveis pela comunidade científica, optámos por otimizar esta abordagem no desenho do protocolo do carbonato de sevelamer (33).

Quando comparamos médias e/ou medianas de quaisquer dados histomorfométricos, referentes à evolução no tempo de determinada população, a informação mais significativa pode não ser revelada.

Na figura seguinte, está esquematizado este conceito:

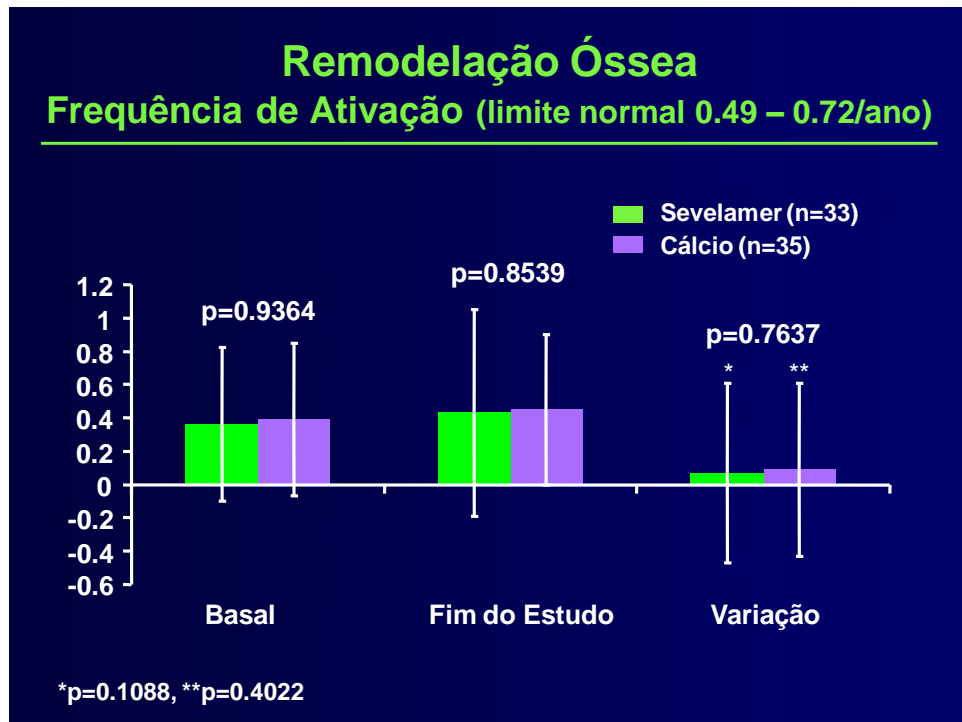


Por exemplo, se considerarmos 4 doentes no gráfico acima (cada um deles representado por uma seta, como grandeza vetorial, cuja origem corresponde à primeira biopsia, a extremidade à segunda biopsia e o comprimento da seta à intensidade da variação), a média da velocidade de formação óssea (BFR) é igual para ambos os pares de doentes (da direita e da esquerda).

No entanto, a evolução é oposta, pois enquanto no painel da esquerda ambos os doentes se afastam do normal, no painel da direita ambos os doentes normalizam o seu valor de BFR.

Esta nova forma de apresentar os resultados da histomorfometria, sempre que são realizados estudos prospetivos com mais de uma biopsia óssea, aplica-se, obviamente, a qualquer parâmetro histomorfométrico.

Parece-nos que, mais relevante do que a obtenção de múltiplos parâmetros histomorfométricos, frequentemente difíceis de interpretar, quanto às consequências clínicas e à eventual eficácia de diferentes terapêuticas, importa descrever tendências de evolução dos diversos parâmetros e ainda avaliar se essa tendência se aproxima ou afasta dos intervalos da normalidade.



Por exemplo, quando consideramos a frequência de ativação (como parâmetro de remodelação óssea) neste estudo prospectivo, verificamos (figura acima) que não houve diferença significativa entre os dois braços da terapêutica (sevelamer versus carbonato de cálcio).

No entanto, quando consideramos a evolução deste parâmetro, sob o ponto de vista clínico, não podemos deixar de considerar relevante que 14% dos doentes tratados com carbonato de cálcio se afastem da normalidade e agravem a adinamia óssea, enquanto o mesmo resultado apenas se observou em 3% dos doentes tratados com cloridrato de sevelamer.

Tendências na Frequência de Ativação (AF)

	Sevelamer n=33	Cálcio n=35
Afasta do normal ↑	0 %	3 %
Aproxima do normal ↓	9 %	12 %
Sem alteração	67 %	54 %
Aproxima do normal ↑	21 %	17 %
Afasta do normal ↓	3 %	14 %

Se excluirmos desta análise de tendência os doentes que já têm um diagnóstico de doença adinâmica na biópsia basal, estes resultados ainda são mais relevantes (ver quadro abaixo).

Tendências na Frequência de Ativação (AF) Só doentes com AF ≥ 0.49 na biópsia basal

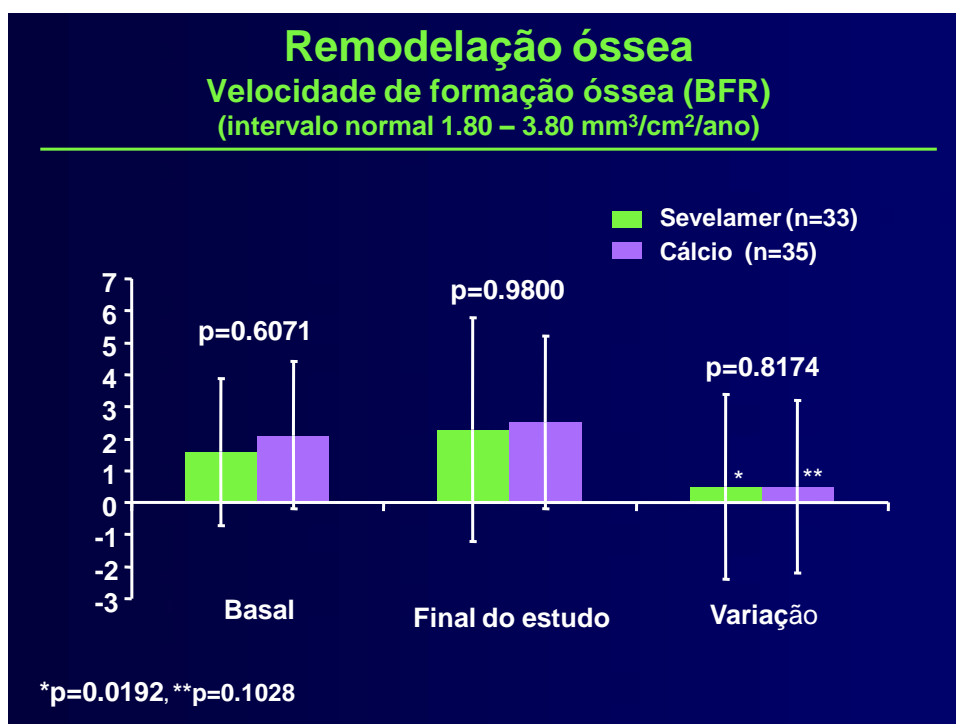
	Total n=27	Sevelamer n=11	Cálcio n=16
Afasta do normal ↑	3.7%	0	6.3%
Aproxima do normal ↓	25.9%	27.3%	25.0%
Normal (0.49 – 0.72)	11.1%	9.1%	12.5%
Afasta do normal ↓	33.3%	9.1%	31.3%

Os doentes com doença óssea adinâmica dificilmente modificam o seu diagnóstico histológico ósseo, mesmo ao fim de 12 meses de terapêutica.

Por esse motivo, quando analisamos apenas os doentes com remodelação óssea normal ou elevada, (precisamente aqueles que mais facilmente podem modificar este parâmetro, em resposta à terapêutica), as diferenças entre os 2 grupos são ainda mais evidentes: 31,3% dos doentes tratados com carbonato de cálcio afastaram-se da normalidade, no sentido do osso adinâmico, enquanto a mesma evolução só se observou em 9,1% dos doentes medicados com cloridrato de sevelamer.

Na nossa investigação, encontrámos uma diferença significativa na evolução da velocidade de formação óssea (BFR) entre os doentes tratados com sevelamer versus os tratados com carbonato de cálcio (33).

Apenas os doentes no grupo do braço terapêutico do sevelamer apresentaram um aumento significativo da velocidade de formação óssea (BFR) entre a biopsia óssea basal e a final (ver figura abaixo).



Habitualmente, nas avaliações histomorfométricas era dada pouca relevância à avaliação do volume ósseo total e dos seus componentes cortical e trabecular.

Como já referimos, desde a primeira publicação da KDIGO sobre este tema e da introdução da nova classificação TMV, o parâmetro do volume ósseo tem ganho particular relevância, passando mesmo a ser quantificado sob múltiplas facetas: espaço intertrabecular, espessura trabecular, número de anastomoses entre as trabéculas, espessura da cortical óssea, etc. (86).

Na presente investigação, considerámos a evolução do volume ósseo total, cortical e trabecular, nos objetivos a analisar e a correlacionar com as diferentes opções de captadores de fósforo utilizadas. Sublinhamos que, como indicado na figura seguinte, os doentes tratados com cloridrato de sevelamer apresentaram um aumento do volume ósseo, no sentido da normalidade em 24% dos doentes (contra apenas 14% no grupo de doentes tratados com carbonato de cálcio).

Tendências no volume ósseo

	Sevelamer n=33	Cálcio n=35
Afasta do normal ↑	12 %	17 %
Aproxima do normal ↓	3 %	6 %
Sem alteração	55 %	51 %
Aproxima do normal ↑	24 %	14 %
Afasta do normal ↓	6 %	12 %

Esta evolução do volume ósseo está de acordo com os resultados da remodelação óssea acima discutidos, também eles mostrando um aumento da remodelação no sentido da normalidade, significativamente maior nos doentes tratados com sevelamer, em comparação com os tratados com carbonato de cálcio.

Effects of Sevelamer Hydrochloride and Calcium Carbonate on Renal Osteodystrophy in Hemodialysis Patients

Aníbal Ferreira,* João Miguel Frazão,[†] Marie-Claude Monier-Faugere,[‡] Célia Gil,[§] José Galvão,^{||} Carlos Oliveira,[¶] Jorge Baldaia,^{**} Ilidio Rodrigues,^{††} Carla Santos,^{‡‡} Sílvia Ribeiro,^{§§} Regula Mueller Hoenger,^{|||} Ajay Duggal,^{||||} and Hartmut H. Malluche,[‡] on behalf of the Sevelamer Study Group

*Nephrology Department, Hospital Curry Cabral, Lisboa, Portugal; [†]Nephrology Research and Development Unit and School of Medicine, Porto University, Porto, Portugal; [‡]Division of Nephrology, Bone and Mineral Metabolism, University of Kentucky, Lexington, Kentucky; [§]Hemodial-Vila Franca Xira, Lisboa, Portugal; [¶]FMC-Torres Vedras, Torres Vedras, Portugal; ^{**}FMC-Entrocamento, Entrocamento, Portugal; ^{**}Unidade de Hemodialise de Guimaraes, Guimaraes, Portugal; ^{††}Tagus Dial Barreiro (FMC), Barreiro, Portugal; ^{‡‡}Centro de Hemodialise da Sta. Casa da Misericórdia de Vila Verde, Vila Verde, Portugal; ^{§§}HPA-Hospital Particular de Almada, Almada, Portugal; and ^{|||}Genzyme Europe Research, Cambridge, United Kingdom

ABSTRACT

Disturbances in mineral metabolism play a central role in the development of renal bone disease. In a 54-wk, randomized, open-label study, 119 hemodialysis patients were enrolled to compare the effects of sevelamer hydrochloride and calcium carbonate on bone. Biopsy-proven adynamic bone disease was the most frequent bone abnormality at baseline (59%). Serum phosphorus, calcium, and intact parathyroid hormone were well controlled in both groups, although calcium was consistently lower and intact parathyroid hormone higher among patients who were randomly assigned to sevelamer. Compared with baseline values, there were no changes in mineralization lag time or measures of bone turnover (*e.g.*, activation frequency) after 1 yr in either group. Osteoid thickness significantly increased in both groups, but there was no significant difference between them. Bone formation rate per bone surface, however, significantly increased from baseline only in the sevelamer group ($P = 0.019$). In addition, of those with abnormal microarchitecture at baseline (*i.e.*, trabecular separation), seven of 10 in the sevelamer group normalized after 1 yr compared with zero of three in the calcium group. In summary, sevelamer resulted in no statistically significant changes in bone turnover or mineralization compared with calcium carbonate, but bone formation increased and trabecular architecture improved with sevelamer. Further studies are required to assess whether these changes affect clinical outcomes, such as rates of fracture.

J Am Soc Nephrol 19: 405–412, 2008. doi: 10.1681/ASN.2006101089

Patients with chronic kidney disease (CKD) typically have abnormal bone histology. Alterations in bone turnover, mineralization, and volume in renal patients depend on several factors. In particular, disturbances in calcium-phosphate, parathyroid hormone (PTH), and vitamin D metabolism are important in the development of renal osteodystrophy (ROD).

The pattern of ROD observed in patients with stage 5 CKD has changed in recent years. Previously, observed bone conditions in renal patients in order of prevalence were mixed uremic osteodys-

trophy (MUO), predominant hyperparathyroid bone disease (HPBD), and aluminum-related os-

Received October 5, 2006. Accepted November 18, 2007.

Published online ahead of print. Publication date available at www.jasn.org.

Correspondence: Prof. Hartmut H. Malluche, Division of Nephrology, Bone and Mineral Metabolism, Room MN 564, UK Medical Center, 800 Rose Street, Lexington, KY 40536-0084. Phone: 859-323-5048, ext. 221; Fax: 859-257-1052; E-mail: hhmall@uky.edu

Copyright © 2008 by the American Society of Nephrology

teomalacia and adynamic bone disease (ABD); however, reduced use of aluminum has resulted in a decline in the occurrence of osteomalacia. Concurrently, there has been an increase in ABD without aluminum toxicity and less MUO.^{1–3} This has been attributed to greater use of calcium-based phosphate binders, which may result in oversuppression of PTH, especially when used with calcitriol or calcitriol analogues.^{4–6}

Calcium-based binder use has also been linked with progression of vascular calcification.⁷ Evidence suggests that ABD may predispose patients to soft tissue and vascular calcification.⁸ The use of non-calcium-based phosphate binders, such as sevelamer hydrochloride, may reduce the oversuppression of PTH and so help prevent ABD and cardiovascular calcifications. Studies have shown that sevelamer attenuates progression of vascular calcification and prevents reduction in thoracic vertebral bone mineral density.^{7,9,10}

Bone biopsy is the recognized gold standard for the diagnosis and evaluation of renal bone disease.^{11–13} Previous reports assessing changes in vertebral bone with phosphate binders by electron-beam tomography (EBT) did not assess changes in bone histology.^{9,10} Thus, a study using bone biopsies was conducted to compare the effects of sevelamer hydrochloride and calcium carbonate on bone histology.

RESULTS

Disposition of patients is shown in Figure 1. A total of 119 patients were enrolled, 100 of whom had a baseline bone biopsy. Ninety-one of these were randomly assigned to receive sevelamer ($n = 44$) or calcium-based binders ($n = 47$), and 68 had a second bone biopsy after 1 yr (sevelamer $n = 33$; calcium $n = 35$).

Baseline demographics and clinical characteristics were comparable between groups (Table 1). Almost all patients

(98%) received calcium carbonate in the 30 d before screening, with 93% treated with calcium-based binders as monotherapy.

Dosages of study medication increased in both groups during the study. Mean daily sevelamer dosage increased from 3.3 ± 2.0 to 5.0 ± 2.7 g after 1 yr, and calcium increased from 3.8 ± 2.2 to 4.0 ± 2.5 g. Compliance assessed by pill count was comparable between the treatment groups (sevelamer 92%; calcium 95%). No patient received aluminum rescue therapy for treatment-resistant hyperphosphatemia during the study. None of the patients received parent vitamin D or ergo- or cholecalciferol. At baseline, 14 (42%) patients in the sevelamer group and 16 (46%) in the calcium group received active vitamin D metabolites or analogs. All of these patients, with the exception of one patient in the sevelamer group who received α -calcidiol for the duration of the study and one patient in the calcium group who received paricalcitol for a 2-wk period, were given calcitriol. The median weekly change in calcitriol or analogue dosage significantly increased from baseline to end of study in the sevelamer group compared with the calcium group (2.0 versus 0.0 μg intravenously, calcitriol or calcitriol equivalents; $P = 0.027$). An increase in vitamin dosage was possible in 19 (58%) patients who were treated with sevelamer compared with 11 (31%) patients who were treated with calcium. In general, both treatments were well tolerated with adverse event profiles consistent with patients' underlying renal disease.

Biochemical Parameters

Biochemical parameters are summarized in Table 2. Serum phosphorus levels were well controlled with both treatments with no significant changes within or between groups (Figure 2A). Serum calcium and intact PTH (iPTH) were also well controlled, and mean values remained within the recommended Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) ranges in both groups (Figure 2, B and C); however,

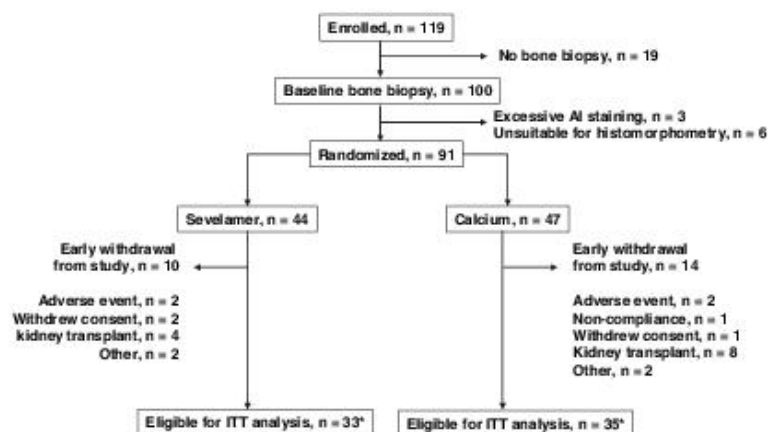


Figure 1. Disposition of patients. The intention-to-treat (ITT) population was defined as all patients who were randomly assigned, received one or more doses of study medication, and had a second bone biopsy. One patient in the sevelamer group completed treatment but did not have a second bone biopsy and so was excluded from the ITT analysis. Two patients in the calcium group withdrew from the study early but received one or more doses of study medication and had a second bone biopsy and so were included in the ITT analysis.

Table 1. Baseline characteristics^a

Characteristic	Sevelamer (n = 33)	Calcium (n = 35)	P
Gender (M/F; n [%])	22/11 (67/33)	18/17 (51/49)	0.23
Race			>0.99
white	32 (97)	34 (97)	
black	1 (3)	1 (3)	
Age (yr; mean ± SD)	55.5 ± 15.4	53.9 ± 13.7	0.53
Menopausal status (n [%])			0.0097
premenopausal	0 (0)	8 (47)	
postmenopausal	11 (100)	9 (53)	
BMI (kg/m ² ; mean ± SD)	23.5 ± 3.5	25.3 ± 3.8	0.09
Smoker (n [%])	8 (24)	3 (9)	0.10
Diabetes (n [%])	2 (6)	8 (23)	0.08
Hypertension (n [%])	24 (73)	25 (71)	>0.99
Primary cause of stage 5 CKD (n [%])			0.18
hypertension	2 (6.1)	6 (17.1)	
glomerulonephritis	8 (24.2)	7 (20.0)	
diabetes	2 (6.1)	7 (20.0)	
pyelonephritis	3 (9.1)	3 (8.6)	
polycystic kidneys	3 (9.1)	2 (5.7)	
interstitial nephrosis	4 (12.1)	0 (0)	
other	11 (33.3)	10 (28.6)	
Dialysis vintage (mo; median [range])	23 (4 to 222)	25 (2 to 181)	0.49
Phosphate binder use (in 30 d before screening; n [%])	33 (100)	35 (100)	0.07
calcium carbonate	31 (94)	32 (91)	
sevelamer	1 (3)	1 (3)	
calcium carbonate + sevelamer	1 (3)	0 (0)	
calcium carbonate + aluminum	0 (0)	2 (6)	
Vitamin D use (in 12 mo before screening; n [%])	22 (67)	24 (69)	1.0

^aBMI, body mass index.**Table 2.** Changes in serum biochemical parameters

Parameter	Sevelamer (n = 33)		Calcium (n = 35)		P ^a
	Baseline	1 Yr	Baseline	1 Yr	
Phosphorus (mg/dl; mean ± SD)	5.8 ± 1.5	5.4 ± 0.14	5.7 ± 1.8	5.3 ± 1.9	0.78
Calcium (mg/dl; mean ± SD)	9.6 ± 0.7	9.1 ± 1.1	9.8 ± 1.0	9.3 ± 0.7 ^b	0.22
iPTH (pg/ml; median [range])	167 (3 to 1958)	275 (34 to 3890)	113 (4 to 1369)	227 (28 to 3636) ^b	0.55
25-OH D (ng/ml; median [range])	16.3 (5.0 to 34.6)	20.0 (5.4 to 53.2) ^b	16.6 (5.0 to 35.3)	17.4 (5.0 to 49.1)	0.53
1,25-OH ₂ D (pg/ml; median [range])	6.4 (5.0 to 22.4)	8.1 (4.5 to 83.5)	11.8 (5.0 to 42.9)	13.7 (4.5 to 61.5)	0.27
Total cholesterol (g/L; mean ± SD)	1.65 ± 0.38	1.40 ± 0.34 ^b	1.72 ± 0.41	1.66 ± 0.41	0.03
LDL cholesterol (g/L; mean ± SD)	1.03 ± 0.34	0.68 ± 0.30 ^b	1.07 ± 0.37	1.00 ± 0.31	<0.01
HDL cholesterol (g/L; mean ± SD)	0.50 ± 0.12	0.55 ± 0.14 ^b	0.43 ± 0.12	0.49 ± 0.15 ^b	0.87
Bicarbonate (mmol/L; mean ± SD)	19.3 ± 3.9	20.4 ± 3.3	19.7 ± 3.8	21.2 ± 4.1	0.34
BSAP (μg/L; median [range])	11.5 (3.9 to 65.2)	19.1 (3.9 to 174.0) ^b	10.6 (3.4 to 80.1)	12.7 (4.5 to 185.0)	0.19
Osteocalcin (ng/ml; median [range])	68.5 (2.9 to 896)	84.2 (15.2 to 595)	45.8 (2.4 to 308)	123 (7.6 to 1122) ^b	0.54
N-telopeptides (nM; median [range])	135 (7 to 1200)	298 (11 to 1200) ^b	72 (8 to 1200)	132 (10 to 1200) ^b	0.87

^aBetween-group difference in change from baseline assessed using Wilcoxon rank sum test.^bP < 0.05 for within-group change from baseline assessed using Wilcoxon signed rank test. Initial lipid levels measured at screening, not baseline.

serum calcium was consistently lower whereas serum iPTH was consistently higher with sevelamer. Serum 25-OH D and 1,25-OH₂ D levels were low at baseline in both groups, and small but comparable median increases from baseline were observed with both sevelamer and calcium (2.2 versus 1.9 ng/ml [*P* = 0.53] and 1.7 versus 0.2 ng/ml [*P* = 0.27], respectively). Total and LDL cholesterol significantly decreased within the sevelamer but not the calcium group, and the difference between treatments was significant (total cholesterol *P* = 0.03; LDL cholesterol *P* < 0.01).

HDL cholesterol increased in both groups similarly, without difference between groups. Serum bicarbonate levels were similar in both groups at all time points.

Serum bone-specific alkaline phosphatase (BSAP) significantly increased from baseline at 6 mo (*P* = 0.001) and at 1 yr (*P* = 0.02) with sevelamer but not calcium, but there were no differences between groups at either time point. Osteocalcin increased significantly from baseline in the calcium group, but there was no significant difference between treatments. Serum

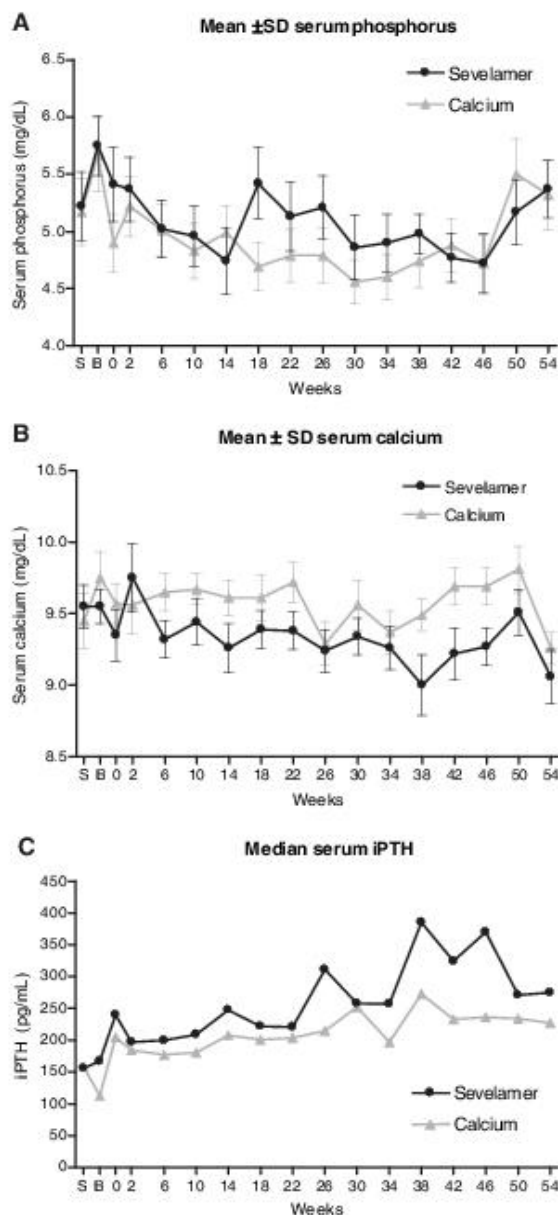


Figure 2. Serum phosphorus (A), serum calcium (B), and serum iPTH (C) during 1 yr of treatment with sevelamer or calcium.

N-telopeptide increased significantly from baseline in both groups but without significant between-group differences.

Bone Turnover and Mineralization

Changes in parameters of bone mineralization and turnover are summarized in Table 3. Mineralization lag time was comparable between groups at baseline and 1 yr with no significant changes within or between groups. Osteoid thickness signifi-

cantly increased in both groups with no significant between-group differences in change from baseline.

There were no significant changes within or between groups in activation frequency (Acf), number of osteoblasts/bone perimeter, or number of osteoclasts/bone perimeter. Bone formation rate/bone surface significantly increased from baseline in the sevelamer group ($P = 0.019$) but not in the calcium group. At baseline, three patients were excluded from the study because of stainable aluminum at $>20\%$ of the trabecular surface, and there were no patients with stainable bone aluminum at end of the study.

Trabecular Architecture

Cancellous bone volume was significantly higher in the calcium group than in the sevelamer group at baseline ($P = 0.033$) and 1 yr ($P = 0.029$), but there were no significant changes from baseline within (sevelamer $P = 0.09$; calcium $P = 0.11$) or between groups. Trabecular thickness was significantly higher in the calcium group ($P = 0.02$) at baseline, although below normal in both groups. There was no difference in change from baseline between groups after 1 yr. Trabecular separation, a parameter indicating connection between trabeculae that is microarchitecture of cancellous bone, was comparable between groups at baseline and 1 yr with no significant differences in change from baseline within or between groups. The majority of patients had normal trabecular separation at baseline (sevelamer 67%; calcium 74%). In patients with abnormally high ($>550 \mu\text{m}$) baseline trabecular separation, seven of 10 patients in the sevelamer group had normal trabecular separation after 1 yr, whereas separation remained $>550 \mu\text{m}$ in all three calcium patients ($P = 0.07$).

Shifts between Groups of Renal Bone Disease

At baseline, ABD was the most frequent condition in both the sevelamer ($n = 22$; 67%) and calcium ($n = 20$; 57%) groups. Severe predominant HPBD was diagnosed in four (12%) patients in the sevelamer group and five (14%) in the calcium group. Mild to moderate HPBD was found in six (18%) patients in the sevelamer group and eight (23%) patients in the calcium group. One patient in each group had MUO. Only a single patient, in the calcium group, had osteomalacia.

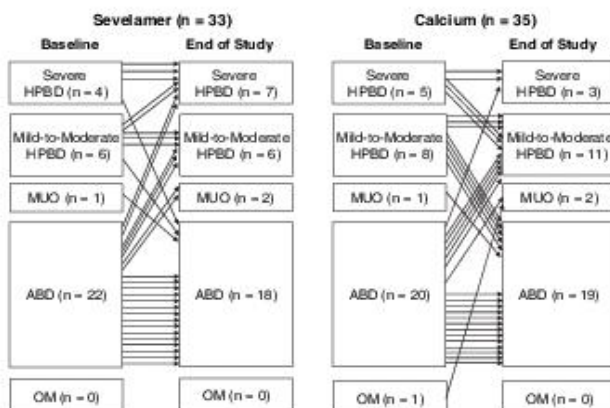
At the end of the study, three (9%) patients in the sevelamer group fell to the ABD category (from severe HPBD [$n = 1$], from mild to moderate HPBD [$n = 1$], and from MUO [$n = 1$]). In contrast, in the calcium group, nine (26%) patients fell to a lower bone turnover category (from severe HPBD to mild to moderate HPBD [$n = 3$], from mild to moderate HPBD to ABD [$n = 5$], and from MUO to ABD [$n = 1$]; Figure 3). The majority of patients still had ABD, and no patient developed osteomalacia.

DISCUSSION

A high prevalence of ABD was observed in this study, with almost 60% of patients having an Acf $<0.49/\text{yr}$ at baseline.

Table 3. Changes in bone mineralization, bone turnover, and trabecular architecture^a

Parameter	Sevelamer (n = 33)		Calcium (n = 35)		P ^b
	Baseline	1 Yr	Baseline	1 Yr	
Bone mineralization					
mineralization lag time in lamellar bone (d)	28.2 (9.4 to 175.9)	36.1 (0 to 153.7)	26.1 (0.4 to 155.0)	40.8 (2.4 to 493.8)	0.54
osteoid thickness (μm)	9.3 (3.8 to 37.7)	10.5 (4.8 to 16.5) ^c	9.6 (4.1 to 24.0)	10.7 (5.7 to 27.8) ^d	0.71
Bone turnover					
Acf (yr)	0.36 (0.04 to 1.84)	0.43 (0.02 to 2.41)	0.39 (0 to 1.54)	0.45 (0 to 1.97)	0.76
bone formation rate/bone surface (mm ³ /cm ² per yr)	1.6 (0.1 to 8.8)	2.3 (0.2 to 13.9) ^e	2.1 (0 to 8.5)	2.5 (0.4 to 14.0)	0.82
no. of osteoblasts/bone perimeter (1/100 mm)	136.0 (0 to 882.5)	148.2 (2.8 to 1690.6)	87.2 (3.1 to 1109.7)	180.8 (6.4 to 1268.1)	0.99
no. of osteoclasts/bone perimeter (1/100 mm)	31.6 (0.1 to 499.7)	39.6 (1.2 to 172.9)	21.4 (3.1 to 183.0)	34.4 (0 to 223.6)	0.72
Trabecular architecture					
cancellous bone volume/tissue volume (%)	18.4 (0.2 to 66.9)	19.8 (10.9 to 38.9)	21.7 (11.2 to 35.0)	24.0 (11.5 to 59.1)	0.10
trabecular thickness (μm)	105.7 (1.7 to 144.6)	106.7 (70.5 to 191.9)	119.1 (62.6 to 171.7)	114.7 (0.6 to 188.2)	0.96
trabecular separation (μm)	486.2 (11.8 to 773.5)	466.5 (229.6 to 841.6)	418.4 (247.7 to 963.9)	385.0 (3.3 to 671.4)	0.46

^aData are median (range).^bBetween-group difference in change from baseline.^cP = 0.030 versus baseline.^dP = 0.026 versus baseline.^eP = 0.019 versus baseline.**Figure 3.** Changes in types of bone disease (based on qualitative evaluation of bone). OM, osteomalacia.

This is consistent with reports of increasing prevalence of ABD in the past two decades,^{1–3} an increase that has coincided with the widespread use of calcium-based binders combined with more aggressive use of vitamin D analogs.^{4,5} Excluding patients with serum phosphorus values >8.1 mg/dl could not have had a major influence on these results because only two patients were excluded because of such severe hyperphosphatemia.

Importantly, the high prevalence of ABD was observed despite most patients' being treated in accordance with K/DOQI guidelines and having serum mineral parameters within recommended ranges.¹¹ Almost all (98%) patients were on calcium carbonate before the study, 65% had received calcitriol, and average dialysis vintage was >3.5 yr. This may explain why median serum iPTH levels were relatively low (150 to 300 pg/

ml) at baseline. The frequent observation of ABD with median PTH values of 150 to 400 pg/ml in this study reaffirms the value of bone biopsies during dialysis in patients with intermediate PTH values.¹⁴

Although there were no differences between groups, bone formation rate significantly increased from baseline in the sevelamer group but not the calcium group. Moreover, seven of 10 sevelamer patients with abnormally high baseline trabecular separation moved into normal range compared with none of the calcium-treated patients ($P = 0.07$). BSAP, an index of bone formation, increased from baseline in the sevelamer group, whereas N-telopeptide, a parameter of bone resorption, increased in both treatment groups. This indicates that the osteocalcin increase seen in the calcium group is mainly reflective of increased bone resorption with the accompanied release of osteocalcin from bone. Effects of sevelamer and calcium on bone mineralization were comparable.

Although some changes in histomorphometric parameters were suggestive of increased bone turnover with sevelamer, most (53%) patients still had ABD after 1 yr of treatment with no differences between groups with regard to change in bone disease classification. This is consistent with the intransigent nature of ABD, which, once established, means that any improvements in bone histology occur very slowly; however, changes in biochemical parameters may forecast improvements in bone histology. Interpretation of biochemical markers of bone is limited when the markers are renally excreted. This applies to osteocalcin and N-telopeptides, whereas BSAP is not retained in CKD.

Previous studies have suggested that sevelamer may have a positive effect on bone mass and turnover compared with cal-

cium. In a 1-yr randomized trial of 111 hemodialysis patients, calcium treatment resulted in a significant reduction in thoracic vertebral bone mineral density as measured by EBT compared with sevelamer.⁹ Calcium was also associated with lower levels of PTH, BSAP, and osteocalcin. Although bone biopsies were not performed, these results suggest that calcium-treated patients may have been more likely to develop adynamic bone than sevelamer-treated patients. Similar findings after 2 yr were reported by Asmus *et al.*¹⁰ Moreover, a study of 28 hemodialysis patients with ABD reported that switching treatment from calcium to sevelamer resulted in biochemical changes, suggesting improved bone turnover in 18% of patients after 6 mo and 32% of patients after 1 yr.¹⁵

It has been reported that low bone turnover predisposes to the development of extraosseous calcifications.⁸ Vascular calcification is common in CKD and is a predictor of all-cause and cardiovascular mortality.^{16–18} Similarly, reduced bone mass has been shown to predict mortality risk in long-term hemodialysis patients.¹⁹ Using EBT, an inverse relationship between bone density and extent of vascular calcification has been observed in patients on hemodialysis.^{9,20}

25-OH D and 1,25-OH₂ D were low at baseline and end of the study in both treatment groups. The use of calcitriol or vitamin D analogs was higher in the sevelamer group than in the calcium group, with a significantly greater increase in change in median weekly dosage and more patients with an increase in dosage. 25-OH D blood levels did not fall in either group, indicating that there was no binding of 25-OH D by sevelamer. Although well controlled in both groups, mean serum calcium was consistently lower with sevelamer, which may explain the greater use of vitamin D analogs in this group. Increased vitamin D use together with higher PTH levels could explain the increased bone formation rates seen with sevelamer. Retrospective studies have suggested that use of calcitriol or paricalcitol may be associated with reduced cardiovascular mortality and a survival advantage in patients who are on dialysis.^{21,22} The potential for increased use of calcitriol or vitamin D analogs in patients who are treated with sevelamer may thus be associated with important clinical benefits.

In summary, this study shows that phosphate control with sevelamer resulted in no statistically significant changes in bone turnover or bone mineralization compared with calcium-based binders; however, bone formation was significantly increased with sevelamer, which was associated with improved trabecular architecture. Further studies are required to assess whether increased bone formation results in higher bone volume and reduced fracture rates.

CONCISE METHODS

This was a 54-wk, randomized, open-label study to compare the effects of sevelamer hydrochloride and calcium carbonate on bone turnover, mineralization, and volume. Adult patients (≥ 18 yr) who were on hemodialysis 3 times/wk (≥ 3 mo) and stable serum phosphorus ≤ 8.1 mg/dl (≤ 2.6 mmol/L) for ≥ 1 mo before screening and

were receiving treatment with a phosphate binder were enrolled at 16 centers in Portugal. Patients were required to have stable serum phosphorus ≤ 8.1 mg/dl (≤ 2.6 mmol/L) because higher levels were considered indicative of noncompliance with phosphate binder therapy. Other exclusion criteria included use of aluminum-based binders in the previous year (≥ 3 consecutive months), treatment with medications that are known to affect bone metabolism (*e.g.*, corticosteroids, antiepileptic or thyroid agents, bisphosphonate, calcitonin), tetracycline allergy, alcohol or drug abuse, and any significant concurrent clinical condition. The use of aluminum- or magnesium-based antacids was not permitted during the study, with the exception of aluminum rescue therapy (maximum 4 wk) for treatment-resistant hyperphosphatemia. The use of calcium other than prescribed as study drug was not permitted. Written informed consent was obtained from all patients, and the study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by independent ethics committees at each of the participating centers.

Study Design

At screening, patients underwent physical examination and review of medical history and previous medication. Within 3 wk of screening, eligible patients had baseline transiliac bone biopsies taken from the right or left anterior iliac crest in an alternating manner after double tetracycline labeling of bone. Patients who had $<20\%$ stainable aluminum (aurin tricarboxylic acid stain) at the trabecular surface and whose biopsy was suitable for histomorphometry were stratified according to qualitatively assessed bone turnover (high *versus* low/normal) and randomly assigned to treatment with either sevelamer or calcium in a 1:1 manner. Randomization was performed centrally by an independent study coordinator, with a maximum period of 6 wk allowed between bone biopsy and start of treatment.

During the 54-wk treatment phase, patients received sevelamer hydrochloride (Renagel 800-mg tablets; Genzyme, Cambridge, MA) or calcium carbonate (Salusif 500- or 1000-mg tablets; Lab de Produtos Químicos e Farmacêuticos Lda, Lisbon, Portugal) three times a day with meals. Number of tablets per meal could be adjusted to reflect phosphorus content of the meal, as long as the daily dosage was maintained. Starting dosage was individualized by substituting the phosphate binder used by the patient at screening with sevelamer or calcium on a gram-per-gram basis. Two weeks after randomization and every 4 wk thereafter, serum phosphorus, calcium, and iPTH were assessed together with adverse events and any changes in concomitant medication. When required, the dosage of phosphate binder was titrated to achieve a serum phosphorus of 3.2 to 5.0 mg/dl (1.00 to 1.60 mmol/L). Serum calcium (adjusted for albumin) was maintained at <10.4 mg/dl (<2.60 mmol/L) by adjustment of calcitriol or calcitriol analogue and/or calcium dosage if necessary. Calcitriol and calcitriol analogue treatment could also be titrated to maintain levels of serum iPTH at 150 to 300 pg/ml. The choice of vitamin D compound to be used was not specified and was at the discretion of the individual physician. No parent vitamin D or calcidiol was given. At the end of treatment, a second bone biopsy, from the iliac crest of the opposite site, was performed.

As in previous studies of sevelamer, neither clinical investigators nor patients were blinded to treatment because it would have been

possible to identify by the lower incidence of hypercalcemia and decrease in serum LDL cholesterol associated with sevelamer. Differences in taste, smell, and appearance of tablets may also have resulted in identification of treatment modality. Compliance was assessed by pill counts.

Bone Biopsies, Mineralized Bone Histology, and Bone Morphometry

Bone biopsies were taken at baseline and end of study. For double labeling of bone, patients received oral tetracycline hydrochloride 500 mg twice daily for 2 d followed by a 10-d tetracycline-free interval and another course of tetracycline hydrochloride at the same dosage for 4 d. Transiliac bone biopsies were performed after an additional 4 d with bone samples (0.5 cm diameter \times 1 to 2 cm length) being taken from the anterior iliac crest. All bone biopsies were performed at designated study centers in Lisbon (A.F.) and Porto (J.M.F.).

Iliac crest bone samples were fixed with ethanol at room temperature, dehydrated, and embedded in methylmethacrylate as described previously.¹³ Serial sections of 3- and 7- μ m thickness were cut with a Microm microtome equipped with a carbide-edged knife (HM360; Microm, Walldorf, Germany). Sections were stained with the modified Masson-Goldner trichrome stain,²³ the aurin tricarboxylic acid stain,²⁴ and solochrome azurine,²⁵ used to demonstrate the extent of aluminum deposits at the bone-osteoid interface. Unstained sections were prepared for phase-contrast and fluorescence light microscopy. Qualitative assessment of bone was performed at the study start to stratify patients by bone turnover status before randomization and at the study end to categorize patients by renal bone disease type. In addition, at the end of the study, histomorphometry for static and dynamic parameters of bone structure, formation, and resorption using the Osteoplan II system (C. Zeiss, New York, NY) was done at a magnification of \times 200. All bone samples were processed and analyzed at the Bone Diagnostic and Research Laboratory, University of Kentucky Medical Center (Lexington, KY), without knowledge of the treatment arm. All parameters were in compliance with the recommendations of the nomenclature committee of the American Society of Bone and Mineral Research.²⁶

The primary efficacy end points were (1) changes from baseline in mineralization lag time in lamellar bone and osteoid thickness and (2) changes in bone turnover as measured by Acf, number of osteoblasts/bone perimeter, number of osteoclasts/bone perimeter, and bone formation rate/bone surface. Secondary end points were the percentages of patients who developed (1) osteomalacia (mineralization lag time $>$ 100 d and osteoid thickness $>$ 20 μ m),¹³ (2) predominant HPBD (Acf $>$ 0.72/yr, presence of woven osteoid and fibrosis, osteoblasts $>$ 200/100 mm, and osteoclasts $>$ 53/100 mm), and (3) ABD (Acf $<$ 0.49/yr and osteoid thickness $<$ 20 μ m). Changes from baseline in trabecular microarchitecture (cancellous bone volume, trabecular thickness, and trabecular separation) were also assessed.

Blood samples were taken before dialysis (at screening, 6 mo, and 1 yr) and assessed at a central laboratory (Laboratório de Análisis, Dr. Echevarne, Barcelona, Spain). Serum phosphorus, calcium (adjusted for albumin), iPTH (Immunitite 2500 Intact PTH; Diagnostics Products Corp., Madrid, Spain), and bicarbonate were measured at screening, baseline, randomization, 2 wk after randomization, and then ev-

ery 4 wk until the end of the study. Vitamin D (25-OH D and 1,25-OH₂ D; RIA, Sorin Biomedica, Barcelona, Spain), BSAP (RIA, IZASA, Madrid, Spain), osteocalcin (RIA, IZASA), and N-telopeptide (type I collagen; ELISA; Ortho-Clinical Diagnostics, Buckinghamshire, UK) were measured at baseline, 6 mo, and 1 yr.

Statistical Analyses

Acf was chosen for determination of sample size because it has the largest variance among the studied histomorphometric parameters. On this basis, it was estimated that a sample size of 32 patients would provide 97% power to detect a significant difference ($P < 0.01$) between treatments, based on the assumption that 0.16/yr (within-group SD \pm 0.08) is the smallest difference that would be considered clinically meaningful; however, because a high dropout rate was expected, a target enrollment of 100 patients was selected.

Baseline characteristics were compared between groups using the Wilcoxon rank sum test for continuous variables and Fisher exact test for categorical variables. When any baseline characteristics were significantly different between groups, an adjusted treatment difference in the change from baseline to end of study was provided based on multiple linear regression models. Changes from baseline to end of study were assessed using Wilcoxon signed rank tests and compared between groups using the Wilcoxon rank sum test for continuous variables and Fisher exact test for categorical variables. All probability tests were two-sided and tested at the $\alpha = 0.05$ level of significance. The primary population for the analysis was the intent-to-treat population, which included all patients who were randomly assigned, received one or more doses of study medication, and had a second bone biopsy.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Genzyme Corp.

Data from this study were presented at the XLIII Congress of the European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association; July 15 through 18, 2006; Glasgow, UK.

Other members of the Sevelamer Study Group were Patricia Martins, Centro Renal da Prelada, Porto; António Morais Sarmento, CMDR-Centro Médico Doenças Renais, Porto; Jorge Dickson, Sociedade Portuguesa de Diálise Amadora, Amadora; Berta De Carvalho, UniNefro, Sto. Tirso; Odete Pereira, Nefronorte-Centro Renal do Norte em Paredes; Ana Ventura, Nefronorte-Centro Renal da Régua-Peso da Régua, Peso da Régua; and Vasco Miranda, Dinefro, Maia.

We thank Guodong Wang, Richard M. Wheaton, and Juliana Van Willigen for excellent technical support.

DISCLOSURES

A.F. is a member of a speaker bureau for Genzyme Corp. and an advisor for Abbott; J.M.F. is a consultant for Genzyme Portugal and Amgen Portugal; R.M.H. and A.D. are employees of Genzyme Corp.

REFERENCES

1. Monier-Faugere MC, Malluche HH: Trends in renal osteodystrophy: A survey from 1983 to 1995 in a total of 2248 patients. *Nephrol Dial Transplant* 11[Suppl 3]: 111–120, 1996
2. Couttenye MM, D'Haese PC, Deng JT, Van Hoof VO, Verpooten GA, De Broe ME: High prevalence of adynamic bone disease diagnosed by biochemical markers in a wide sample of the European CAPD population. *Nephrol Dial Transplant* 12: 2144–2150, 1997
3. Malluche HH, Mawad H, Monier-Faugere MC: The importance of bone health in end-stage renal disease: Out of the frying pan, into the fire? *Nephrol Dial Transplant* 19[Suppl 1]: i9–i13, 2004
4. Malluche HH, Monier-Faugere MC: Risk of adynamic bone disease in dialyzed patients. *Kidney Int Suppl* 38: S62–S67, 1992
5. Pei Y, Hercz G, Greenwood C, Segre G, Manuel A, Saiphoo C, Fenton S, Sherrard D: Risk factors for renal osteodystrophy: A multivariate analysis. *J Bone Miner Res* 10: 149–156, 1995
6. Cannata Andia JB: Adynamic bone and chronic renal failure: An overview. *Am J Med Sci* 320: 81–84, 2000
7. Chertow GM, Burke SK, Raggi P, Treat to Goal Working Group: Sevelamer attenuates the progression of coronary and aortic calcification in hemodialysis patients. *Kidney Int* 62: 245–252, 2002
8. London GM, Marty C, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F, de Vemejoul MC: Arterial calcifications and bone histomorphometry in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 15: 1943–1951, 2004
9. Raggi P, James G, Burke SK, Bommer J, Chasan-Taber S, Holzer H, Braun J, Chertow GM: Decrease in thoracic vertebral bone attenuation with calcium-based phosphate binders in hemodialysis. *J Bone Miner Res* 20: 764–772, 2005
10. Asmus HG, Braun J, Krause R, Brunkhorst R, Holzer H, Schulz W, Neumayer HH, Raggi P, Bommer J: Two year comparison of sevelamer and calcium carbonate effects on cardiovascular calcification and bone density. *Nephrol Dial Transplant* 20: 1653–1661, 2005
11. National Kidney Foundation: K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 42[Suppl 3]: S1–S201, 2003
12. Martin KJ, Olgaard K, Coburn JW, Coen GM, Fukagawa M, Langman C, Malluche HH, McCarthy JT, Massry SG, Mehls O, Salusky IB, Silver JM, Smogorzewski MT, Slatopolsky EM, McCann L, Bone Turnover Work Group: Diagnosis, assessment, and treatment of bone turnover abnormalities in renal osteodystrophy. *Am J Kidney Dis* 43: 558–565, 2004
13. Malluche HH, Faugere MC: *Atlas of Mineralized Bone Histology*, New York, Karger, 1986
14. Qi Q, Monier-Faugere MC, Geng Z, Malluche HH: Predictive value of serum parathyroid hormone levels for bone turnover in patients on chronic maintenance dialysis. *Am J Kidney Dis* 26: 622–631, 1995
15. Hyodo T, Wakai H, Takemura T, Taira T, Hidai H, Tsuchida M, Fujita T, Yoshida K, Baba S, Sakai T: Treatment of adynamic bone disease with the complete replacement from calcium carbonate to sevelamer hydrochloride [in Japanese]. *Clin Calcium* 15[Suppl 1]: 15–22, 2005
16. Blacher J, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, London GM: Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension* 38: 938–942, 2001
17. London GM, Guerin AP, Marchais SJ, Metivier F, Pannier B, Adda H: Arterial media calcification in end-stage renal disease: impact on all-cause and cardiovascular mortality. *Nephrol Dial Transplant* 18: 1731–1740, 2003
18. Adragao T, Pires A, Lucas C, Bime R, Magalhaes L, Goncalves M, Negro AP: A simple vascular calcification score predicts cardiovascular risk in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 19: 1480–1488, 2004
19. Taal MW, Roe S, Masud T, Green D, Porter C, Cassidy MJ: Total hip bone mass predicts survival in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 63: 1116–1120, 2003
20. Braun J, Oldendorf M, Moshage W, Heidler R, Zeitler E, Luft FC: Electron beam computed tomography in the evaluation of cardiac calcification in chronic dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 27: 394–401, 1996
21. Shoji T, Nishizawa Y: Vitamin D and survival of hemodialysis patients [in Japanese]. *Clin Calcium* 14: 64–68, 2004
22. Teng M, Wolf M, O'Fethun MN, Lazarus JM, Heman MA, Camargo CA Jr, Thadhani R: Activated injectable vitamin D and hemodialysis survival: A historical cohort study. *J Am Soc Nephrol* 16: 1115–1125, 2005
23. Goldner J: A modification of the Masson trichrome technique for routine laboratory purposes. *Am J Pathol* 14: 237–243, 1938
24. Lillie PD, Fullmer HM: *Histopathologic Technique and Practical Histochemistry*, 4th Ed., New York, McGraw Hill, 1976
25. Denton J, Freemont AJ, Ball J: Detection of distribution of aluminium in bone. *J Clin Pathol* 37: 136–142, 1984
26. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche HH, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR: Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units. *J Bone Miner Res* 2: 595–610, 1987

4.2 Proposta de indicações para a realização de biopsia óssea

Pensamos que esta técnica (realizada em regime de ambulatório, sob anestesia local) se justifica, pelo menos, nas seguintes situações:

- antes da realização de uma paratiroidectomia, caso haja suspeita de intoxicação por alumínio ou ferro;
- Sempre que a causa de sintomas relevantes e/ou alterações significativas do metabolismo fosfo-cálcico não possa ser explicada por métodos não invasivos;
- Em doentes sintomáticos e com hipercalcemia refratária;
- Antes do início de terapêutica com bifosfonatos num doente urémico (face ao risco de agravamento de uma doença adinâmica eventualmente já instalada);
- Na avaliação da osteodistrofia renal significativa após transplantação. Como já referimos, nesta situação é frequentemente difícil interpretar os marcadores não invasivos da remodelação óssea. Num doente com ODR de alta ou baixa remodelação antes do transplante, sujeito a imunossuppressores com diferentes efeitos (frequentemente antagónicos) sobre a remodelação (por exemplo: prednisolona, ciclosporina, rapamicina) e com disfunção parcial do enxerto, é muito difícil fazer um diagnóstico da remodelação óssea por métodos não invasivos.

Finalmente, importa salientar que a doença óssea associada à urémia, é um processo dinâmico, influenciado por múltiplos fatores: genéticos, hereditários, etários, associados ao género, endocrinológicos, alimentares, ambientais, medicamentosos, associados à biocompatibilidade de materiais, dependentes de patologias associadas, etc..

Esta variedade de fatores moduladores da ODR e a sua interação dinâmica faz sobressair a necessidade de, com frequência, ser necessário recorrer à biopsia óssea para a obtenção de um diagnóstico rigoroso e conclusivo.

De fato, só a observação atenta da histologia óssea revela, muitas vezes, aspectos da transformação de um quadro patológico num outro, que apesar de ter sintomatologia semelhante, pode apresentar características histológicas diferentes e implicar terapêuticas diversas.

4.3 Bibliografia capítulo 4

1. *Diagnosis of renal osteodystrophy: when and how to use biochemical markers and non-invasive methods; when one biopsy is needed.* **Ferreira,A.** 2000, Nephrol Dial Transplant, Vol. 15, pp. 8-14.
2. *Bone histomorphometry in renal osteodystrophy.* **Ott,S.M.** 2, 2009, Semin Nephrol, Vol. 29, pp. 122-132.
3. *Role of cytokines in renal osteodystrophy.* **Monier-Faugere,M-C.; Malluche,H.H.** 4, 1997, Current Opinion Nephrol Hypert, Vol. 6, pp. 327-332.
4. *Bone resorption by osteoclasts.* **Teitelbaum,S.L.** 2000, Science, Vol. 289, pp. 1508-1514.
5. *The role of bone biopsy in the management of patients with renal osteodystrophy.* **Malluche,H.; Monier-Faugere,M-C.** 1994, J Am Soc Nephrol, pp. 1631-1642.
6. *Assessment of renal osteodystrophy in hemodialysis patients.* **DeVita,M.V.; Rasenas,L.L.; Bansal,M.; Gleim,G.W.; Zabetakis,P.M.; Gardenswartz,M.H.; et,al.** 1992, <medicine, Vol. 71, pp. 284-290.
7. *A utilidade da biopsia óssea com histomorfometria na caracterização da osteodistrofia renal.* **Ferreira,A.; Carvalho,F.; Coelho,A.; Felicíssimo,P.; Galvão,M.J.; da Costa,M.** 1993, Rev Port Nefrol Hipert, Vol. 7, pp. 69-82.
8. *The spectrum of bone disease in end-stage renal failure: an evolving disorder.* **Sherrard,D.J.; Hercz,G.; Pey,Y.; Maloney,N.; Greenwood,C.; Manuel,A.; et,al.** 1993, Kidney Int, Vol. 43, pp. 436-442.
9. *Increased bone aluminum deposition after subtotal parathyroidectomy in dialyzed patients.* **de Vernejoul,M.C.; Marchais,S.; Landom,G.; Morieux,C.; Bielakoff,J.; Miravet,L.** 1985, Kidney Int, Vol. 27, pp. 785-71.
10. *Histomorphometric evidence of deleterious effect of aluminum on osteoblasts.* **de Vernejoul, M.C.; Belenguer, R.; Halkidou, H.; Buisine, A.; Bielakoff, J.; Miravet, L.** 1985, Bone, Vol. 6, pp. 15-20.
11. *Cortical v trabecular bone aluminum in dialyzed patients.* **Lefebvre,A.; Horlait,P.; Chappuis,P.; Moynot,A.** 1988, Am J Kidney Dis, Vol. XII, pp. 220-226.
12. *KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention and treatment of chronic kidney disease - mineral and bone disorder (CKD-MBD).* **Kidney**

Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. Sup 113, 2009, *Kidney Int*, Vol. 76, pp. S1-S130.

13. *Cela n'arrive qu'aux autres (aluminium intoxication only happens in the other nephrologist's dialysis centre).* **Simões,J.; Barata,J.D.; D'Haese,P.; De Broe,M.E.** 1, 1994, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 9, pp. 67-68.

14. *Low-dose (5 mg/kg) desferrioxamine treatment in acutely aluminium-intoxicated haemodialysis patients using two drug administration schedules.* **Barata,J.D.; D'Haese,P.; Pires,C.; Lamberts,L.V.; Simões,J.; De Broe,M.E.** 1, 1996, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 11, pp. 125-132.

15. *Staining of bone aluminium: comparison between aluminon and solochrome azurine and their correlation with bone aluminium content.* **Fernández-Martín,J.L.; Menéndez,P.; Acuña,G.; Canteros,A; Gómez,C.; Cannata,J.B.** *Nephrol Dial Transplant* : s.n., 1996, Vol. 11, pp. S80-S85. compara a sensibilidade (superior) do solocromo com o ác. auritricarboxílico.

16. *Biochemical markers of bone turnover in the diagnosis of renal osteodystrophy: what do we have, what do we need?* **Ferreira,A.** 1998, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 13, pp. 29-32.

17. *KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention and treatment of chronic kidney disease - mineral and bone disorder (CKD-MBD).* **Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group.** Suppl 113, 2009, *Kidney Int*, Vol. 76, pp. S1-S130.

18. *International assessment of TMV classification of bone biopsy in ESKD.* **Sprague,S.M.; Hongyan,Du.; Manley,T.L.; Carvalho,A.B.; D'Haese,P.; Drüeke,T.B.; Ferreira,A.; Jorgetti,V.; Moe,S.M.; Malluche,H.H.; Bellorin-Font,E.R.** 2010, *ASN Renal Week 2010 Abstracts*; Poster SA-PO2933.

19. *Predictive value of biomarkers for bone turnover in ESKD.* **Malluche,H.H.; Bellorin-Font,E.R.; Rojas,E.; Carvalho,A.B.; D'Haese,P.C.; Drüeke,T.B.; Ferreira,A.; Jorgetti,V.; Moe,S.M.; Sprague,S.M.** 2010, *ASN Renal Week 2010 Abstracts*; Poster SA-PO2924.

20. *Sensitivity and specificity of guideline PTH targets to differentiate high and low bone turnover.* **Moe,S.M.; Bellorin-Font,E.R.; Carvalho,A.B.; D'Haese,P.C.; Drüeke,T.B.; Du,H.; Ferreira,A.; Malluche,H.H.; Sprague,S.M.** 2010, *ASN Renal Week 2010 Abstracts*; Poster SA-PO2926.

21. *Renal bone disease in 76 patients with varying degrees of predialysis chronic renal failure: a cross sectional study.* **Coen,G.; Mazzaferro,S.; Ballanti,P.; Sardella,D.; Chicca,S.; Manni,M.; Bonnucci,M.; Taggi,F.** 1996, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 11, pp. 823-819.

22. *Renal osteodystrophy in predialysis and hemodialysis patients: comparison of histological patterns and diagnostic predictivity of intact PTH.* **Coen,G.; Ballanti,P.; Bonnucci,E.** 2002, *Nephron*, Vol. 91, pp. 103-111.
23. *Spectrum of renal bone disease in end-stage renal failure patients not yet on dialysis.* **Spasovski,G.B.; Bervoets,A.R.; Behets,G.J.; et,al.** 2003, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 18, pp. 1159-1166.
24. *Adynamic bone disease with negative aluminium staining in predialysis: prevalence and evolution after maintenance dialysis.* **Hernandez,D.; Concepcion,M.T.; Lorenzo,V.; et,al.** 1994, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 9, pp. 517-523.
25. *The evolution of bone disease in patients on hemodialysis for 10 years or more.* **Lindergard,B.; Lindholm,T.; Sandstroem,S.; et,al.** 1979, *Proc Eur Dial Transplant Assoc*, Vol. 15, pp. 639-674.
26. *Low BMD is less predictive than reported falls for future limb fractures in women across Europe: results from the European Prospective Osteoporosis Study.* **Kaptoge,S.; Benevolenskaya,L.I.; Bhalla,A.K.; Cannata,J.B.; et,al.** 2005, *Bone*, Vol. 36, pp. 387-398.
27. *Studies of bone morphology, bone densitometry, and laboratory data in patients on maintenance hemodialysis treatment.* **Lindergard,B.; Johnell,O.; Nilsson,B.E.** 1985, *Nephron*, Vol. 39, pp. 122-129.
28. *Low bone mineral density and fractures in long-term hemodialysis patients: a meta-analysis.* **Jamal,S.A.; Hayden,J.A.; Beyene,J.** 2007, *Am J Kidney Dis*, Vol. 49, pp. 674-681.
29. *Femoral bone mineral density reflects histologically determined cortical bone volume in hemodialysis patients.* **Adragão,T.; Herberth,J.; Monier-Faugere,M-C.; Branscum,A.J.; Ferreira,A.; Frazão,J.M.; Malluche,H.H.** 2009, *Osteoporos Int*, p. Published on line 25 th June 2009.
30. *Bone mineral densitometry in dialyzed patients: quantitative computed tomography versus dual photon absorptiometry.* **Lechleitner,P; Krimbaker,E.; Genser,N.; et,al.** 1994, *Bone*, Vol. 15, pp. 387-391.
31. *Bone mass and microarchitecture in CKD patients with fracture.* **Nickolas,T.L.; Stein,E.; Choen,A.; Thomas,V.; Staron,R.B.; McMahan,D.J.; Leonard,M.B.; Shane,E.** 8, 2010, *J Am Soc Nephrol*, Vol. 21, pp. 1371-1380.
32. *Predictive value of serum parathyroid hormone levels for bone turnover in patients on chronic maintenance dialysis.* **Qi,Q.; Maunier-Faugere,M.C.; Geng,Z.; Malluche,H.** 1995, *Am J Kidney Dis*, Vol. 22, pp. 622-631.
33. *Effects of sevelamer hydrochloride and calcium carbonate on renal osteodystrophy in hemodialysis patients.* **Ferreira,A.; Frazão,J.M.; Monier-Faugere,M-C.; Gil,C;**

Galvão,J.; Oliveira,C.; Baldaia,J.; Rodrigues,I.; Santos,C.; Ribeiro,S; Hoenger,R.M.; Duggal,A.; Malluche,H.H. 2008, J Am Soc Nephrol, Vol. 19, pp. 405-412.

34. *K/DOQI-recommended intact PTH levels do not prevent low-turnover bone disease in hemodialysis patients.* **Barreto,F.C.; Barreto,D.V.; Moysés,R.M.A.; et,al.** 2008, Kidney Int, Vol. 73, pp. 771-777.

35. *The role of bone biopsy in clinical practice and research.* **Malluche,H.H.; Langub,M.C.; Monier-Faugere,M-C.** 1999, Kidney Int, Vol. 56, pp. S20-S25.

36. *Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units.* **Parfitt,A.M.; Drezner,M.K.; Glorieux,F.H.; Kanis,J.A.; Malluche,H.; Meunier,P.J.; Ott,S.M.; Recker,R.R.** 1987, J Bone Miner Res, Vol. 2, pp. 595-610.

37. *Técnica da biopsia óssea de osso não descalcificado com hitomorfometria - Utilidade na caracterização da osteodistrofia renal.* **Galvão,M.J.; Ferreira,A.; Carvalho,F.; da Costa,M.** 1996, Rev Port Imunohist, Vol. 7, pp. 11-13.

38. *Mechanisms of disease: renal osteodystrophy.* **Hruska,K.A.; Teitelbaum,S.L.** 1995, N Eng J Med, Vol. 333, pp. 163-174.

39. *Trends in renal osteodystrophy: a survey from 1983 to 1995 in a total of 2248 patients.* **Monier-Faugere,M-C.; Malluche,H.** S-3, 1996, Nephrol Dial Transplant, Vol. 11, pp. S111-S120.

40. *Avaliação da remodelação óssea na urémia.* **Ferreira,A.** 1996, Rev Port Nefrol Hipert, Vol. 10, pp. S73-S83.

41. *Hypokinetic azotemic osteodystrophy.* **Cannata-Andía,J.** 1998, Kidney Int, Vol. 54, pp. 1000-1016.

42. *Low bone volume: a risk factor for coronary calcifications in hemodialysis patients.* **Adragão,T.; Herberth,J.; Monier-Faugere,M-C.; Branscum,A.J.; Ferreira,A.; Frazão,J.M.; Dias Curto,J.; Malluche,H.H.** 2009, Clin J Am Soc Nephrol, Vol. 4, pp. 450-455.

43. *Vascular calcifications: pathogenesis, management and impact on clinical outcomes.* **Cannata-Andía,J.; Rodriguez-Garcia,M; Carrillo-López,N.; Naves Diaz,M.L.; Diaz-Lopez,J.B.** 2006, J Am Soc Nephrol, Vol. 17, pp. S267-S273.

44. *Vascular calcification: a stiff chalange for the nephrologist. Does preventing bone disease cause arterial disease?* **Goldsmith,D.; Ritz,E.; Covic,A.** 2004, Kidney Int, Vol. 66, pp. 1315-1333.

45. *Reversal of the adynamic bone disorder and decreased vascular calcification in chronic kidney disease by sevelamer carbonate therapy.* **Mathew,S.; Lund,R.J.;**

- Strebeck,F.; Tustison,K.S.; Geurs,T.; Hruska,K.A.** 2007, J Am Soc Nephrol, Vol. 18, pp. 122-130.
46. *Increased incidence of hip fractures in dialysis patients with low serum parathyroid hormone.* **Coco,M.; Rush,H.** 2000, Am J Kidney Dis, Vol. 36, pp. 1115-1121.
47. *Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis.* **Block,G.A.; Klassen,P.S.; Lazarus,M.; Ofsthun,N.; Lowrie,E.G.; Chertow,G.M.** 2004, J Am Soc Nephrol, Vol. 15, pp. 2008-2018.
48. *Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who are undergoing dialysis.* **Goodman,W.G.; Goldin,J.; Kuizon,B.D.; Yoon,G.; Gales,B.; Sider,D.; et,al.** 2000, N Engl J Med, Vol. 342, pp. 1472-1483.
49. *Aplastic osteodystrophy without aluminum: the role of suppressed parathyroid function.* **Hercz,G.; Pey,Y.; Greenwood,C.; Manuel,A.; Saiphoo,C.; Goodman,W.G.; et,al.** 1993, Kidney Int, Vol. 44, pp. 860-866.
50. *Arterial Calcifications and Bone Histomorphometry in End-Stage Renal Disease.* **London,G.M.; Marty,C.; Marchais,S.J.; Guérin,A.P.; Metivier,F.; Vernejoul,M-C.** 2004, J Am Soc Nephrol, Vol. 15, pp. 1943-1951.
51. *The link between bone and coronary calcifications in CKD-5 patients on haemodialysis.* **Asci,G.; Ok,E.; Savas,R.; Ozkahya,M.; Duman,S.; Toz,H.; Kayikcioglu,M.; Branscum,A.J.; Monier-Faugere,M-C.; Herberth,J.; Malluche,H.H.** 3, 2011, Nephrol Dial Transplant, Vol. 26, pp. 1010-1015.
52. *Development of renal bone disease.* **Ferreira, A.** 2006, Eur J Clin Invest, Vol. 36, pp. 2-12.
53. *Adynamic bone disease in non dialysed uremic patients: a new type of osteopathy due to over treatment?* **Cohen-Solal,M.E.; Sebert,j.L.; Boudailliez,B.; et,al.** 1992, Bone, Vol. 13, pp. 1-5.
54. *Relationships between histomorphometric features of bone formation and bone cell characteristics in vitro in renal osteodystrophy.* **Marie,J.P.; Abderrahim,L.; de Vernejoul,M.C.; Morieux,C.; Graulet,A-M.; Guéris,J.; Llach,F.** 1989, J Clin Endocrinol Metab, Vol. 69, pp. 1166-1173.
55. *Bone histomorphometry in hemodialysed patients.* **de Vernejoul,M.C.; Kuntz,D.; Miravet,L.; Gueris,J.; Bielakoff,J.; Ryckewaert,A.** 1981, Metab Bone Dis Relat Res, Vol. 3, pp. 175-179.
56. *Development of adynamic bone in patients with secondary hyperparathyroidism after intermittent calcitriol therapy.* **Goodman,W.G.; Ramirez,J.A.; Belin,T.R.; Chon,Y.; Gales,B.; Segre,G.V.; Salusky,I.B.** [ed.] 1166. 1994, Kidney Int, Vol. 46, p. 1160.

57. *Reversal of adynamic bone disease by lowering of dialysate calcium.* **Harris,A; Sherrard,D.J.; Hercz,G.** 5, 2006, *Kidney Int*, Vol. 70, pp. 931-937.
58. *Histological, radiological and biochemical features of the adynamic bone lesions in continous ambulatory peritoneal dialysis patients.* **Hutchison,A.J.; Whitehouse,R.W.; Freemont,A.J; Adams,J.E.; Mawer,E.B.; Gokal,R.** *Am J Nephrol*, Vol. 14, pp. 19-29.
59. *Inverse correlation between serum magnesium and parathyroid hormone in peritoneal dialysis patients: a contributing factor to adynamic bone diasease?* **Wei,M.; Esbaei,K.; Bargman,J.M.; Oreopoulos,D.G.** 2006, *INT Urol Nephrol*, Vol. 38, pp. 317-322.
60. *Risk of adynamic bone disease in dialysed patients.* **Malluche,H.; Faugere,M.C.** 1992, *Kidney Int*, Vol. 42, pp. S62-S67.
61. *Suppressive effect of calcium on parathyroid hormone release in adynamic renal osteodystrophy and secondary hyperparathyroidism.* **Goodman,W.G.; Veldhuis,J.D.; Belin,T.R.; Juppner,H.; Salusky,I.B.** 1997, *Kidney Int*, Vol. 51, pp. 1590-1595.
62. *Histologic evolution of bone disease 6 months after successful kidney transplantation.* **Cruz,E.A.S.; Lugon,J.R.; Jorgetti,V.; Draibe,S.A; Carvalho,A.B.** 4, 2004, *Am J Didney Dis*, Vol. 44, pp. 747-756.
63. *Use of desferrioxamine "microdose" to chelate aluminum in hemodialysis patients.* **Jorge,C.; Gil,C.; Possante,M.; Catarino,M.C.; Cruz,A; Andrade,R.; Teixeira,R.; Santos,N.; Ferreira,A.** 1999, *Clin Nephrol*, Vol. 5, pp. 335-336.
64. *Evaluation of bone remodeling in hemodialysis patients: serum biochemistry, circulating cytokines and bone histomorphometry.* **Ferreira,A.; Saraiva,M.; Behets,G.; Macedo,A.; Galvão,M.; D'Haese,P.; Drüeke,T.B.** 6, 2009, *J Nephrol*, Vol. 22, pp. 783-793.
65. *Role of advanced glycation end products in adynamic bone disease in patients with diabetic nephropathy.* **Yamamoto,T.; Ozono,K.; Miyauchi,A.; Kasayama,S.; Kojima,Y.; Shima,M.; Okada,S.** 1, 2001, *Am J Kidney Dis*, Vol. 38, pp. S161-S164.
66. *Histologic evolution of bone disease 6 months after successful kidney transplantation.* **Cruz,E.A.S.; Lugon,J.R.; Jorgetti,V.; Draibe,S.A; Carvalho,A.B.** 4, 2004, *Am J Kidney Dis*, Vol. 44, pp. 747-756.
67. *Posttransplant bone disease.* **Rix,M; Lewin,E.; Olgaard,K.** 4, 2003, *Transplant Rev*, Vol. 17, pp. 176-186.
68. *Impact of lowering dialysate calcium concentration on serum bone turnover markers in hemodialysis patients.* **Hamano,T.; Oseto,S.; Fujii,N; Ito,T.; Katayama,M.; Horio,M.; Hori,M.** 2005, *Bone*, Vol. 36, pp. 909-916.

69. *Prathormone secretion in peritoneal dialysis patients with adynamic bone disease.* **Sánchez,M.C.; Bajo,M.A.; Selgas,R.; Mate,A.; Millán,I.; Martínez,E.; López-Barea,F.** 5, 2000, Am J Kidney Dis, Vol. 36, pp. 953-961.
70. *Mineral metabolism and renal bone disease: effects of CAPD versus hemodialysis.* **Coburn,J.W.** 1993, Kidney Int, Vol. 40, pp. S92-S100.
71. *Association of relatively low serum parathyroid hormone with malnutrition-inflammation complex and survival in maintenance hemodialysis patients.* **Dukkipati,R.; Kovesdy,C.P.; Colman,S.; et.al.** 4, 2010, J Ren Nutr, Vol. 20, pp. 243-254.
72. *Relationship between serum beta-2 microglobulin, bone histology, and dialysis membranes in uraemic patients.* **Ferreira,A.; Ureña,P.; Ang,K.S.; Simon,P.; Morieux,C.; Souberbielle,J-C.; Vernejoul,M-C.; Drüeke,T.B.** 9, 1995, Nephrol Dial Transplant, Vol. 10, pp. 1701-1707.
73. *Potential role of cytokines in renal osteodystrophy.* **Ferreira,A.; Simon,P.; Drüeke,T.; Descamps-Latscha,B.** 1996, Nephrol Dial Transplant, Vol. 11, pp. 399-400.
74. *Effect of type of dialysis membrane on bone in haemodialysis patients.* **Ferreira,A.; Ghazali,A.; Galvão,J.; Souberbielle,J-C.; Jehle,P.M.; Mohan,S.; Descamps-Latscha,B.; Oprisiu,R.; Fournier,A.; Drüeke,T.B.** 2001, Nephrol Dial Transplant, Vol. 16, pp. 1230-1238.
75. *On-line hemodiafiltration decreases the serum levels of TNF alfa in dialyzed patients.* **Gil,C.; Lucas,C.; Possante,C.; Jorge,C.; Gomes,F.; Candeias,M.; Lages,H.; Arranhado,E.; Ferreira,A.** 2003, Nephrol Dial Transplant, Vol. 18, pp. 447-448.
76. *Parathyroid hormone-independent osteoclastic resorptive bone disease: a new variant of adynamic bone disease in haemodialysis patients.* **Gal-Moscovici,A.; Popovtzer,M.M.** 2002, Nephrol Dial Transplant, Vol. 17, pp. 620-624.
77. *Variant of adynamic bone disease in hemodialysis patients: fact or fiction?* **Rocha,A.L.; Higa,A.; Barreto,F.C.; dos Reis,L.M.; Jorgetti,V.; Draibe,S.A.; Carvalho,A.B.** 3, 2006, Am J Kidney Dis, Vol. 48, pp. 430-436.
78. *How to diagnose the different forms of renal osteodystrophy: Role of biochemical markers.* **Ferreira,A.; Drüeke,T.B.** 2000, Am J Med Sci, Vol. 320, pp. 85-89.
79. *Bone aluminum in haemodialysed patients and in rats injected with aluminum chlorid: relationship to impaired bone mineralisation.* **Ellis,H.A.; McCarthy,J.H.; Herrington,J.** 1979, J Clin Pathol, Vol. 32, pp. 832-844.
80. *Mineral Metabolism in chronic renal failure with special reference to serum concentrations of 1,25 (OH)₂D and 24,25 (OH)₂D.* **Christiansen,C.;**

Christiansen,M.S.; Melsen,F.; Robdro,P.; DeLuca,H.F.; et,al. 1981, Clin Nephrol, Vol. 15, pp. 18-20.

81. *Epidemiology of Renal Osteodystrophy in Iberoamerica.* **Diaz-Lopez,J.B.; Jorgetti,V.; Caorsi,H.; Ferreira,A.; Alfonso,P.; Menendez,P.; et,al.** 1998, Nephrol Dial Transplant, Vol. 13, pp. 41-45.

82. *Cloning and characterization of FGF-23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia.* **Shimada,T.; Mizutani,S.; Muto,T.; et,al.** 2001, Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 98, pp. 6500-6505.

83. *Vitamin D deficiency.* **Holick,M.F.** 2007, N Eng J Med, Vol. 357, pp. 266-281.

84. *Vitamin D status of chronic kidney disease patients living in a sunny country.* **Cuppari,L.; Carvalho,A.B.; Draibe,S.A.** 5, 2008, J Ren Nutr, Vol. 18, pp. 408-414.

85. *The renal osteodystrophy pattern in Brazil and Uruguay: an overview.* **Araujo,S.M.; Ambrosoni,P.; Lobao,R.R.; et,al.** 2003, Kidney Int, Vol. 85, pp. S54-S56.

86. *Definition, evaluation and classification of renal osteodystrophy: A position statement from Kidney Disease: Improving General Outcome (KDIGO).* **Moe,S.M.; Drüeke,T.; Cunningham,J.; Goodman,W.G.; Martin,K.; Olgaard,K.; Ott,S.; Sprague,S.; Lameire,N.; Eknoyan,G.** 2006, Kidney Int, Vol. 69, pp. 1945-1953.

87. *Influence of uremia and hemodialysis on circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha.* **Herbelin,A.; Nguyen,A.T.; Zingraff,J.; Ureña,P.; Descamps-Latscha,B.** 1990, Kidney Int, Vol. 37, pp. 116-125.

88. *Elevated circulating levels of interleukin-6 in patients with chronic renal failure.* **Herbelin,A.; Ureña,P.; Nguyen,A.T.** 1991, Kidney Int, Vol. 39, pp. 954-960.

89. *Cytokines:agents provocateurs in hemodialysis?* **Dinarelo,C.A.** 1992, Kidney Int, Vol. 41, pp. 683-694.

90. *Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function.* **Minkin, C.** 1982, Calcif Tissue Int, Vol. 34, pp. 285-290.

91. *Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase.* **Halleen,J.M.;Räisänen,S.;Salo,J.J.;Reddy,S.V.;Roodman,G.D.;Hentunen,T.A.;Lehenkari,P.P.;Kaija,H.;Vihko,P.;Väänänen,H.K.;** 33, 1999, J Biol Chem, Vol. 274, pp. 22907-22910.

92. *Irreversible inactivation of purple acid phosphatase by hydrogen peroxide and ascorbate.* **Beck, J.L.; Durack, M.C.; Hamilton, S.E.; De Jersey, J.** 1999, J Inorg Biochem, Vol. 73, pp. 245-252.

93. *How the osteoclast degrades bone.* **Blair,H.C.;** 1998, BioEssays, Vol. 20, pp. 837-846.
94. *Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase.* **Ek-Rylander, B.; Flores, M.; Wendel, M.; Heinegard, D.; Andersson, G.** 21, 1994, J Biol Chem, Vol. 269, pp. 14853-14856.
95. *Histochemical identification of osteoclasts in undecalcified sections of human bone.* **Evans,R.A.; Dunstan,C.R.; Baylink,D.J.** 1979, Miner Electrolyte Metab, Vol. 2, pp. 179-185.
96. *Quantitative bone histology: a new method.* **Dunstan,C.R.; Evans,R.A.** 1980, Pathology, Vol. 12, pp. 255-264.
97. *Detection and distribution of aluminium in bone.* **Kaye,M.; Hodsman,A.B.; Malynowsky,L.** 1984, J Clin Pathol, Vol. 37, pp. 136-142.
98. *Bone aluminum and hystomorphometric features of renal osteodistrophy.* **Hodsman,A.B.; Sherrard,D.J.; Alfrey,A.C.; Off,S.; Brickman,A.S.; Miller,N.L.; et,al.** 1982, J Clin Endocrinol Met, Vol. 54, pp. 539-546.
99. *Assessment of the aluminum overload and its possible toxicity in asymptomatic uremic patients.* **Sebert,j.L.; Marié,A.; Guéris,J.** 1985, Bone, Vol. 6, pp. 373-375.
100. *Stainable aluminum and not aluminum content reflect histological changes in bone of dialysed patients.* **Faugere, M-C e Malluche, H.** 1986, Kidney Int, Vol. 30, pp. 717-722.
101. *Staining of bone for aluminium: use of acid solochrome azurine.* **Kaye,M.; Hodsman,A.B.; Malynowsky,L.** 1990, Kidney Int, Vol. 37, pp. 1142-1147.
102. *Epidemiology of renal osteodystrophy in Iberoamerica.* **López,J.B.D.; Jorgetti,V.; Caorsi,H.; Ferreira,A.; Palma,A.; Menendez,P.; Olaizola,I.; Ribeiro,S.; Jarava,C.; Moreira,E.; Cannata-Andía,J.** 1998, Nephrol Dial Transplant, Vol. 13, pp. 41-45.
103. *Effects of iron overload on bone disease in uremic rats.* **Ittel TH, Kieffer S, Lege B, Sieberth HG.** 1994, J Bone Miner Res, Vol. 9, p. 228 (abstract).
104. *Adynamic bone lesion in renal transplant recipients with normal renal function.* **F. Velasquez-Forero, A. Mondragon and B. Herrero et al., .** 3, 1996, Nephrol Dial Transplant, Vol. 11, pp. 58-64.
105. *Pathogenesis and prevention of bone loss in patients who have kidney disease and receive long-term immunosuppression.* **Cunningham,J.** 2007, J Am Soc Nephrol, Vol. 18, pp. 223-234.
106. *Bone disease after renal transplantation.* **Kunzendorf,U; Bernhard,K.K.; Wolfgang,A.; et,al.** [ed.] 458. 2008, Nephrol Dial Transplant, Vol. 23, p. 450.

107. *Evidence for a PTH-independent humoral mechanism in post-transplant hypophosphatemia and phosphaturia.* **Green,J.; Debby,H.; Lederer,E.; et,al.** 2001, *Kidney Int*, Vol. 60, pp. 1182-1196.
108. *Natural history of parathyroid function and calcium metabolism after kidney transplantation: a single-centre study.* **Evenepoel,P.; Claes,K.; Kuypers,D.; et,al.** 2004, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 19, pp. 1281-1287.
109. *Osseous complications of renal transplantation.* **Butterly,D.W.; Quarles,D.;** . 4, 1996, *Seminars Dial*, Vol. 9, pp. 353-359.
110. *Post-transplant hypophosphatemia: tertiary "hyper phosphatoninism"?* **Bhan,I.; Shah,A.; Holmes,J.; Isakova,T.; Gutierrez,O.; Burnnet,S-A.; Juppner,H.; Wolf,M.** 2006, *Kidney Int*, Vol. 70, pp. 1486-1494.
111. *Serum levels of 1,25-dihydroxyvitamin D after renal transplantation.* **Riancho,J.A.; De Francisco,A.L; del Arco,C.; et,al.** 1988, *Miner Electrolyte Metab*, Vol. 14, pp. 332-337.
112. *1,25 dihydroxyvitamin D3 modifies cyclosporin-induced bone loss.* **Epstein,S.; Schlosberg,M.; Fallon,M.; et,al.** 1990, *Calcif Tissue Int*, Vol. 47, pp. 152-157.
113. *Post-transplant bone disease: the role of immunosuppressive agents and the skeleton.* **Epstein,S.** 1996, *J Bone Miner Res*, Vol. 11, pp. 1-7.
114. *Calcineurin regulates bone formation by the osteoblast.* **Sun,L.; Blair,H.C.; Peng,Y.; Zaidi,N.; et,al.** 2005, *Proc Natl Acad Sci USA* , Vol. 102, pp. 17130-17135.
115. *Bone remodelling after renal transplantation.* **Bonomini,V.; Felleli,C.; DiFelice,A.; et,al.** 1984, *Adv Exp Med Biol*, Vol. 178, pp. 207-216.
116. *Cyclosporin bone remodeling effect prevent steroid osteopenia after kidney transplantation.* **Westeel,P.F.; Mazouz,H.; Ezaitouni,F.; Hottelart,C.; Ivan,C.; Fardellone,P.; Brazier,M.; Esper,I.E.; Petit,J.; Achard,J.M.; Pruna,A.; Fournier,A.** 2000, *Kidney Int*, Vol. 58, pp. 1788-1796.
117. *Use of corticosteroids in nephrology - risk and prevention of osteoporosis induction.* **Jehle,P.M.; Jehle,D.R.** 2000, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 15, pp. 565-568.
118. *Expression of osteoclast differentiation factor and osteoclastogenesis inhibitory factor in rat osteoporosis induced by immunosuppressant FK506.* **Fukunaga,J.; Yamaai,T; Yamachiaka,E.; et,al.** 2004, *Bone*, Vol. 34, pp. 425-431.
119. *High prevalence of low bone turnover and occurrence of osteomalacia after kidney transplantation.* **Monier-Faugere,M-C.; Mawad,H.; Qi,Q.; Friedler,R.; Malluche,H.H.** 2000, *J Am Soc Nephrol*, Vol. 11, pp. 1093-1099.

120. *Renal Osteodystrophy After Successful Renal Transplantation: A Histomorphometric Analysis in 57 Patients*. **G. Lehmann, a, U. Otta, G. Steina, T. Steinera and G. Wolfa.** 10, 2007, *Transplant Proc*, Vol. 39, pp. 3153-3158.
121. *What are the bone lesions in patients with more than four years of a functioning renal transplant?* **Carlini RG, Rojas E, Arminio A, Weisinger JR, Bellorin-Font E.** 1998, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 13 [Suppl 3], pp. 103-104.
122. *Low-turnover bone disease in hypercalcemic hyperparathyroidism after kidney transplantation.* **Borchhardt,K.; Sulzbacher,I.; Benesch,T.; Födinger,M.; Sunder-Plassmann,G.; Haas,M.** 11, 2007, Vol. 7, pp. 2515-2521.
123. *The pathogenesis of osteodystrophy after renal transplantation as detected by early alterations in bone remodeling.* **Rojas,E.; Carlini,R.G.; Clesca,P.; Arminio,A.; Suniaga,O; De,E.K.; Weisinger,J.R.; Hruska,K.A.; Bellorin-Font,E.** 5, 2003, *Kidney Int*, Vol. 63, pp. 1915-1923.
124. *Renal osteodystrophy: histologic evaluation after renal transplantation.* **Martins,L.; Queirós,J.; Ferreira,A.; Henriques,A.C.; Sarmiento,A.M.; Pereira,M.C.; Guimarães,S.** 2000, *Transplant Proc*, Vol. 32, pp. 2599-2601.
125. *Glucocorticoids and renal transplant osteonecrosis.* **Slatopolsky,E.; Martin,K.** 1984, *Adv Exp Med Biol*, Vol. 171, pp. 353-359.
126. *The decrease incidence of aseptic necrosis in renal transplant patients: a case control study.* **Parfrey,P.S.; Farge,D.; Parfrey,N.A.** 1986, *Transplantation*, Vol. 41, pp. 182-187.
127. *Total joint arthroplasty for steroid-induced osteonecrosis in cardiac patients.* **Isono,S.S.; Woolson,S.T.; Schurman,D.J.** 1987, *Clin Orthop*, Vol. 217, pp. 201-208.
128. *Avascular necrosis of bone: a common serious complication of allogenic bone marrow transplantation.* **Enright,H.; Haake,R.; Weisorf,D.** 1990, *Am J Med*, Vol. 89, pp. 733-738.
129. *Mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis.* **Canalis,E.** 2003, *Curr Opin Rheumatol*, Vol. 15, pp. 454-457.
130. *Glucocorticoid-induced osteoporosis.* **Weinstein,RS.** *Rev Endocr Metab Disord*, Vol. 2, pp. 65-73.
131. *Cyclosporin A and osteonecrosis of the femoral head.* **Landeman,J.; Renner,N.; Gacher,A.; et,al.** 1987, *J Bone Joint Surg*, Vol. 69, pp. 1226-1228.
132. *Cyclosporin A inhibits calcemic hormone-induced bone resorption in vitro.* **Stewart,P.J.; Green,O.C.; Stern,P.H.** 1986, *J Bone Miner res*, Vol. 1, pp. 285-291.

133. *Cyclosporin A in vivo produces severe osteopenia in the rat: effect of dose and duration of administration.* **Movsowitz,C; Epstein,S; Fallon,M; et,al.** 1988, *Endocrinology*, Vol. 123, pp. 2571-2577.
134. *Prevention of bone loss in renal transplant recipients: a prospective randomized trial of intravenous pamidronate.* **Coco,M; Glicklich,D; Faugere,M-C; Burris,L; Bogнар,I; Durkin,P; Tellis,V; Greenstein,S; Schechner,R; Figueroa,K; McDonough,P; Wang,G; Malluche,H.** 2003, *J Am Soc Nephrol*, Vol. 14, pp. 2669-2676.
135. *A multicenter study on the effects of lanthanum carbonate (Fosrenol) and calcium carbonate on renal bone disease in dialysis patients.* **D'Haese,P; Spasovski,G.B; Sikole,A; Hutchison,A; Freemont,T.J; Sulkova,S; Swanepoel,C; Pejanovic,C; Djukanovic,L; Coen,G; Sulowicz,W; Ferreira,A; Torres,A; Curic,S; Popovic,M; Dimkovic,N; De Broe,M.E.** 2003, *Kidney Int*, Vol. 85, pp. S73-S78.
136. *Sevelamer attenuates the progression of coronary and aortic calcifications in hemodialysis patients.* **Chertow,G.M; Burke,S.K; Raggi,P.** 2002, *Kidney Int*, Vol. 62, pp. 245-252.
137. *Effects of sevelamer and calcium on coronary artery calcification in patients new to hemodialysis.* **Block,G.A; Spiegel,D.M; Ehrlich,J; et,al.** 2005, *Kidney Int*, Vol. 68.
138. *Utilization of bone histomorphometry in renal osteodystrophy: demonstration of a new approach using data from a prospective study of lanthanum carbonate.* **Freemont,T; Malluche,H.H.** 2005, *Clin Nephrol*, Vol. 2, pp. 138-145.

5. Citoquinas / fatores de crescimento na osteodistrofia renal e efeitos da biocompatibilidade de membranas de hemodiálise na remodelação óssea

A PTH e o calcitriol são as duas principais hormonas moduladoras da remodelação óssea, atuando quer diretamente através dos recetores específicos, quer indiretamente mediante a intermediação de fatores locais (1).

A PTH atua nos osteoblastos estimulando a síntese de Fator de Crescimento Transformador-beta (TGF- β). Esta citoquina vai ser responsável pela estimulação autócrina dos próprios osteoblastos e pela estimulação dos fibroblastos do parênquima ósseo.

Este processo conduz ao aumento da síntese de matriz óssea e de fibrina intertrabecular (2). Simultaneamente, a PTH estimula a atividade dos osteoclastos (e, conseqüentemente, a reabsorção óssea) mediante o aumento da síntese de interleucina-6 (IL-6) e de interleucina-11 (IL-11).

Estas duas citoquinas estimulam a diferenciação de osteoclastos a partir de precursores hematopoiéticos da linhagem monocítica-macrofágica (3; 4).

A PTH participa, igualmente, com o FGF-23, num verdadeiro mecanismo endocrinológico de retro controlo negativo, no qual está diretamente envolvido o calcitriol, e para o qual são recrutados os osteoblastos e os osteócitos (5; 6).

Desde estádios iniciais da IRC, observa-se um aumento progressivo dos níveis circulantes de FGF-23 a par da redução da expressão do seu coreceptor Klotho (quer seja o componente tecidular quer a forma livre) (6; 7). A urémia constituiu um modelo fisiopatológico de deficiência crónica de Klotho, com agravamento progressivo à medida que se observa uma deterioração significativa da função renal.

Pelo contrário, o FGF-23 atua nas glândulas paratiróides, inibindo a síntese de PTH. Como foi elegantemente demonstrado pelo grupo de Silver e colaboradores, num modelo animal de IRC, a paratiroidectomia prévia preveniu o aumento de FGF-23 (8). Estes achados parecem apontar para um papel do hiperparatiroidismo no aumento dos níveis circulantes de FGF-23 observados na urémia.

O calcitriol estimula os monócitos a sintetizar colagenase e inibe a síntese de Fator de Crescimento Transformador-beta (TGF- β). Através destes dois processos inibe a produção de colagénio (9).

Os mecanismos de transmissão da informação e de regulação entre as células envolvidas no processo de remodelação óssea (nomeadamente os osteoblastos, os osteoclastos, os osteócitos e os respetivos precursores) ainda não estão completamente esclarecidos.

Por este motivo, a nossa investigação pretendeu evidenciar que, para além das hormonas sistémicas acima referidas, estes processos de remodelação óssea são também mediados por citocinas e fatores de crescimento (bem como pelos respetivos recetores e antagonistas), que atuam localmente de forma autócrina ou parácrina.

A beta-2-microglobulina tem sido igualmente apontada, por vários autores, como um polipeptídeo com efeitos relevantes na remodelação óssea, motivo pelo qual mereceu particular atenção na nossa linha de investigação.

Tendo em conta que as membranas de hemodiálise de diferente grau de biocompatibilidade e variável coeficiente de ultrafiltração (por exemplo dialisadores de cuprofano versus polissulfona ou poliacrilonitrilo) induzem diversas respostas inflamatórias, pretendemos investigar os efeitos de diferentes membranas de diálise na remodelação óssea.

Neste capítulo, a nossa hipótese de investigação pretendeu, pela primeira vez, correlacionar níveis circulantes de beta-2-microglobulina e de citocinas com os resultados de histomorfometria óssea, e

a) Tentar demonstrar o envolvimento da beta-2-microglobulina e de diversas citocinas / fatores de crescimento / respetivos recetores na remodelação óssea;

b) Evidenciar os possíveis efeitos de diferentes dialisadores (com variáveis graus de biocompatibilidade, ativação do complemento, adsorção e ultrafiltração) nos níveis séricos de citocinas / fatores de crescimento e respetivos recetores.

5.1. Beta-2-microglobulina, remodelação óssea e membranas de hemodiálise (manuscrito 14)

Há cerca de três décadas, foi identificada uma nova forma de amiloidose nos doentes com IRC, quer em fase pré-diálise quer quando sujeitos à utilização de prótese dialítica (10).

Este tipo de amiloidose, que se caracteriza pela deposição extracelular de fibrilhas com características amiloides, predominantemente nos tecidos articulares e peri articulares, associa-se a significativas lesões esqueléticas (11; 12).

Os depósitos nos tecidos do canal cárpico, nomeadamente nos tendões flexores, na sinovial e no ligamento transverso do carpo são responsáveis pelo desenvolvimento da "síndrome do canal cárpico", que se observava em mais de 60% dos doentes hemodialisados, por um período superior a 10 anos, quando eram utilizadas membranas de diálise de baixa permeabilidade (13; 14).

Geyjo e colaboradores descreveram a prevalência da “síndrome do canal cárpico” sintomático na sua população de hemodialisados. Estes autores, com base na avaliação histoquímica e no quadro clínico, documentaram a presença da síndrome do canal cárpico em mais de 50% dos doentes que estavam há mais de 20 anos em hemodiálise (15).

Depósitos de fibrilhas amiloides foram ainda identificados na sinovial, na cápsula articular, na epífise óssea justa-articular, nos discos intervertebrais e em quistos ósseos de doentes urémicos (16).

Para além da síndrome do canal cárpico, estes depósitos foram responsabilizados por graves lesões osteoarticulares observadas nos doentes hemodialisados, nomeadamente: artropatias dos membros (17), fraturas patológicas (associadas a erosões e quistos ósseos) (18), espondilartropatia destrutiva (19) e pseudo-tumores da junção crânio-cervical (20).

Continuam por esclarecer os motivos pelos quais os depósitos amiloides que caracterizam a amiloidose associada à diálise (AAD) se localizam, de forma quase exclusiva, nas articulações e tecido ósseo peri articular (21).

Embora os depósitos de substância amilóide possam, ocasionalmente, identificar-se em localização extra-articular (sobretudo nos doentes com longa sobrevivência em hemodiálise (22)), este achado é excecional, como o demonstram os estudos de Onishi et al., que apenas o descreveu em 1% de 400 biopsias ósseas efetuadas (23).

Há mais de duas décadas, dois grupos de investigadores demonstraram que a beta-2-microglobulina (β 2-M) é o principal componente proteico das fibrilhas amiloides, observadas na AAD (24) (25).

A β 2-M é um polipeptídeo de cadeia simples, não glicosilado, com um peso molecular de 11.810 Dalton. Este polipeptídeo é sintetizado e apresentado por todas as células que expressam, na sua superfície, moléculas da classe I do complexo de histocompatibilidade (26).

Após a filtração glomerular a β 2-M é completamente reabsorvida e catabolizada nos tubos renais.

A perda deste catabolismo tubular, que se observa na falência renal, leva à acumulação plasmática de β 2-M, que nesta situação pode atingir níveis 60 a 80 vezes acima do limite superior do normal (2-3 mg/L) (27).

Os hemodialisados com diurese residual mantida apresentam, em média, níveis plasmáticos de β 2-M inferiores aos doentes anúricos, o que indica que a variação plasmática de β 2-M é predominantemente condicionada pela função renal residual (27).

Os mecanismos que levam à formação de depósitos com características amiloides, constituídos predominantemente por β 2-M, nos doentes urémicos (e, em especial, nos sujeitos a longo período sob terapêutica dialítica), estão ainda incompletamente esclarecidos.

A acumulação crónica e crescente da β 2-M, ou dos seus precursores proteicos, parece constituir uma condição necessária, mas não suficiente, para a formação de depósitos de amiloide.

Embora tenha sido demonstrado, *in vitro*, que a β 2-M, em elevada concentração, pode polimerizar em fibras amiloides (28) e que se podem obter depósitos amilóides

após a injeção de β 2-M na articulação do joelho num modelo animal (29), pouco se sabe ainda, sobre os mecanismos da amiloidogénese.

Modificações da estrutura ou a fragmentação da cadeia peptídica da β 2-M foram identificadas em doentes hemodialisados e associadas à formação de depósitos amiloides. Linke et al. demonstraram a presença de β 2-M amputada, nos resíduos de lisina, em depósitos amiloides ósseos e em cálculos renais de hemodialisados (30).

Posteriormente, especial atenção foi dada à glicosilação da β 2-M, que induz a acidificação desta proteína e favorece a polimerização da mesma. Miyata e colaboradores demonstraram que a β 2-M dos depósitos amiloides da AAD está modificada, devido à glicosilação por produtos da reação de *Maillard* ("AGE-advanced glycation end products") (31).

Esta forma de β 2-M pode ser isolada, por eletroforese, no soro e na urina de doentes urémicos, mas não em indivíduos normais (31).

Autores do mesmo grupo de investigação demonstraram ainda que a AGE- β 2-M, (ao contrário da β 2-M intacta), aumenta a quimiotaxia e a quimioquímese dos monócitos humanos e estimula a secreção, *in vitro*, de TNF- α e de IL-1 β pelos macrófagos (32).

Mais recentemente, o mesmo efeito da AGE- β 2-M (ao contrário da beta-2-microglobulina não glicosada) foi demonstrado numa cultura de macrófagos obtidos a partir do líquido dialisante de doentes em diálise peritoneal: neste estudo de Rashid e colaboradores a beta-2-microglobulina glicosada induziu a secreção de TNF-alfa e de IL-1, pelos macrófagos peritoneais humanos, em cultura (33).

Estas citocinas possuem comprovados efeitos sobre a remodelação óssea, estimulando a reabsorção e a formação óssea (34; 35).

Diversos estudos *in vitro* evidenciaram um papel relevante da β 2-M na regulação da remodelação óssea, através de mediadores sistémicos e locais.

A β 2-M aumenta o número de recetores e a transcrição do gene do IGF-I (insulin growth factor-I), condicionando um efeito mitogénico nos osteoblastos em cultura (36). A adição de β 2-M a culturas de osteoblastos induziu a proliferação destas

células, embora não se tenha observado um aumento da secreção de fosfatase alcalina nem de osteocalcina (37).

Para além deste efeito autócrino na formação óssea (mediada pela estimulação osteoblástica) a β 2-M também aumenta a reabsorção óssea *in vitro*.

A incubação da *calvariae* de ratos recém-nascidos, com β 2-M humana purificada, induz uma libertação de cálcio, diretamente dependente da dose e do tempo de exposição (38).

A associação de calcitonina a estas culturas bloqueia a libertação de cálcio e de β -glucuronidase induzida pela β 2-M sugerindo a participação direta dos osteoclastos nesta activação da reabsorção óssea (39).

A pré-incubação das *calvariae* com anticorpos anti IL-1 β inibe a libertação de cálcio induzida pela β 2-M, indicando a participação da IL-1 β neste processo (39).

Estes resultados, que apontam para a existência de um efeito mitogénico direto da β 2-M sobre os osteoclastos em cultura, foram contestados por pelo menos um grupo de investigadores, que justificaram esta estimulação osteoblástica pela contaminação por citocinas (40).

Em concordância com os resultados dos estudos *in vitro* acima referidos, a administração de β 2-M no tecido celular subcutâneo da região occipital, em ratos recém-nascidos, associou-se ao aumento da reabsorção óssea activa (39).

Foram descritos níveis séricos aumentados de β 2-M em doentes com osteoporose pós-menopáusia, observando-se ainda, nestas doentes, uma correlação positiva entre os níveis séricos de β 2-M e os níveis séricos de fosfatase ácida resistente ao ácido tártrico (um marcador sérico da reabsorção óssea), bem como uma correlação negativa com o conteúdo ósseo mineralizado total (41).

De igual modo, alguns autores evidenciaram níveis elevados de β 2-M na doença de Paget (42), o que, no entanto, não foi encontrado por outro grupo de investigadores (43).

Tivemos a oportunidade de realizar um estudo retrospectivo, no qual avaliámos, em 56 doentes hemodialisados, as eventuais relações entre os níveis séricos de β 2-M e

diversos marcadores séricos do metabolismo ósseo (*vide* manuscrito 13 no final deste subcapítulo) (44).

Nesta investigação, procedemos à análise dos processos clínicos e protocolos dialíticos de todos os doentes dialisados no “Centre de Hemodialise de L’Hôpital Universitaire de Saint Briec”, que tinham sido sujeitos à realização de uma biopsia óssea, a pedido do nefrologista responsável por aquela unidade, Dr. Pierre Simon.

Tendo em conta que estas biopsias tinham merecido apenas uma avaliação qualitativa, sobre o grau de remodelação óssea, efetuámos a contagem histomorfométrica dos parâmetros estáticos e dinâmicos de todas as biopsias (de forma aleatória e sem conhecimento prévio dos dados epidemiológicos, clínicos ou laboratoriais dos doentes).

As contagens histomorfométricas foram ainda realizadas por um segundo observador independente (Caroline Morieux, do INSERM 349, Hôpital Lariboisière, Paris).

A partir do soro colhido entre 7 e 14 dias antes da biopsia óssea (e congelado a 20°C negativos), colaborámos com o Dr. Jean-Claude Souberbielle, (Director do laboratório de bioquímica do Hôpital Necker, Paris), na determinação dos níveis séricos de beta-2 microglobulina, de osteocalcina e da isoforma óssea da fosfatase alcalina por método radio isométrico.

No nosso laboratório do INSERM 90 (Hôpital Necker, Paris) determinámos, pela primeira vez, no soro de doentes urémicos, os níveis circulantes de piridinolina (como já descrevemos no capítulo 3). O doseamento deste marcador da reabsorção óssea foi efetuado com um imunoensaio enzimático competitivo que utiliza um anticorpo monoclonal de coelho contra a piridinolina livre (Metra Biosystems, Inc, USA) (45).

Efetuámos ainda a correlação entre os parâmetros histomorfométricos estáticos e dinâmicos das biopsias ósseas destes doentes, com os respetivos níveis séricos de β 2-M.

Neste estudo demonstrámos uma correlação positiva dos níveis séricos de β 2-M com os níveis séricos da osteocalcina, da isoenzima óssea da fosfatase alcalina

(marcadores da formação óssea) e com os níveis séricos da piridinolina (marcador bioquímico da reabsorção óssea).

Os níveis séricos de β 2-M correlacionaram-se ainda, de forma negativa, com o volume osteóide (matriz óssea não calcificada), o que está em concordância com estudos anteriores, em que foi demonstrada, *in vitro*, a indução da secreção de colagenase pelos fibroblastos da sinovial do coelho após estimulação com β 2-M (46).

A colagenase é a única enzima ativa em pH neutro com capacidade de degradação do colagénico e constitui um dos principais produtos de secreção dos fibroblastos ativados (47).

Nos nossos estudos tivemos ainda a possibilidade de investigar as relações entre os níveis séricos de β 2-M, o tipo de membrana de diálise utilizada (de forma permanente e continuada, durante mais de 18 meses, prévios à data da biopsia óssea) e os parâmetros histomorfométricos observados nas biopsias ósseas destes doentes hemodialisados (44; 48; 49).

Verificámos que os níveis séricos de β 2-M eram significativamente mais elevados nos doentes dialisados com membrana de cuprofano quando comparados com doentes dialisados com membranas sintéticas de elevada permeabilidade. Estes achados estão de acordo com resultados anteriores (*in vitro* e *in vivo*) igualmente realizados no laboratório do INSERM 90 (Serviço de Nefrologia do Hôpital Necker, Paris) sob a coordenação do Prof. Tilman Drüeke (50).

Para além de níveis mais elevados de β 2-M, os nossos doentes dialisados com membranas de cuprofano apresentavam um significativo aumento do número de osteoblastos, do número de osteoclastos e da superfície de reabsorção óssea ativa, quando comparados com os doentes sob hemodiálise com membranas sintéticas de elevada permeabilidade (sendo os níveis séricos de paratohormona intacta semelhantes nos dois grupos).

Estes resultados mostraram, pela primeira vez, os prováveis efeitos do tipo de membrana de diálise utilizada, sobre a remodelação óssea e as lesões de osteodistrofia renal.

Concluimos, das nossas investigações, que a hemodiálise com recurso a membranas celulósicas se associa a um aumento da ativação das células ósseas.

Os níveis séricos aumentados de β 2-M, observados nos doentes dialisados com membrana de cuprofano, poderão participar direta ou indiretamente na estimulação das células ósseas, por mecanismos endócrino, autócrino e/ou parácrino.

Em alternativa, os níveis elevados de β 2-M poderão constituir apenas mais um marcador da remodelação osteoarticular, tal como são um marcador de atividade nos doentes com a síndrome de imunodeficiência adquirida (51).

A beta-2-microglobulina tem sido reconhecida como um marcador, independente e relevante, da eficácia da diálise de “moléculas de médio peso molecular”, constituindo um indicador de diálise eficaz (52).

O efeito das diferentes membranas de diálise nos níveis séricos de beta-2-microglobulina explica-se, apenas parcialmente, pelos graus da permeabilidade de membrana e pelos coeficientes de ultrafiltração das médias moléculas.

Na verdade, resultados mais recentes, demonstraram a relevância da capacidade de adsorção de beta-2-microglobulina, observada em membranas de polissulfona (de alto fluxo e mais biocompatíveis que as membranas convencionais de celulose). A adsorção da beta-2-microglobulina à membrana de diálise constitui, por exemplo, um dos principais mecanismos de remoção desta proteína, quando se utilizam membranas de diálise de alto fluxo e elevada biocompatibilidade (53).

A adsorção de beta-2-microglobulina às membranas sintéticas de elevada permeabilidade depende da carga iónica da molécula e de importantes características da membrana, como a carga elétrica da superfície e da parede, a rugosidade e ainda a porosidade do gel (54).

Original Article

Relationship between serum β_2 -microglobulin, bone histology, and dialysis membranes in uraemic patients

A. Ferreira^{1,2}, P. Ureña¹, K. S. Ang³, P. Simon³, C. Morieux², J.-C. Souberbielle⁴, M.-C. de Vernejoul² and T. B. Drüeke¹

¹INSERM Unité 90 and Département de Néphrologie, Hôpital Necker-Enfants Malades; ²INSERM Unité 349, Hôpital Lariboisière; ³Service de Néphrologie, Centre Hospitalier de Saint-Brieuc, Saint-Brieuc; ⁴Laboratoire de Physiologie, CHU Necker, Paris, France

Abstract. *Background.* β_2 -Microglobulin (β_2 M) is the main constituent of osteoarticular amyloid deposits in haemodialysis patients. When dialysed with cellulosic (C) membrane such patients present a higher incidence of β_2 M-related amyloid arthropathy than with synthetic high-flux (SHF) membrane, and they have higher serum levels of β_2 M. This could favour β_2 M deposition as amyloid fibrils and/or modify bone and cartilage metabolism.

Methods. We examined 56 uraemic patients dialysed in the same centre for 7.5 ± 4.8 years (mean \pm SD). Based on bone histomorphometry criteria they were classified into either high-turnover bone disease (HTBD, 45 patients) or normal/low-turnover bone disease (N/LTBD, 11 patients). A subgroup of 30 patients had been dialysed with the same dialysis membrane for at least 18 months prior to study, 8 on C and 22 on SHF membrane.

Results. Serum intact parathyroid hormone levels were not different between the two patient subgroups. In contrast, serum β_2 M levels were higher in patients on C than on SHF membrane: 59.8 ± 14.1 versus 32.8 ± 8.7 mg/l, and so were serum total alkaline phosphatase and osteocalcin levels: 323 ± 167 versus 173 ± 50 IU/l, and 656 ± 395 versus 288 ± 263 ng/ml respectively. The increase of these serum markers of bone formation was associated with a higher bone cell number: osteoblast surface, 21.7 ± 5.1 versus $9.8 \pm 11\%$; osteoclast surface, 4.27 ± 1.86 versus $1.96 \pm 1.34\%$; and osteoclast number/mm², 2.85 ± 1.26 versus 1.27 ± 0.88 respectively. Serum β_2 M was positively correlated with serum osteocalcin ($r=0.58$, $P<0.001$), bone-specific alkaline phosphatase (bAP) ($r=0.46$, $P<0.008$), and free pyridinoline (PYD) ($r=0.62$, $P<0.002$), and negatively correlated, only for HTBD, with osteoid volume: $r=-0.40$, $P<0.006$. Serum β_2 M was higher in patients with HTBD than N/LTBD.

Conclusion. The bone metabolism of chronic haemo-

dialysis patients may be influenced by dialysis membrane biocompatibility. Moreover, the association of high serum β_2 M with increased bone cell number and serum markers of bone turnover suggests that β_2 M is either another marker of bone cell activity or an activator of bone cells.

Key words: β_2 -microglobulin; haemodialysis; secondary hyperparathyroidism; bone histomorphometry; dialysis membranes; biocompatibility

Introduction

Osteoarticular complications of long-term dialysis patients are frequently associated with amyloid deposits [1] which are mainly composed of β_2 -microglobulin (β_2 M), a polypeptide of a molecular weight of 11 810 Daltons. Since the catabolism of β_2 M takes place mainly in the kidney, a progressive increase in its serum level occurs with declining renal function, and very high levels are observed in anuric patients with end-stage renal failure [2,3].

The marked increase in serum β_2 M concentration is probably a necessary, even though not sufficient, condition for the deposition of β_2 M amyloid fibrils in osteoarticular tissues. *In vitro*, extremely elevated β_2 M concentrations induced the spontaneous polymerization of the polypeptide into amyloid fibrils [4], and *in vivo* β_2 M amyloid deposits could be obtained after the intra-articular injection of a concentrated β_2 M solution in animals [5]. However, the relevance of such extreme conditions for the human setting is questionable.

The mechanisms favouring β_2 M amyloid formation and deposition in dialysis patients are as yet poorly understood. On the one hand the increase in serum β_2 M could be either directly or indirectly associated with disturbances of bone and cartilage metabolism in chronically uraemic patients. Thus β_2 M has been found to exhibit a positive relation with bone resorption

Correspondence and offprint requests to: Tilman B. Drüeke MD, INSERM Unité 90, Département de Néphrologie, Hôpital Necker, 161 rue de Sévres, 75743 Paris, Cedex 15, France.

activity and a negative one with bone mineral content in patients with postmenopausal osteoporosis [6]. Several groups of investigators have provided experimental evidence for the induction by β_2M of osteoblast and osteoclast activity [7–10]. Secondary hyperparathyroidism in association with increased serum β_2M concentrations could enhance the action of β_2M on osteoarticular structures and favour the occurrence of β_2M amyloidosis [11,12]. On the other hand the serum level of β_2M could be simply a marker of skeletal and joint tissue turnover in health and disease, as it is marker for disease activity in AIDS [13].

A modification of β_2M structure could also be involved. Very recently a modified form of β_2M , namely advanced glycation end-product (AGE)- β_2M has been found in haemodialysis patients but not in healthy subjects. It has been shown to enhance chemotaxis and chemokinesis of human monocytes, to stimulate cytokine secretion by macrophages, and to increase collagenase release by synovial cells [14]. Finally, the type of the dialysis technique used is probably also involved. Chronic haemodialysis patients who have been exclusively dialysed with the synthetic, highly permeable AN69 polyacrylonitrile membrane had a lower incidence of β_2M -amyloid-related cystic bone lesions than when exclusively dialysed with cellulosic membrane [15]. Moreover, acute renal failure patients dialysed with the more biocompatible synthetic membrane had a better outcome in terms of morbidity and mortality than patients dialysed with cuprophane membrane [16].

The aim of the present study was to investigate possible relationships among the serum level of β_2M , the type of dialysis membrane used, and the type of renal bone disease observed in chronic haemodialysis patients.

Subjects and methods

Patients

Fifty-six uraemic patients, 24 females and 32 males, on maintenance haemodialysis were included into the present study after their informed consent. The mean (\pm SD) age of the patients was 56.3 ± 13.5 years. Mean duration of haemodialysis treatment was 7.4 ± 4.7 years. All the patients were treated by conventional bicarbonate haemodialysis 4–5 h three times a week. The type of haemodialysis membrane was unchanged for more than 18 months before bone biopsy in 22 patients dialysed with synthetic high-flux (SHF) membrane (18 patients with AN69 polyacrylonitrile and four patients with polysulphone PS 60 membrane) and in eight patients dialysed with standard cellulosic (C) dialysis membrane (Cuprophane). There were no significant differences between the 22 patients treated with SHF membrane and the eight patients treated with C membrane for the following: mean age, 62.2 ± 10.5 versus 56.8 ± 15.0 years; mean dialysis duration, 7.5 ± 3.8 versus 8.2 ± 3.0 years.

The underlying nephropathy types of the 56 patients were interstitial nephropathy 12, chronic glomerulonephritis 12, nephrosclerosis 7, polycystic kidney disease 6, diabetic nephropathy 2, multiple myeloma 1, and unknown 16, with

no evidence of a difference between the two latter groups. Only one patient of each of these two groups had histologically proven evidence of β_2M -associated amyloidosis. At the time of study most of the patients had received either calcitriol or phosphate-binding therapy for variable periods of time. There had been no systematic difference in treatment prescription attitude between the patients belonging to one or the other of the two groups. All patients were oligoanuric (≤ 200 ml/24 h). In seven high-turnover bone disease (HTBD) patients who underwent subtotal parathyroidectomy (subtotal PTX) after the bone biopsy we were able to obtain additional serum samples 2 weeks and 6 months after PTX. Serum levels of hepatic enzymes were within the limits of normal values in all patients.

Serum biochemistry

Predialysis blood sampling was performed after a 12-h fast, 1–2 weeks before the bone biopsy. Serum calcium was determined using atomic absorption spectrometry, serum phosphorus using a Technicon Auto Analyzer. Serum aluminium was determined using atomic absorption spectrometry with a graphite oven. Serum β_2M was measured using a commercial radioimmunoassay (Pharmacia Diagnostics, AB, Uppsala, Sweden); the range of expected normal values established in our laboratory was between 1.4 and 3.1 mg/l. Serum intact parathyroid hormone (iPTH) was measured using a commercial radioimmunoassay for intact human PTH 1–84 (Allegro Intact PTH, Nichols Institute, San Juan Capistrano, CA, USA). The range of normal values was between 10 and 65 pg/ml. Serum total alkaline phosphatases (alk. P'tases) were measured by an automated method (normal values 30–90 IU/l). Serum bone-specific alkaline phosphatase (bAP) was measured using a radioimmunoassay (Tandem-R, Ostase) developed by Hybritech Europe S.A., Belgium [17]. The mean \pm SD value obtained in normal adult individuals was 11.8 ± 4.3 ng/ml. Serum osteocalcin was measured using a radioimmunoassay from Cis Bio International, France (ELSA-OSTEO). This IRMA utilizes human osteocalcin as standards and two monoclonal antibodies recognizing the intact molecule (1–43). The range of normal values in adult individuals was between 13.3 and 48.0 ng/ml.

Serum free pyridinoline (PYD) was measured with a competitive enzyme immunoassay recently developed by Metra Biosystems, Inc., CA, USA [18]. This immunoassay uses a sensitive rabbit polyclonal antibody against free PYD and measures free PYD in the serum. Microtitre plates are coated with PYD antigen. Twenty-five microlitres of serum samples or PYD standards are added to each well of the microplate, followed by the addition of 125 μ l of anti-PYD antibody. The plate is then incubated overnight at 4 °C. After the unbound materials are washed off, alk. P'tase conjugated rabbit anti-IgG is added to the well and incubated at room temperature for 1 h. After washing the plate, p-nitrophenyl phosphate substrate is added and the colour developed at room temperature for 1 h. The absorbance at 405 nm wavelength is determined and the PYD concentration in the unknown sample is quantitated against a standard curve. The PYD antibody has a cross-reactivity of <3% with deoxypyridinoline or larger PYD peptides (>1000 Daltons). The intra-assay and interassay variations were <10 and 15% respectively. Mean \pm SD in normal individuals was 1.9 ± 0.4 nM [18].

Bone histomorphometry

Transiliac bone biopsies using the trephine of Bordier-Meunier with an internal diameter of 8 mm were obtained in all patients. In 34 patients the bone biopsy was performed after 600 mg dimethylchlorotetracycline/day, double labelling (2 days on, 10 days off, 2 days on). The bone specimens were fixed for 24 h in methanol, dehydrated, and embedded in methylmethacrylate. Undecalcified sections of 5 μ m thickness were made using a microtome (Model Jung K, Heidelberg, Germany) equipped with a tungsten carbide knife. Three non-consecutive sections were stained with toluidine blue and two with a specific histochemical stain for detection of aluminium in bone (aurin tricarboxylic acid method). Two unstained sections (7 μ m thick) were prepared for fluorescence microscopy. Each bone section was read twice, by two different persons, without knowledge of clinical or biochemical information on the patients. All sections were analysed quantitatively for static and dynamic parameters of bone formation and bone resorption. Histomorphometric measures were carried out using a semi-automatic image analyser (Biocom, France) coupled with a Leitz microscope. Approximately 50 different fields were analysed for the same bone biopsy. Normal bone histomorphometric values are from de Vernejoul *et al.* [19]. The following bone histomorphometric parameters, expressed according to the standardized nomenclature [20], were measured in trabecular bone: trabecular bone volume (BV/TV) expressed as the percentage of trabecular space; osteoid volume (OV/BV) expressed as the percentage of trabecular bone volume; osteoid surface (OS/BS) expressed as the percentage of trabecular bone surface; osteoblastic surface (Obl. S/BS) defined as the osteoid surface covered with plump osteoblasts and expressed as the percentage of trabecular bone surface; osteoid thickness (O. Th) expressed in micrometres; osteoclast surface (Ocl. S/BS) defined as the fraction of trabecular bone surface covered with osteoclasts; osteoclast number (Ocl. n) per mm^2 of tissue section; aluminium surface (Al S/BS) defined as the fraction of trabecular bone surface covered by aluminium. The bone dynamic parameters considered were: double labelled surface (d. Lab. S/BS) expressed as the fraction of trabecular bone surface; mineralizing surface (MS/BS) defined as the total extent of double-label plus half of the extent of single-label and expressed as the fraction of the bone surface; mineral appositional rate (MAR) expressed as $\mu\text{m}/\text{day}$; adjusted apposition rate (Aj. AR) ($\mu\text{m}/\text{day}$); and bone formation rate (BFR) ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$), calculated as mineralization apposition rate multiplied by total labelled surfaces.

Patients have been separated twice into two different groups, either according to the type of histologic bone disease ($n=56$) or according to the dialysis membrane which they had been using for the last 18 months ($n=30$). High-turnover bone disease (HTBD) was defined as a BFR higher than 2 SD of the normal value ($0.07 \pm 0.02 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$), and normal or low-turnover bone disease (N/LTBD) as a BFR lower than 2 SD of the upper normal limit. In the patients without dynamic bone parameters, HTBD was diagnosed as Obl. S/BS $\geq 6.0\%$, and Ocl. n ≥ 0.8 per mm^2 [19].

Statistical analysis

All results are expressed as the means \pm SD. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA), or unpaired Student's *t*-test as appropriate. The significance of the magnitude of correlation coefficients between biochem-

ical and bone histological parameters were assessed by linear regression analysis. Significance levels are indicated in Table and Figure legends.

Results

Serum biochemistry

Serum β_2 M levels were markedly elevated in all dialysis patients together ($39.3 \pm 15.4 \text{ mg/l}$), compared with normal values (between 1.4 and 3.1 mg/l). They were significantly higher in patients with HTBD than in patients with N/LTBD: 41.8 ± 16.1 versus $28.9 \pm 5.2 \text{ mg/l}$ (Table 1). Serum β_2 M levels were positively correlated with serum bAP ($r=0.46$, $P<0.008$), serum osteocalcin ($r=0.58$, $P<0.001$) and serum free PYD levels ($r=0.62$, $P<0.002$) (Figure 1), but not with serum iPTH or serum total alk. P'tase levels. In the seven patients with HTBD who subsequently underwent subtotal PTX mean serum β_2 M level increased from $38.1 \pm 7.0 \text{ mg/l}$ before PTX to $41.7 \pm 6.9 \text{ mg/l}$ ($P<0.002$) 2 weeks after PTX, but then decreased to $32.2 \pm 5.2 \text{ mg/l}$ at 6 months after PTX.

As expected, serum total alk. P'tases, bAP, and osteocalcin were significantly increased in dialysis patients: $273 \pm 199 \text{ IU/L}$, $36.4 \pm 32.8 \text{ ng/ml}$, and $360 \pm 335 \text{ ng/ml}$ respectively. Serum free PYD levels were also significantly higher in dialysis patients than in normal individuals: 54.3 ± 29.0 versus $1.9 \pm 0.4 \text{ nM}$ respectively.

Table 1 shows the comparison of serum biochemical parameters between patients with HTBD and patients with N/LTBD. No significant difference was observed in mean serum total calcium and aluminium concentration, but mean serum phosphorus level was higher in the former. Serum iPTH levels were eightfold higher in patients with HTBD than in those with N/LTBD. Serum free PYD and osteocalcin levels were also significantly higher, as were total alk. P'tases and bAP.

Table 2 shows the comparison of serum biochemical parameters between patients dialysed against C and those dialysed against SHF dialysis membrane. No significant difference was observed for the serum levels of total calcium, phosphorus and aluminium. In the presence of comparable serum iPTH levels, patients dialysed with C membrane had significantly higher serum β_2 M levels than patients dialysed with SHF dialysis membrane: 59.8 ± 14.1 versus $32.8 \pm 8.7 \text{ mg/L}$. Serum total alk. P'tases and osteocalcin levels were two-fold higher in patients on C membranes. Serum free PYD and bAP levels tended also to be higher in this group of patients, but the difference did not reach statistical significance, probably due to the small number of patients in this group.

Bone histomorphometry

The BFR in patients with HTBD was $0.39 \pm 0.48 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$, confirming the diagnosis of this form of bone disease, versus $0.04 \pm 0.06 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$ in patients with N/LTBD. HTBD

Table 1. Serum biochemical data

	Patients with high bone turnover	<i>n</i>	Patients with normal or low bone turnover	<i>n</i>	<i>P</i>
Total calcium (mM)	2.50 ± 0.22	(45)	2.36 ± 0.34	(11)	NS
Phosphorus (mM)	2.05 ± 0.54	(45)	1.49 ± 0.53	(11)	0.001
β ₂ -Microglobulin (mg/l)	41.8 ± 16.1	(45)	28.9 ± 5.2	(11)	0.0002
Intact PTH (pg/ml)	723 ± 459	(43)	94 ± 74	(10)	0.0001
Total alk. P'tases (IU/l)	317 ± 211	(22)	153 ± 94	(8)	0.04
bAP (ng/ml)	47.0 ± 33.1	(23)	9.4 ± 4.6	(9)	0.002
Osteocalcin (ng/ml)	473 ± 338	(20)	111 ± 147	(9)	0.005
Free PYD (nM)	62.4 ± 29.3	(23)	31.2 ± 10.2	(8)	0.006
Aluminium (μM)	1.45 ± 0.79	(36)	0.90 ± 0.71	(10)	NS

n = number of patients. Alk. P'tases, alkaline phosphatases; bAP, bone-specific alkaline phosphatase; free PYD, free pyridinoline. High bone turnover indicates a BFR > 2 SD of the normal value. Normal or low bone turnover indicates a BFR < 2 SD of the upper normal limit. Values are expressed as mean ± SD.

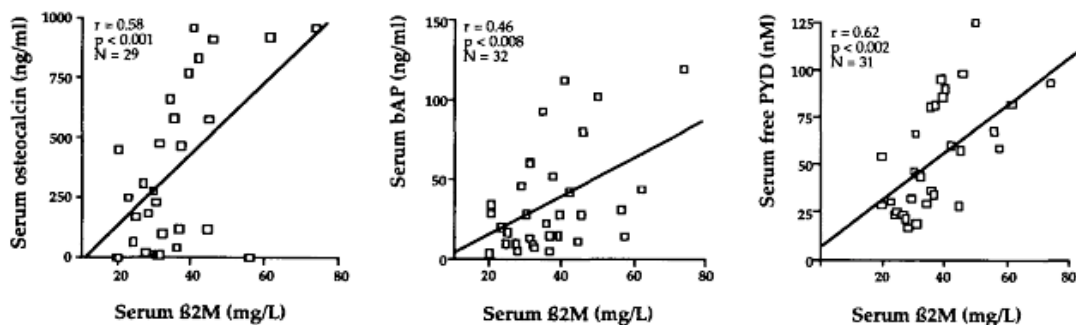


Fig. 1. Direct correlations of respectively serum osteocalcin, serum bone-specific alkaline phosphatase (bAP), and serum free pyridinoline (PYD) concentrations with serum β₂-microglobulin (β₂M).

Table 2. Serum biochemical data

	Patients on synthetic high-flux dialysis membrane (<i>n</i> = 22)	Patients on standard cellulose dialysis membrane (<i>n</i> = 8)	<i>P</i>
bAP (ng/ml)	30.7 ± 27.6	46.3 ± 37.2	NS
Osteocalcin (ng/ml)	288 ± 263	656 ± 395	0.01
Free PYD (nM)	49.5 ± 29.3	69.9 ± 14.6	NS
Aluminium (μM)	1.13 ± 0.65	1.73 ± 1.26	NS
Total calcium (mM)	2.55 ± 0.29	2.56 ± 0.28	NS
Phosphorus (mM)	2.00 ± 0.70	2.38 ± 0.12	NS
β ₂ -Microglobulin (mg/l)	32.8 ± 8.7	59.8 ± 14.1	0.001
Intact PTH (pg/ml)	702 ± 441	650 ± 480	NS
Total Alk P'tases (IU/l)	173 ± 50	323 ± 167	0.04

All patients have been dialysed with the same type of dialysis membrane for at least the last 18 months. Abbreviations as in Table 1. Values are expressed as mean ± SD.

patients had significantly higher osteoid volume (OV/BV) and osteoid surface (OS/BS). These patients also had a marked stimulation of bone resorption, as assessed by the increase in osteoclast number/mm² (2.29 ± 1.57 versus 0.40 ± 0.42) and in trabecular surfaces covered by active osteoclasts (3.68 ± 2.15 versus

0.84 ± 0.85%), without any significant perturbation of the bone mineralization process. In addition, close coupling between bone formation and bone resorption was observed in these patients, as illustrated by the strong correlation between osteoblast surface and osteoclast surface (*r* = 0.80; *P* < 0.0001). None of the patients presented histomorphometric evidence of osteomalacia. There was no significant difference in the percentage of bone surface stained by aluminium between the two groups.

As shown in Figure 2, serum β₂M levels were negatively correlated with osteoid volume (*r* = -0.40; *P* < 0.006, *n* = 45) in the group of HTBD patients. This was the only significant correlation found between serum β₂M levels and bone histomorphometric parameters measured in the whole group of haemodialysis patients.

Table 3 shows bone histomorphometric parameters of haemodialysis patients on SHF membrane or on standard C membrane. The number of activated bone cells was significantly higher in the patient group dialysed with C membrane than in the patient group dialysed with SHF membrane. Thus the former had a higher osteoblast surface (21.75 ± 5.18% versus 9.80 ± 11.03%), a higher osteoclastic surface (4.27 ± 1.86% versus 1.96 ± 1.34%) and a higher number of osteoclasts/mm² (2.85 ± 1.26 versus 1.27 ± 0.88)

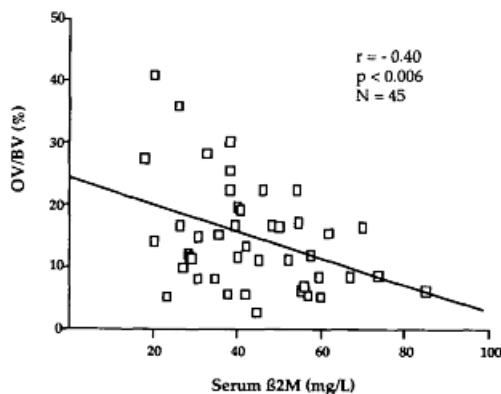


Fig. 2. Inverse relationship between serum β_2 -microglobulin (β_2 M) concentrations and osteoid volume (OV/BV, %) in the 45 haemodialysis patients with high-turnover bone disease (HTBD).

Table 3. Bone histomorphometric data

	Patients on synthetic high-flux dialysis membrane (n = 22)	Patients on standard cellulosic dialysis membrane (n = 8)	P
BV/TV (%)	16.46 ± 7.83	18.48 ± 7.66	NS
OV/BV (%)	9.39 ± 4.9	10.1 ± 3.61	NS
OS/BS (%)	44.99 ± 23.68	53.31 ± 6.18	NS
Obl. S/BS (%)	9.80 ± 11.03	21.75 ± 5.18	0.006
O. Th (µm)	9.48 ± 6.35	12.43 ± 4.38	NS
Ocl. S/BS (%)	1.96 ± 1.34	4.27 ± 1.86	0.0008
Ocl. n/mm ²	1.27 ± 0.88	2.85 ± 1.26	0.0006
Al S/BS (%)	19.39 ± 22.18	18.63 ± 30.78	NS
d. Lab. S/BS (%)	4.76 ± 2.65	7.25 ± 3.06	NS
MS/BS (%)	15.04 ± 7.63	23.38 ± 6.92	NS
MAR (µm/day)	1.23 ± 0.35	1.10 ± 0.11	NS
Aj. AR (µm/day)	0.36 ± 0.13	0.50 ± 0.20	NS
BFR (µm ³ /µm ² /day)	0.19 ± 0.12	0.26 ± 0.09	NS

All patients have been dialysed with the same type of dialysis membrane for at least the last 18 months. For abbreviations, see text in Subjects and Methods. Values are expressed as mean ± SD.

(Figure 3). Again, for comparable serum iPTH levels, the percentage of patients with histological evidence of severe osteitis fibrosa was significantly higher in patients dialysed with standard C dialysis membrane (75%, 6 of 8) than in patients on SHF dialysis membranes (36%, 8 of 22).

Discussion

The main findings of the present study were as follows. First, serum β_2 M levels were significantly higher in uraemic patients dialysed with standard C dialysis membrane than in patients dialysed with SHF membrane. Second, patients with histological HTBD had higher serum β_2 M levels than patients with N/LTBD.

Third, serum β_2 M levels were correlated with two serum markers of bone formation rate, namely osteocalcin and bAP, and with a specific serum marker of bone resorption, serum free PYD, but not with iPTH. Fourth, for similar serum levels of iPTH, patients dialysed with standard C membrane had significantly higher osteoblast and osteoclast cell numbers than patients dialysed with SHF membrane. Lastly, serum β_2 M levels were negatively correlated with osteoid volume in patients with HTBD.

The observation of higher serum β_2 M levels for at least 10 years in uraemic patients dialysed against standard C dialysis membrane than in those dialysed against HF membrane is in disagreement with a recent report [21], but confirms our previous findings [2,3]. The observed difference is due to high β_2 M binding to and clearance by the latter type of membrane [3], in contrast to standard C membrane, which is impermeable to β_2 M. In addition it is possible that the C membrane is capable of stimulating the production of β_2 M by peripheral blood mononucleated cells [22] and probably many other cell types, thereby contributing to the increase in β_2 M serum levels.

Our patients with histological HTBD had higher serum β_2 M levels than patients with N/LTBD. This is in accord with a previous report suggesting that osteitis fibrosa (HTBD) is associated with a greater generation of β_2 M than aplastic bone disease [12]. In addition we made the observation that patients dialysed with C membrane had higher serum total alk. P'tase and osteocalcin levels and higher numbers of bone forming and resorbing cells, and thus a greater prevalence of osteitis fibrosa than patients on SHF membrane, even though their plasma iPTH levels were comparable. This observation suggests that either β_2 M or some other factor related to the use of cellulosic membrane could act as an enhancer or an alternative inducer of the histological expression of secondary hyperparathyroidism. In keeping with a direct involvement of β_2 M, several *in-vitro* studies support the hypothesis that circulating or locally produced β_2 M may play a significant role in bone remodelling. The bone-derived growth factor primarily isolated from rat calvaria turned out to be homologous to β_2 M [7]. Furthermore β_2 M has been shown to be a mitogenic factor, since it induced osteoblast proliferation and enhanced both receptor number and gene transcription of insulin-like growth factor I in cultured osteoblastic cells [8,9]. In addition our study showed that serum β_2 M levels were positively correlated with serum bAP and osteocalcin, and that serum β_2 M increased shortly after PTX, like serum procollagen type I C-terminal peptide [23] and serum total alk. P'tases [24]. These results strengthen the view that β_2 M could be a direct or indirect modulator of bone turnover or alternatively another serum marker of osteoblastic cell activity.

In addition to its action on osteoblastic activity, β_2 M may also enhance bone resorption. The incubation of neonatal mouse calvariae with β_2 M induced a dose- and time-dependent efflux of calcium and release of β -glucuronidase and acid phosphatase [10], suggesting

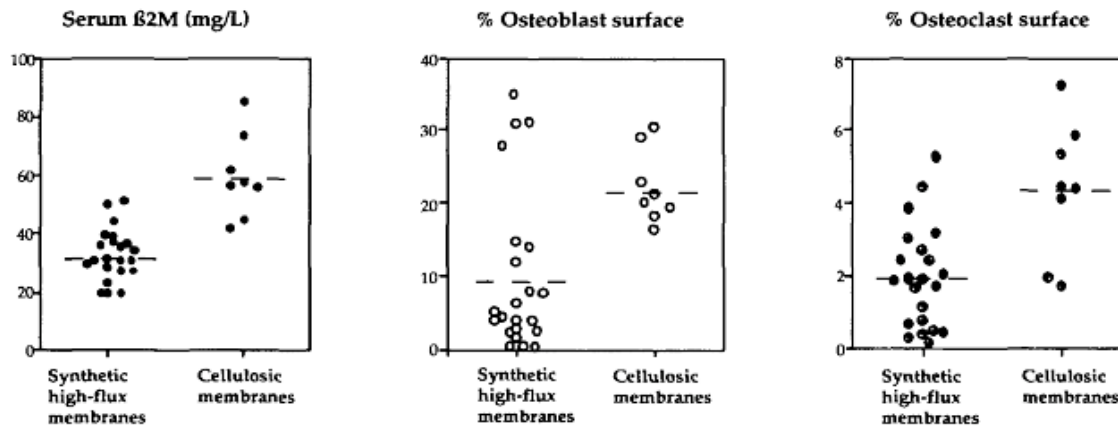


Fig. 3. Comparison of serum β_2 -microglobulin (β_2 M) concentrations, % osteoblast surface and % osteoclast surface of uraemic patients dialysed with either synthetic high-flux (SHF) membrane or standard cellulosic (C) membrane. Differences between the two patient subgroups were significant at $P < 0.001$ for β_2 M, $P < 0.006$ for % osteoblast surface and $P < 0.0008$ for % osteoclast surface.

that β_2 M is involved in osteoclast stimulation either directly or indirectly by inducing the secretion of stimulating factors by osteoblasts. As mentioned above, serum β_2 M levels were significantly increased and positively correlated with serum-tartrate-resistant acid phosphatase, and negatively with total-body bone mineral content in menopausal-related osteoporosis [6]. In the present study we found serum β_2 M levels to be positively correlated with a novel marker of bone resorption, namely serum free PYD [18]. The highest levels of serum β_2 M and free PYD were found in patients with the greatest numbers of osteoclast cells and in patients dialysed with C dialysis membrane. As serum free PYD is a specific marker of collagen type I breakdown [25], its high degree of correlation with serum β_2 M may reflect a stimulatory effect of β_2 M on bone matrix degradation.

Interestingly, serum β_2 M or β_2 M-like protein is capable of inducing the synthesis of fibroblast collagenase [26], and AGE-modified β_2 M has been shown to induce collagenase release by synovial cells [14]. In the present study serum β_2 M levels were found to be negatively correlated with osteoid volume in patients with HTBD. Thus, high serum β_2 M concentrations were associated with low values of this histological parameter of unmineralized bone. This could indicate either an increase of collagen degradation mediated by β_2 M-stimulated bone-cell collagenase, a decrease of bone matrix formation, or a promotion of bone matrix mineralization. The latter two hypotheses are, however, unlikely since β_2 M has not been shown to exert any role in bone matrix synthesis, and since β_2 M would rather induce a bone mineralization defect than promote mineralization [12].

The significant increase in the number of bone cells observed in our patients dialysed with standard C membrane, associated with an increase in serum levels of β_2 M, is a novel finding and suggests that the biocompatibility of dialysis membranes plays an

important role in the bone metabolism of such patients.

In addition to β_2 M, other factors could also be involved in this phenomenon including cytokines such as IL-1, IL-6, and TNF α , which have been found to be significantly increased in the serum of patients dialysed with C membrane [27,28]. IL-1 and TNF α are known to be direct stimulators of osteoblastic proliferation and secretion, and bone loss is associated with IL-1 and TNF α production in arthritic patients [27]. IL-6 is produced by osteoblast cells and its production is modulated by PTH, IL-1, and TNF α [29]. It possesses a bone-resorbing activity, probably by increasing the formation of mature osteoclasts from haematopoietic progenitors, and it can modulate the action of several calcitropic hormones (e.g. PTH and PGE $_2$) on bone [29]. Another possibility is the recently suggested role of AGE- β_2 M which is found in the serum and amyloid deposits of dialysis patients and which stimulates cytokine release by monocytes/macrophages and collagenase synthesis by cultured human synovial cells [14]. In case there were differences in circulating or local AGE- β_2 M levels between uraemic patients dialysed with C membrane and those dialysed with HF membrane, this might represent another mechanism involved in their osteoarticular pathology.

The lesser cytokine stimulating capacity and the higher cytokine and growth factor clearance of synthetic high-flux membranes could explain why our patient group dialysed with this type of membrane had lower bone-cell activities than the group dialysed with cellulosic membrane, despite comparable serum levels of iPTH. One could also speculate that the recently reported increase in the incidence of adynamic bone disease in dialysis patients in the absence of an aluminium overload [30] might be favoured by the growing use of synthetic high-flux dialysis membranes. However, this hypothesis is unlikely when considering the high prevalence of this bony complication in the

United States and Canada [30] where such membranes have not been commonly used during the last decade.

In conclusion, our study in dialysis patients points to a role of cellulosic membrane, compared with synthetic high-flux membrane, in the pathogenesis of high-turnover bone disease in haemodialysis patients, possibly through direct or indirect effects of excessively increased serum β_2 M levels.

Acknowledgements. This study was supported in part by a grant from Hospital Laboratories. At the time the study was performed Anibal Ferreira MD, was an exchange postdoctoral fellow supported by the Fundação Calouste Gulbenkian, and Pablo Ureña MD, was a recipient of a grant from the 'Société de Secours des Amis des Sciences'.

We thank Viola T. Kung MD and Metra Biosystems, Inc., CA, USA, for the measurement of serum free PYD.

References

- Drücke TB. Beta-2-microglobulin amyloidosis and renal bone disease. *Miner Electrolyte Metab* 1991; **17**: 261–272
- Simon P, Cavarle YY, Ang KS, Cam G, Catheline M. Long-term variations of serum beta-2-microglobulin levels in hemodialyzed uremics according to permeability and biocompatibility of dialysis membranes. *Blood Purif* 1988; **6**: 111–116
- Zingraff J, Beyne P, Ureña P *et al.* Influence of haemodialysis membranes on β_2 -microglobulin kinetics: *in-vivo* and *in-vitro* studies. *Nephrol Dial Transplant* 1988; **3**: 284–290
- Connors LH, Shirahama T, Skinner M, Fenves A, Cohen AS. In vitro formation of amyloid fibrils from intact β_2 -microglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; **131**: 1063–1068
- Ueda T. A histological study on the synovial tissue of the rat knee joints in the experimental beta-2-microglobulin derived amyloidosis. *Ryomachi* 1992; **32**: 308–317
- Rico H, Ripoll E, Revilla M, Relea P, Villa L. β_2 -Microglobulin in postmenopausal osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1993; **53**: 78–80
- Canalis E, McCarthy T, Centrella M. A bone-derived growth factor isolated from rat is β_2 -microglobulin. *Endocrinology* 1987; **121**: 1198–1200
- Centrella E, McCarthy T, Centrella M. β_2 -Microglobulin enhances insulin-like growth factor I receptor levels and synthesis in bone cell cultures. *J Biol Chem* 1989; **264**: 18268–18271
- Evans D, Thavarajah M, Kanis J. Immunoreactivity and proliferative actions of β_2 -microglobulin on human bone-derived cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; **175**: 795–803
- Moe S, Sprague S. β_2 -microglobulin induces calcium efflux from cultured neonatal mouse calvaria. *Am J Physiol* 1992; **263**: F540–F545
- McCarthy J, Dahlberg P, Kriegshauser J *et al.* Erosive spondylarthropathy in long-term dialysis patients: relationship with severe hyperparathyroidism. *Mayo Clin Proc* 1988; **63**: 446–452
- Onishi S, Andress DL, Maloney N, Coburn J, Sherrard D. Beta-2-microglobulin deposition in bone in chronic renal failure. *Kidney Int* 1991; **39**: 990–995
- Bhalla RB, Safai B, Pahwa S, Schwartz MK. Beta-2-microglobulin as a prognostic marker for development of AIDS. *Clin Chem* 1985; **31**: 1411–1412
- Miyata T, Inagi R, Iida Y *et al.* Involvement of β_2 -microglobulin modified with advanced glycation end products in the pathogenesis of hemodialysis-associated amyloidosis. Induction of human monocyte chemotaxis and macrophage secretion of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1. *J Clin Invest* 1994; **93**: 521–528
- van Ypersele de Strihou C, Jadoul M, Malghem L, Maldague B, Jamart J and the Working Party on Dialysis Amyloidosis. Effect of dialysis membrane and patients' age on signs of dialysis-related amyloidosis. *Kidney Int* 1991; **39**: 1012–1019
- Schiff H, Lang SM, König A *et al.* Biocompatible membranes in acute renal failure: prospective case-control study. *Lancet* 1994; **344**: 570–572
- Fishman WH. Alkaline phosphatases isoenzymes: recent progress. *Clin Biochem* 1990; **23**: 99–102
- Kung VT, Gomez B, Lungard R *et al.* An immunoassay for the measurement of free pyridinoline in serum: a marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 1993; **8**: S151
- de Vernejoul MC, Belenguer R, Halkidou H *et al.* Histomorphometric evidence of deleterious effect of aluminium on osteoblast. *Bone* 1985; **6**: 15–20
- Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH *et al.* Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. *J Bone Miner Res* 1987; **2**: 595–610
- Kabanda A, Jadoul M, Pochet JM *et al.* Determinants of the serum concentrations of low molecular weight proteins in patients on maintenance hemodialysis. *Kidney Int* 1994; **45**: 1689–1696
- Zaoui P, Stone W, Hakim R. Effects of dialysis membranes on beta-2-microglobulin production and cellular expression. *Kidney Int* 1990; **38**: 962–968
- Coen G, Mazzaferro S, DeAntoni E *et al.* Procollagen type I C-terminal extension peptide serum levels following parathyroidectomy in hyperparathyroid patients. *Am J Nephrol* 1994; **14**: 106–112
- Ureña P, Basile C, Grateau G *et al.* Short-term effects of parathyroidectomy on plasma biochemistry in chronic uremia. *Kidney Int* 1989; **36**: 120–126
- Eriksen EF, Charles P, Melsen F *et al.* Serum markers of type I collagen formation in degradation in metabolic bone disease: correlation with bone histomorphometry. *J Bone Miner Res* 1993; **8**: 127–132
- Brinckerhoff CE, Mitchell TI, Karmilowicz MJ, Kluge-Beckermann B, Benson MD. Autocrine induction of collagenase by serum amyloid A-like and β_2 -microglobulin-like proteins. *Science* 1989; **243**: 655–657
- Dinarelo C. Cytokines: agents provocateurs in hemodialysis? *Kidney Int* 1992; **41**: 683–694
- Herbelin A, Ureña P, Nguyen A, Zingraff J, Descamps-Latscha B. Elevated circulating levels of interleukin-6 in patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 1991; **39**: 954–960
- Green J, Schotland S, Sella Z, Kleeman C. Interleukin-6 attenuates agonist-mediated calcium mobilization in murine osteoblastic cells. *J Clin Invest* 1994; **93**: 2340–2350
- Hercz H, Pei Y, Greenwood C *et al.* Aplastic osteodystrophy without aluminum: the role of "suppressed" parathyroid function. *Kidney Int* 1993; **44**: 860–866

Received for republication: 22.12.94

Accepted in revised form: 27.2.95

5.2. Papel de citocinas na remodelação óssea (manuscrito 15)

Ao longo dos últimos anos, múltiplas investigações têm evidenciado que as modificações do metabolismo ósseo observadas nos doentes urémicos não podem ser explicadas apenas por anomalias do metabolismo da vitamina D, da paratormona e mesmo, mais recentemente, do eixo FGF-23 / Klotho / esclerostina (55; 56).

Apesar dos níveis séricos de paratormona continuarem a ser utilizados como marcadores bioquímicos da remodelação óssea nos doentes urémicos, a sua interpretação é frequentemente difícil e os resultados pouco reprodutíveis.

Como já referimos no capítulo 3, os níveis séricos de paratormona apresentam uma sensibilidade e especificidade reduzidas, no diagnóstico do tipo de lesão observada nas biopsias ósseas destes doentes, correlacionando-se simultaneamente com parâmetros histomorfométricos de formação e de reabsorção óssea.

Também os níveis séricos de FGF-23, sintetizado e libertado predominantemente pelos osteócitos, surgem muito aumentados, desde estádios iniciais da IRC (57; 58). No entanto, apesar destes níveis muito elevados terem sido associados a um compromisso da mineralização (frequentemente observado nos doentes urémicos), não foi possível estabelecer, até ao momento, alterações histomorfométricas ósseas dependentes da ação direta do FGF-23 (5).

Nos últimos anos, assistiu-se a um marcado desenvolvimento de técnicas de imunohistoquímica e biologia molecular aplicadas à osteodistrofia renal, as quais têm permitido aprofundar os conhecimentos sobre a complexa biologia da remodelação óssea nos doentes urémicos (2).

Tem vindo a ser evidenciado, por vários grupos de investigadores, que diversas citocinas e fatores de crescimento estão diretamente envolvidos na ativação dos osteoblastos, dos osteoclastos e no controlo do ciclo de remodelação óssea.

Estes mediadores locais de ativação celular, nomeadamente diferentes citocinas, fatores de crescimento, e os respetivos recetores e antagonistas são os responsáveis diretos pela ativação do ciclo de remodelação óssea (59).

Estas citocinas e fatores de crescimento funcionam como interlocutores das diversas populações celulares envolvidas na remodelação óssea, atuando de forma paracrina e/ou autócrina, sobre as células progenitoras localizadas na medula óssea, e sobre as células mais diferenciadas localizadas no tecido ósteo-cartilágneo (60).

As ações da interleucina-1 (IL-1) e do fator de necrose tumoral α (TNF- α) exercem-se sobre os osteoblastos em repouso, que cobrem a superfície trabecular (61).

Após a ativação osteoblástica e a síntese de tecido osteóide, os osteoblastos e as células do estroma da medula óssea vão participar na modulação da maturação dos pré-osteoclastos e na diferenciação destas células em osteoclastos maduros e ativados através da secreção de interleucina-6 (IL-6), interleucina-11 (IL-11), fator estimulador do granulócito-macrófago (GM-CSF) e do fator estimulador do macrófago (M-CSF) (62; 63).

Num modelo animal (de macaco fêmea) foi demonstrada a co-localização de IL-6 e de fosfatase alcalina na superfície trabecular coberta por osteoblastos ativados, suportando a hipótese de que estas células produzem IL-6 (64).

A IL-6 é igualmente sintetizada e libertada pelos osteoclastos maduros, indo atuar, de forma autócrina e parácrina, nos progenitores osteoclásticos, induzindo a sua própria maturação e amplificando o processo de reabsorção óssea (65).

A IL-11 é produzida por células do estroma fibrótico da medula óssea e pelos osteoblastos, promovendo a reabsorção óssea mediante a estimulação direta dos osteoclastos ou, de forma indireta, através dum mecanismo autócrino que induz aumento da síntese e libertação de IL-6 pelos próprios osteoblastos (66).

A fase de reabsorção óssea é modulada negativamente pelo cálcio, pela vitamina D, pela calcitonina, pelos estrogénios e pelo TGF- β , os quais vão inibir a ação dos osteoclastos e, direta ou indiretamente, promover a ativação dos osteoblastos.

Deste modo, estas células são mobilizadas para refazer o tecido ósseo, ao nível das lacunas de reabsorção, ficando concluído o ciclo de remodelação óssea (2; 67).

O TNF- α , produzido por células do estroma da medula óssea e pelos osteoblastos, promove a reabsorção óssea mediante a estimulação da síntese de M-CSF

pelos osteoblastos. O M-CSF atua sobre as células da linhagem osteoclástica, estimulando a diferenciação destas células em osteoclastos maduros (68; 69).

O TGF- β é um dos principais moduladores da remodelação óssea, devido ao seu efeito estimulador dos osteoblastos e dos fibroblastos da medula óssea, induzindo a síntese de colagénio tipo I, tipo III, tipo IV e ainda fibronectina e proteoglicans (70; 71; 72).

Foi igualmente identificada e caracterizada uma proteína solúvel que inibe a ativação osteoclástica *in vitro* e a reabsorção óssea *in vivo*, a qual foi designada de osteoprotegerina (OPG) (73).

A OPG é um membro da família de recetores do fator de necrose tumoral (TNF) que tem capacidade de inibir a osteoclastogénese, através da interrupção de mecanismos de ativação célula a célula.

A OPG inibe a osteoclastogénese *in vitro*, bloqueando os efeitos promotores da diferenciação e proliferação osteoclástica induzidos pelo calcitriol, pela PTH e pela interleucina 11 (74).

Quase simultaneamente com a caracterização da OPG, foi identificada outra proteína, designada de RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B), a qual participa nas complexas interações entre os osteoblastos e os osteoclastos: A RANKL é uma proteína de membrana expressa na superfície membranar dos osteoblastos, das células do estroma ativadas, dos linfócitos T ativados e dos fibroblastos sinoviais (74).

A RANKL tem ainda uma forma ativa, solúvel, que resultou da proteólise da proteína de membrana. Quer na sua forma membranar, quer na forma livre, a RANKL (uma proteína da família do TNF-“Tumor Necrosis Factor”) é uma citocina com um papel relevante na regulação da osteoclastogénese.

Os progenitores dos osteoclastos (pré-osteoclastos) expressam na sua superfície celular um recetor específico para a RANKL, o qual foi denominado RANK (receptor of nuclear factor kappa B).

Da ligação do RANKL ao seu recetor RANK resulta a diferenciação e ativação dos osteoclastos, a partir das suas células progenitoras, que exprimem este recetor na sua superfície (35).

Pelo contrário, a OPG pode interagir com o RANKL, como recetor solúvel, prevenindo a ligação do RANKL ao RANK. Nestas condições, a OPG inibe a ativação da osteoclastogénese que seria provocada pela ligação do RANKL ao seu recetor RANK.

O modelo animal (rato) com hiper expressão da OPG ou com deficiência em RANK, bloqueia a ativação osteoclástica (induzida por vários mediadores como TNF-alfa, e a “PTH related protein-PTHrP”) e conduz à osteopetrose (75).

Em situação oposta, a deleção do gene da OPG conduz ao aumento da reabsorção óssea e à osteoporose (76).

Diversas mutações do gene codificador do RANK foram igualmente descritas em famílias com hiperfosfatemia e lesões osteolíticas, mimetizando os achados no modelo animal (77).

Os diversos estímulos sistémicos (hormonais) e locais (citoquinas, factores de crescimento, recetores solúveis e respetivos antagonistas) da remodelação óssea poderão exercer as suas ações através deste eixo RANKL/RANK/OPG.

De acordo com este modelo, os fatores anabolizantes promoveriam a libertação de OPG e, pelo contrário, os estimuladores da reabsorção óssea promoveriam libertação de RANKL. Do equilíbrio entre RANKL e OPG resultaria a maior ou menor ativação e maturação osteoclástica.

Em concordância com esta hipótese está o facto de quase todas as citoquinas estimuladoras da reabsorção óssea aumentarem a expressão do ARN mensageiro do RANKL em culturas de osteoblastos (78; 79). No entanto, no caso da IL-6, foi documentado um efeito estimulador da atividade osteoclástica, independente do sistema RANKL/RANK/OPG (80).

O papel deste eixo RANKL/RANK/OPG foi evidenciado em doentes submetidos a corticoterapia ou hormonoterapia (estrogénios) (81; 82).

Nas crianças e adolescentes normais, os níveis séricos de OPG não variaram com o género, a idade nem o índice de massa corporal. Pelo contrário, na mesma população, os níveis séricos de RANKL foram significativamente mais elevados nas

crianças mais velhas, com maior índice de massa corporal e nas do género masculino (83).

Nos doentes com artrite reumatoide observa-se um aumento da reabsorção óssea mediada por osteoclastos ativados. A interleucina 27 (IL-27) bloqueia a osteoclastogénese, suprimindo a resposta da linhagem osteoclástica ao RANKL e reduzindo a expressão do NFATc1 (“nuclear factor of activated T cells c1”). Nas culturas de pré-osteoclastos provenientes de doentes com artrite reumatoide, este efeito protetor da IL-27 não foi encontrado, o que poderá justificar, pelo menos em parte, o aumento significativo da reabsorção óssea observada nesta patologia (84).

Em 39 doentes prevalentes em programa regular de hemodiálise, Coen e col. encontraram níveis séricos de OPG superiores ao normal, sendo estes significativamente mais elevados nos doentes que apresentavam doença óssea de elevada remodelação em comparação com os que tinham critérios de doença adinâmica, na biopsia óssea realizada (85).

Estes autores encontraram ainda uma correlação inversa entre a OPG e a iPTH. Os níveis séricos de OPG correlacionaram-se negativamente com parâmetros histomorfométricos de reabsorção óssea (superfície de erosão) e de formação óssea (superfície osteoblástica e taxa de formação óssea) (85).

Mais recentemente, foram descritos níveis aumentados de OPG em 99 doentes hemodialisados que apresentavam índices de calcificação da aorta mais elevados (avaliados por tomografia axial computadorizada). Observou-se ainda uma forte correlação positiva entre os níveis séricos de OPG e a idade dos hemodialisados (86).

Em 47 doentes hemodialisados, acompanhados por um período de 30 meses, níveis séricos mais elevados de OPG associaram-se a maior prevalência de calcificações coronárias. Durante o período de observação deste estudo, os doentes que morreram apresentavam níveis significativamente mais elevados de OPG (87).

Resultados sobreponíveis foram descritos numa população de 151 doentes hemodialisados japoneses, sem marcadores de inflamação e com albuminemia normal, nos quais níveis aumentados de OPG se associaram a aumento da velocidade de onda de pulso e a mortalidade global (88).

O significado destas associações é ainda incerto, mas parecem apontar para o envolvimento da OPG no processo de calcificações vasculares, provavelmente por favorecer o desenvolvimento de doença óssea adinâmica.

A favor desta hipótese estão os achados descritos por Doumouchtsis e colaboradores, ao encontrarem uma correlação inversa entre os níveis de OPG e a densidade óssea, em 54 hemodialisados (89).

Outro fator de crescimento local com ações moduladoras do metabolismo ósseo, que ganha particular relevância no doente urémico, é a “proteína morfogenética óssea-7” (“BMP-7; bone morphogenetic protein 7”). Esta proteína, anteriormente designada “proteína osteogénica tipo 1”, é produzida pelas células tubulares renais e parece ter efeitos sistémicos em diversos órgãos, entre os quais o tecido ósseo.

A sua síntese está comprometida no quadro urémico, e principalmente quando predominam as lesões túbulo-intersticiais renais (90).

Num modelo animal de insuficiência renal crónica avançada (nephrectomia de 5/6), a administração endovenosa de BMP-7 eliminou a fibrose peritubular, aumentou a superfície osteoblástica, as superfícies marcadas por tetraciclina e a superfície de mineralização óssea (91).

A administração de BMP-7 também conseguiu normalizar a remodelação óssea num modelo animal de doença óssea adinâmica (92).

Estes efeitos da BMP-7 na estimulação da formação óssea e na correção da doença adinâmica poderão explicar, pelo menos em parte, os efeitos protetores desta proteína num modelo animal de “síndrome metabólico inflamatório” (rato com hipertensão, dislipidemia, obesidade, resistência à insulina, calcificações vasculares, hiperfosfatemia e doença óssea adinâmica) (93; 94).

Tendo em conta estes resultados, o processo de remodelação óssea parece estar diretamente dependente de complexos mecanismos autócrinos e parácrinos, os quais se encontram profundamente alterados na IRC.

No quadro urémico observam-se níveis séricos aumentados de diversas citocinas envolvidas na remodelação óssea (nomeadamente interleucina 1, interleucina 2, interleucina 6, interleucina 11, interleucina 27, TNF- α e TGF- β) (95; 96; 97; 98; 84)

e ainda aumento dos respectivos recetores solúveis ou antagonistas, o que poderá ter um papel relevante na etiopatogénese da ODR urémica (99; 100).

Para investigar o papel de algumas citocinas no processo de remodelação óssea, medimos os níveis circulantes de diferentes citocinas e dos respectivos inibidores específicos, por método de Elisa, no soro de 17 doentes hemodialisados cronicamente (*vide* abaixo manuscrito 14).

Colaborámos com a Dra. Béatrice Descamps-Latscha na determinação dos níveis circulantes plasmáticos da interleucina-1, do antagonista do recetor da interleucina-1, da interleucina-6 e do recetor solúvel da interleucina-6.

A colheita de sangue foi simultânea com a realização de uma biopsia óssea, o que permitiu a correlação com os resultados da histomorfometria óssea (101). Procedemos à contagem histomorfométrica dos parâmetros estáticos e dinâmicos, por método semiautomático.

Neste estudo demonstrámos a presença de níveis aumentados, nestes doentes hemodialisados, da interleucina-1, do antagonista do recetor da interleucina-1, da interleucina-6 e do recetor solúvel da interleucina-6.

Outros autores publicaram, posteriormente, resultados concordantes com os nossos, sugerindo igualmente a participação da interleucina-6 na estimulação da reabsorção óssea (62).

A interleucina-6 parece ser um dos mediadores mais relevantes da ação da PTH e de outros agentes estimuladores da reabsorção óssea (63).

Em concordância com esta hipótese, foi demonstrado que os níveis séricos de IL6 se correlacionam com os níveis circulantes de paratormona intacta e do telopeptídeo do colagénio tipo I (ICTP), sendo esta correlação mais forte nos doentes com hiperparatiroidismo secundário mais grave (63).

De particular relevância, nos nossos 17 doentes hemodialisados, foram as relações inversas observadas, por um lado entre os níveis de antagonista do recetor da interleucina-1 e a superfície osteoblástica, e por outro lado entre o ratio do recetor da interleucina-6 / interleucina-6 (IL6-r/IL6) e a superfície osteoclástica.

Estes nossos resultados estão de acordo com os efeitos estimuladores da interleucina-1 sobre os osteoblastos, previamente descritos, sugerindo que níveis séricos elevados do antagonista do recetor da interleucina-1 tornariam o esqueleto menos sensível à estimulação da formação óssea induzida pela interleucina-1.

A relação inversa entre o ratio do recetor da interleucina-6 / interleucina-6 e a superfície osteoclástica, que observámos nos nossos doentes, está de acordo com estudos *in vitro* que evidenciam o papel da interleucina-6 na promoção da diferenciação dos osteoclastos e na ativação dos osteoclastos maduros (2).

A IL-6 (com um peso molecular de 22 a 27 kD) atua nas células alvo através da ligação ao seu recetor, o qual é constituído por duas subunidades (unidade de ligação “gp-80” e unidade de sinalização “gp-130”).

Este recetor encontra-se ainda, na sua forma solúvel, no plasma. A expressão do recetor da IL-6 parece ser independente dos níveis da paratormona intacta, bem como da terapêutica com vitamina D (102).

Ao contrário de outras citocinas que exercem ações, quase exclusivamente, de forma autócrina e parácrina, os efeitos da IL-6 resultam predominantemente dos seus níveis plasmáticos e do equilíbrio entre esta citocina e o seu recetor solúvel (100; 103).

Em doentes submetidos a diálise peritoneal, os níveis séricos e intraperitoneais de IL-6 apresentaram uma estreita relação entre si e correlacionaram-se, de forma muito significativa com parâmetros de inflamação (proteína C reativa e albuminemia), numa população de 31 doentes (avaliada retrospectivamente). De salientar que, neste estudo, foi ainda evidenciado que os níveis séricos e intraperitoneais mais elevados de IL-6 se associaram a maior taxa de transporte de solutos transperitoneal (104).

Num estudo prospetivo, aleatorizado, realizado em doentes hemodialisados e tratados com vitamina D (via oral versus via endovenosa) observou-se uma diminuição significativa dos níveis séricos de IL-6, sem variação dos níveis de iPTH, nos doentes tratados com vitamina D por via endovenosa.

Estes doentes apresentavam ainda maior densidade óssea ao fim de seis meses de terapêutica, o que poderá indicar uma diminuição da reabsorção e um balanço

positivo de tecido ósseo (105). Infelizmente, neste interessante estudo, não foi realizada avaliação histológica da remodelação óssea.

Através de técnicas histoquímicas de hibridização *in situ*, realizadas em biopsias ósseas colhidas em doentes com doença renal crónica, o grupo do Professor Malluche demonstrou a expressão de ARN mensageiro da IL-6 e do recetor da IL-6, nos osteoclastos ativados e em células da medula óssea. Pelo contrário, os osteócitos e os osteoblastos não evidenciaram expressão do ARN mensageiro da IL-6 nem do respetivo recetor (106).

Mediante a utilização de anticorpos monoclonais aplicados em lâminas de biopsias ósseas (não descalcificadas) foi demonstrada a presença de interleucina 1 alfa, interleucina 6, TNF- α e de TGF- β , no tecido fibroso intertrabecular. Por esta técnica foi ainda detetada a expressão de TGF- β e de IL6 nos osteoblastos e nos osteócitos (107).

Utilizando técnicas de imunohistoquímica aplicadas a biopsias ósseas, foi demonstrado que doentes dialisados sujeitos a paratiroidectomia cirúrgica apresentavam expressão aumentada de IL-1 β , TNF- α e de TGF- β e de fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) na biopsia óssea realizada aquando da cirurgia.

A repetição da biopsia óssea em 9 doentes, um ano após a realização da paratiroidectomia, revelou uma acentuada diminuição dos parâmetros histomorfométricos de remodelação óssea e um decréscimo significativo das 4 citocinas e fatores de crescimento acima referidos (108).

Um dos mecanismos de atuação conjunta da IL-1 beta, da IL-6 e do TNF- α , parece ser o aumento da expressão do gene da COX-2 (ciclooxigenase-2) nos osteoblastos, como foi evidenciado em culturas de células de calvariae de ratinho (109).

Também em culturas celulares de monócitos provenientes de mulheres pré e pós menopáusicas, se observou uma significativa e positiva correlação entre os níveis no sobrenadante de cada uma destas três citocinas e o grau reabsorção óssea (avaliada pelo teste de reabsorção de ossos longos fetais).

Por outro lado, na mesma experimentação, a adição de anticorpos anti TNF- α e de antagonista do recetor da IL-1 conduziu a uma significativa diminuição da libertação de cálcio, indicando um efeito antagonista da reabsorção óssea (110).

Posteriormente, foi ainda demonstrado que culturas de células osteoblásticas humanas produzem menos IL-6 na presença de soro de doentes urémicos, em comparação com a exposição a soro de indivíduos normais. Este resultado parece indicar a presença de um fator inibidor da libertação de IL-6 e da reabsorção óssea, nos doentes com insuficiência renal (97).

Face aos recentes progressos na caracterização dos processos biológicos envolvidos na remodelação óssea, incluindo os que resultam da nossa investigação, é aceitável que desequilíbrios nos níveis séricos do rácio recetor da interleucina-6/interleucina-6, em conjugação com alterações da função paratiroide e com modificações nos níveis de vitamina D possam levar ao desenvolvimento de doença óssea de elevada remodelação ou de doença óssea de baixa remodelação.

Em concordância com esta nossa hipótese estão igualmente os resultados, mais recentes, de Barreto e colaboradores, que correlacionaram o volume e a remodelação óssea, (avaliados por técnica histomorfométrica) com os níveis séricos destas citoquinas, em hemodialisados (111).

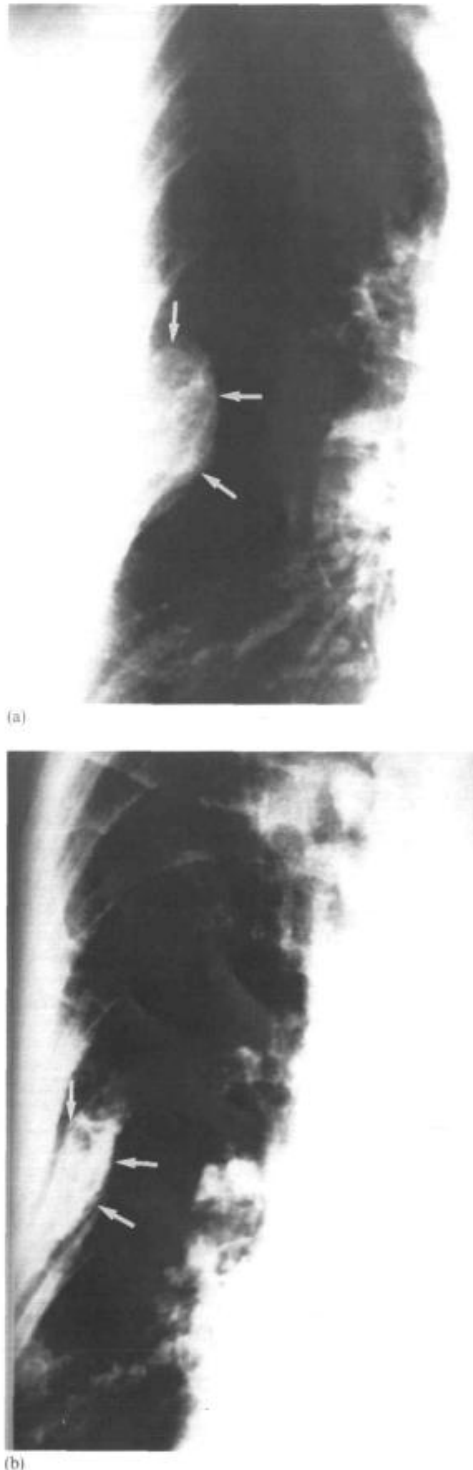


Fig. 2a. X-ray showing brown tumour in sixth right rib; b. marked regression after 3 years of treatment with intravenous calcitriol.

uremic patients treated with long-term intravenous calcitriol. *Kidney Int* 1994; 46: 1124–1132

3. Slatopolsky E, Lopez-Hilker S, Delmez J, Dusso A, Brown A, Martin KJ. The parathyroid–calcitriol axis in health and renal failure. *Kidney Int* 1990; 38 [Suppl. 29] S-41–S-47
4. Fernández E, Betriu MA, Peña JM, Cao G, Rivas C, Montoliu J. Efecto inhibitor directo del incremento secuencial en las dosis de calcitriol intravenoso en el hiperparatiroidismo secundario severo. *Nefrología* 1995; 15: 363–370

Potential role of cytokines in renal osteodystrophy

Sir,

The role of cytokines and their inhibitors in the process of bone remodeling has been demonstrated in several recent studies. It has been speculated that cytokines might play a role in the pathogenesis of renal osteodystrophy as well [1]. However, such a role remains hypothetical at present. It is mainly based on recent findings made by ourselves [2] and others [3] that the balance between cytokines and their specific inhibitors is dramatically impaired in patients on maintenance haemodialysis.

We decided to perform a preliminary study to examine the hypothesis of a possible cytokine involvement in renal osteopathy. We therefore measured circulating levels of cytokines and cytokine inhibitors by specific ELISA in the sera of 16 chronic haemodialysis patients, sampled at the time of transiliac bone biopsy, and to confront such levels to bone biopsy findings. Several of these patients had already participated in our study aimed at examining the role of serum β_2 -microglobulin and of the biocompatibility of haemodialysis membranes (of either cellulose or synthetic type) in renal osteodystrophy which has been published in a recent issue of *Nephrology Dialysis Transplantation* [4]. In this study, plasma cytokines have not been measured. Bone biopsies were prepared as usually, and undecalcified sections used for histomorphometric analysis.

First, we verified the presence in these patients of elevated plasma interleukin-1 (mean \pm SEM, 211 ± 31 vs. ≤ 40 pg/ml in controls), interleukin-1 receptor antagonist (1180 ± 199 vs. ≤ 150 pg/ml), interleukin-6 (107 ± 68 vs. ≤ 10 pg/ml), and interleukin-6 soluble receptor (91 ± 8 vs. ≤ 5 pg/ml). We thus confirmed previous findings made by our group and others.

Second, we sought possible relationships between these serum parameters and bone histomorphometry parameters. Interestingly, we found an inverse relationship between, on the one hand, interleukin-1 receptor antagonist and osteoblast surface (Figure 1) and, on the other hand, between the soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 ratio and osteoclast surface ($r=0.52$, $P=0.03$). These novel findings are in keeping with the previously established stimulatory effect of interleukin-1 on osteoblasts and suggest that a high serum concentration of interleukin-1 receptor antagonist makes the skeleton relatively insensitive to circulating interleukin-1, whereas at low serum concentration, interleukin-1 receptor antagonist would allow the cytokine to fully exert its action. Furthermore, the inverse relationship between osteoclast surface and soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 ratio is in line with a role of interleukin-6 in osteoclast development and activity and an interference of the soluble IL-6 receptor with the effects of interleukin-6 on uraemic bone. It is conceivable that according to the direction and the magnitude of the imbalance in a given patient, in concert with changes of parathyroid function and calcitriol levels [5], either low or high turnover bone disease will eventually develop.

Our preliminary observations therefore strongly support the hypothesis that the cytokine/cytokine receptor-receptor

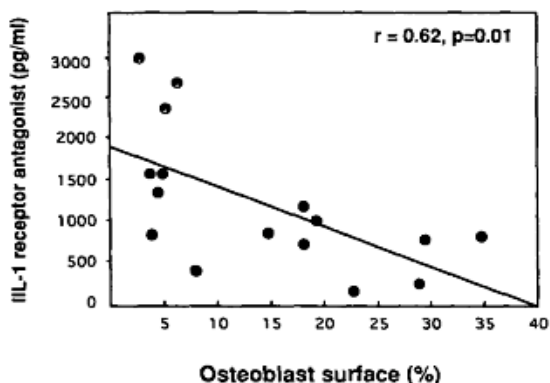


Fig. 1. Relationship between serum level of interleukin-1 receptor antagonist and osteoblast surface. Each point represents serum and bone biopsy data corresponding to one chronic haemodialysis patient ($n = 16$ patients). Normal values for interleukin-1 receptor antagonist ≤ 150 pg/ml; for osteoblast surface, $< 6.0\%$ (expressed as fraction of trabecular bone surface covered with osteoblasts).

antagonist network plays an important role in the pathogenesis of renal osteodystrophy.

INSERM Units 90 and 25
Necker Hospital, Paris
Centre Hospitalier de St Brieuc
St Brieuc
France

Anibal Ferreira
Pierre Simon
Tilman B. Drücke
Béatrice
Descamps-Latscha

- Hruska KA, Teitelbaum SL. Renal osteodystrophy (editorial). *N Engl J Med* 1995; 333: 166-174
- Descamps-Latscha B, Herbelin A, Nguyen AT, Roux-Lombard P, Zingraff J, Moynot A, Verger C, Dahmane D, De Groot D, Jungers P, Dayer JM. Balance between IL-1 β , TNF- α and their specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis: relationships with activation markers of T cells, B cells and monocytes. *J Immunol* 1995; 154: 882-892
- Pereira BJG, Shapiro L, King AJ, Falagas ME, Strom JA, and Dinarello CA. Plasma levels of IL-1 α , TNF α and their specific inhibitors in undialysed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients. *Kidney Int* 1994; 45: 890-896
- Ferreira A, Urena P, Ang KS, Simon P, Morieux C, deVernejoul MC, Drücke T. Relationship between serum β_2 -microglobulin, bone histology and dialysis membranes in uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: 1701-1707
- Drücke T. The pathogenesis of parathyroid gland hyperplasia in chronic renal failure (Nephrology Forum). *Kidney Int* 1995; 48: 259-272.

Successful trial of steroids in two haemodialysis patients with inflammatory disease and anaemia unresponsive to recombinant erythropoietin

Sir,

Resistance to erythropoietin (rHuEpo) therapy in patients with uraemia treated by dialysis may be due to many reasons such as deficiency of haemopoietic factors (iron, B12, folic acid), inadequate dialysis, hyperparathyroidism, aluminium toxicity, infections, neoplastic diseases, primary haematological disorders and inflammatory diseases [1].

The management of these patients consists of the detection and correction, if it is possible, of the cause, in combination

with a further increase in the dose of rHuEpo in some cases [2]. In a recent article published in *Nephrology Dialysis Transplantation*, Macdougall suggests 'a blind trial of steroids' in patients with inflammatory diseases and poor response to rHuEpo therapy [3].

We administered low doses of prednisolone to two patients on haemodialysis with anaemia refractory to rHuEpo, who had autoimmune diseases (rheumatoid arthritis and vasculitis), which resulted in a marked increase in their haematocrit (Ht).

Patient 1, a 67-year old female, started regular haemodialysis at the age of 63 (chronic pyelonephritis). She had rheumatoid arthritis for 18 years and she intermittently received salicylates. Her Ht at the start of haemodialysis was 18%. She was treated with rHuEpo for 12 months in doses gradually increased to 120 U/kg intravenously thrice weekly (this maximum dosage for 4 months), but without any improvement. The laboratory data were as follows: Ht 18%, Hb 6 gr%, ferritin 850 μ g/l, Fe 38 μ g/dl, iPTH 125 pg/ml (10-65), Al 28 μ g/l, Al/DFO 118 μ g/l, ESR 135 mm/1sth, Ra test positive (+ + + +), cryoglobulins negative. An examination of bone marrow was typical of 'anaemia of chronic disease' [4].

At this time we decided to administer prednisolone 25 mg i.v. at the end of each dialysis session and progressively the Ht increased to 32% over 8 weeks. Now, 13 months later, the dose of rHuEpo and prednisolone have been tapered to 35 U/kg thrice weekly and 8 mg/daily respectively and the patient's Ht has been stabilized at 30-32%.

Patient 2, a 74-year old male, started HD on January 1994. The origin of his renal failure was a microscopic form of polyarteritis nodosa, which was diagnosed in April 1992 and resulted in terminal renal failure, despite therapy with corticosteroids and cyclophosphamide. During this period he did not manifest any haematological disorder, which could be attributed to the cyclophosphamide. At the initiation of HD, the patient's Ht was 24%, but subsequently it declined to 17% in the first 3 months. He started therapy with rHuEpo, the dosage of which was increased gradually to 150 U/kg thrice weekly over 8 months (this maximum dose for 3 months), but without any response and he was transfused with packed red cells to maintain an Ht at 16-18%. His laboratory data were as follows: Ht 16-18%, Hb 5.5 gr%, WBC 6500/mm³, PLTS 180 000/mm³, ferritin > 1000 mg/ml, Fe 62 μ g/dl, iPTH 95 pg/ml, Al 15 μ g/l, Al/DFO 85 μ g/l. Two examinations of bone marrow were the same as in patient 1. At this time we started therapy with steroids and progressively his Ht increased to 26% after 10 weeks and it maintained at this value 1 year after the institution of steroids. The current doses of rHuEpo and prednisolone are 150 U/kg thrice weekly and 8 mg/daily respectively.

Our two patients were rHuEpo resistant since they received an adequate dose of rHuEpo for a long time without any alteration in Ht. There were no other apparent cause EPO resistance, but both suffered from autoimmune diseases, which may cause anaemia by affecting iron utilization (reticuloendothelial block), by elevated inflammatory cytokines [5].

The dose of rHuEpo which we administered to our patients could have been further increased but their quick response to steroid therapy, dramatic in the first case, indicates that the effect of prednisolone on the inflammatory disease possibly increased the sensitivity of bone marrow to the rHuEpo.

To our knowledge there are inadequate data in the literature about the subject of rHuEpo therapy plus steroids in cases of anaemia caused by renal failure and autoimmune diseases and this issue needs further evaluation.

5.3. Efeitos do tipo de membrana de hemodiálise na osteodistrofia renal (manuscrito 16)

No capítulo 5.1. descrevemos as associações que observámos, entre os níveis séricos mais elevados de beta-2 microglobulina (β 2-M) e o aumento da remodelação óssea, em doentes prevalentes em hemodiálise.

Os doentes dialisados com membranas de cuprofano (de menor permeabilidade e baixa biocompatibilidade) apresentavam níveis séricos mais elevados de β 2-M, em comparação com os doentes dialisados com membranas sintéticas de alta permeabilidade.

Estes níveis séricos de β 2-M correlacionaram-se positivamente com a atividade osteoclástica, a atividade osteoblástica e marcadores séricos da remodelação óssea.

No capítulo anterior, descrevemos a associação entre os níveis séricos de diversas citocinas com reconhecida ação (*in vitro* e *in vivo*) no metabolismo ósseo, e os resultados histomorfométricos de biopsias ósseas realizadas em hemodialisados.

Ambos os nossos estudos, acima referidos, constituíram avaliações retrospectivas dos possíveis efeitos da permeabilidade e da biocompatibilidade das membranas de diálise, na remodelação óssea de doentes prevalentes em hemodiálise.

Para confirmar a nossa hipótese de que a utilização de uma membrana de hemodiálise sintética, mais biocompatível e de alta permeabilidade, estaria associada a uma menor ativação da remodelação óssea, realizámos um estudo prospetivo, aleatorizado e multicêntrico (*vide* abaixo manuscrito 15).

Com este objetivo seleccionámos doentes com hiperparatiroidismo secundário (em função dos níveis séricos de paratormona intacta - iPTH), os quais foram sujeitos, durante 9 meses, a terapêutica hemodialítica com uma membrana celulósica (baixa permeabilidade) ou com uma membrana de poliacrilonitrilo (AN 69; alta permeabilidade).

Os doentes foram distribuídos pelos dois tipos de tratamento, de forma aleatória (estratificada aos pares em função dos valores da iPTH sérica).

Participaram neste estudo o nosso centro em Lisboa (que recrutou 16 doentes) e um centro de Amiens, França (investigador principal: Professor Albert Fournier), que recrutou 20 doentes.

O grupo de doentes portugueses, ao contrário dos franceses, foi sujeito a dupla biopsia óssea (no início e no final do estudo). Efetuámos 26 biopsias ósseas neste estudo, sendo 16 biopsias iniciais e 10 biopsias no final da avaliação (5 doentes de cada braço terapêutico: membrana de celulose versus poliacrilonitrilo).

Realizámos a coordenação deste estudo, bem como as biopsias ósseas e a respetiva leitura histomorfométrica, incluindo parâmetros estáticos e dinâmicos.

Todos os parâmetros bioquímicos dos doentes portugueses foram determinados, sob a nossa coordenação, no laboratório de bioquímica do Serviço de Nefrologia do Hospital Curry Cabral.

Foram igualmente efetuados doseamentos seriados dos fatores de crescimento dependentes da insulina (“Insulin-like growth factors”-IGF) pelo Dr. Jehle (Ulm, Alemanha) e das proteínas de ligação deste fator de crescimento, pelo Dr. Mohan (Loma Linda, Califórnia, EUA). Estes coautores da nossa investigação tinham estudos recentes publicados nesta área.

Participámos ainda na determinação dos doseamentos séricos de interleucina 6 (IL-6) e do respetivo recetor solúvel (sIL-6r), efetuada no INSERM U 507 – Division of Nephrology, Hôpital Necker, Paris, França.

O resultado mais relevante deste estudo prospetivo e aleatorizado foi a confirmação da nossa hipótese (baseada em prévias avaliações retrospectivas) de que a utilização de membranas de mais baixa permeabilidade e menor biocompatibilidade se associa a um aumento da remodelação óssea.

Apesar dos níveis séricos de iPTH não terem variado significativamente ao longo do estudo (nem mostrado diferenças significativas entre os dois braços do protocolo), nos doentes dialisados com uma membrana de alta permeabilidade e mais biocompatível observou-se uma significativa redução do número de osteoclastos

ativados, da superfície osteoclástica e da superfície osteoblástica entre o início (biopsia inicial) e o final do estudo (biopsia aos 9 meses).

Pelo contrário, os doentes dialisados com uma membrana de acetato de celulose (baixa permeabilidade e menor biocompatibilidade) mostraram uma variação oposta, com significativo aumento destes três parâmetros histomorfométricos estáticos, entre a primeira biopsia óssea e a biopsia final do estudo.

A comparação destes parâmetros histomorfométricos entre as duas populações estudadas, não mostrava diferenças significativas na biopsia óssea inicial (pré aleatorização).

Pelo contrário, na biopsia final do estudo, estes 3 parâmetros histomorfométricos eram significativamente mais elevados nos doentes dialisados com membranas de celulose em comparação com os doentes dialisados com as membranas de poliacrilonitrilo.

Também a taxa de formação óssea (“bone formation rate”-BFR) que foi o parâmetro histomorfométrico dinâmico considerado para avaliar a formação óssea, mostrou um comportamento oposto nos doentes dialisados com uma membrana de baixa permeabilidade (acetato de celulose) em comparação com uma membrana de alta permeabilidade e mais biocompatível (poliacrilonitrilo).

No grupo de doentes sob hemodiálise com membranas de acetato de celulose observou-se um aumento de 50% na taxa de formação óssea e nos doentes dialisados com poliacrilonitrilo uma redução do mesmo parâmetro dinâmico em 31%. Esta variação não atingiu significado estatístico, muito provavelmente, em consequência da pequena dimensão da amostra (apenas 5 doentes em cada grupo, com dupla biopsia óssea).

Estes resultados ganham particular relevância, tendo em conta que, como acima referimos, os níveis séricos de paratormona intacta não mostraram diferenças significativas entre os dois grupos ou dentro de cada braço terapêutico, ao longo do estudo.

Visto que os doentes deste protocolo apresentavam, na avaliação inicial, parâmetros histomorfométricos e bioquímicos de doença óssea de elevada remodelação,

a evolução observada nos doentes hemodialisados com membranas de maior convecção e biocompatibilidade afigura-se como mais vantajosa, tendo em conta que resulta num movimento para a normalidade.

Pelo contrário, nos doentes dialisados com uma membrana celulósica durante 9 meses, observou-se um agravamento da doença óssea de elevada remodelação.

O segundo achado relevante deste nosso estudo foi a redução significativa dos níveis plasmáticos do fator de crescimento dependente da insulina - tipo I (“insulin growth factor”- IGF-I), apenas nos doentes dialisados com membranas de alta permeabilidade.

Pelo contrário, os doentes dialisados com membranas de cuprofano não apresentaram variação significativa dos níveis de IGF-1, ao longo do estudo.

Estes resultados estão de acordo com os conhecidos efeitos do IGF-I na estimulação da atividade osteoblástica (112), os quais parecem ser independentes dos níveis séricos de paratormona intacta (113; 114).

Salientamos assim a concordância entre a redução da taxa de formação óssea (BFR) e a diminuição dos níveis plasmáticos de IGF-I, nos doentes em que foi utilizada uma membrana sintética, de alta permeabilidade.

Os resultados deste nosso estudo estão igualmente em concordância com os efeitos descritos, *in vitro*, e em doentes não urémicos, para as proteínas de ligação do fator de crescimento dependente da insulina (“insulin growth factor binding proteins”- IGFBP).

Estudos clínicos demonstraram que a IGFBP-1 e a IGFBP-2 se correlacionaram negativamente e que a IGFBP-5 se correlacionou positivamente com a densidade óssea e com parâmetros de formação óssea (115; 112).

Nos nossos doentes observámos uma correlação positiva, significativa, entre os níveis plasmáticos de IGFBP-5 e a taxa de formação óssea.

Também neste estudo prospetivo, e à semelhança do que já tínhamos descrito anteriormente em estudos retrospectivos (mas com populações estudadas significativamente maiores), encontramos correlações positivas e significativas entre os

níveis séricos do recetor solúvel da interleucina 6 (sIL-6r) e níveis séricos de marcadores não invasivos da formação (osteocalcina, isoforma óssea da fosfatase alcalina) e de reabsorção óssea (fragmentos de pontagem das cadeias de colagénio).

Pelo contrário, não encontramos, quaisquer correlações entre os níveis séricos de interleucina 6 ou do seu recetor solúvel com parâmetros histomorfométricos estáticos ou dinâmicos, o que se poderá justificar, pelo menos em parte, pela dimensão reduzida da amostra.

Original Article

Effect of type of dialysis membrane on bone in haemodialysis patients

Anibal Ferreira¹, Abderhaman Ghazali², José Galvão³, Jean-Claude Souberbielle⁴, Peter M. Jehle⁵, Subburaman Mohan⁶, Béatrice Descamps-Latscha⁷, Roxana Oprisiu², Albert Fournier² and Tilman B. Drüeke⁷

¹Hospital Curry Cabral, Lisbon, Portugal, ²Service de Néphrologie et de Médecine Interne, CHU, Amiens, France, ³Hospital Militar Principal, Lisbon, Portugal, ⁴Laboratoire de Physiologie, Faculté de Médecine Necker, Paris, France, ⁵Division of Nephrology, University of Ulm, Ulm, Germany, ⁶Musculoskeletal Diseases Center (151), Jerry L. Pettis VA Medical Center, Loma Linda, CA, USA and ⁷INSERM U 507, Division of Nephrology, Hôpital Necker, Paris, France

Abstract

Background. Uraemic bone disease is the result of a number of factors modulating bone formation and resorption in a complex manner. In the present study, the hypothesis tested was that the type of haemodialysis membrane used for renal replacement therapy might also play a role.

Methods. We conducted a prospective, open study in 24 chronic haemodialysis patients who were randomized to dialysis treatment with either cellulose (CELL group, $n=11$) or polyacrylonitrile (AN-69 group, $n=13$) membrane for 9 months. Repeated determinations of plasma parameters reflecting bone turnover were done in all patients, and a bone biopsy in a subgroup at the start and end of study.

Results. At the start, mean plasma intact parathyroid hormone levels were comparable between the two groups and they did not vary significantly at 9 months of treatment. Similarly, plasma bone-specific alkaline phosphatase and osteocalcin (markers of bone formation), and cross-laps (marker of bone resorption) remained unchanged. However, plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) progressively decreased from 169 to 119 ng/ml in AN-69 group ($P<0.01$), whereas it remained unchanged in CELL group. In addition, the levels of IGF binding protein (IGFBP)-1 and IGFBP-2 were increased while the levels of IGFBP-5 were decreased in AN-69 group. In the five patients of each group who had repeat bone biopsies, histomorphometric analysis showed a decrease in osteoblast surface, osteoclast surface and osteoclast number in AN-69 group at 9 months, compared with baseline values measured at the start of the study. In contrast, all three parameters significantly increased in the

CELL group at 9 months ($P<0.001$ for the difference between each of the three parameters). Bone formation rate decreased by 31% in the AN-69 group, but increased by 50% in CELL group. However, this latter difference was not statistically significant. Plasma interleukin (IL)-6 and soluble IL-6 receptor levels did not change in the two groups of patients who had undergone bone biopsy.

Conclusion. Dialysis with CELL membrane was associated with increased bone turnover whereas the use of AN-69 membrane was associated with decreased bone turnover, suggesting a beneficial effect of the latter on high-turnover uraemic bone disease. However, as the number of patients with repeat bone biopsies was small, these findings need to be confirmed in a larger study. Further studies are also needed to evaluate whether or not the changes in IGF system components play a role in decreased bone cell activity in patients on dialysis using the AN-69 polyacrylonitrile membrane.

Keywords: renal osteodystrophy; haemodialysis; membrane; bone markers; bone biopsy

Introduction

Chronic renal failure patients may suffer from various osteo-articular problems such as osteitis fibrosa, mixed bone lesions, osteomalacia, adynamic bone disease, or dialysis-associated arthropathy. A number of factors are involved in these complications, including impaired calcium intake and absorption, phosphate retention, vitamin D deficiency, secondary hyperparathyroidism, hypoparathyroidism, aluminium overload, secondary oxalosis, and β_2 -microglobulin amyloidosis. Specific types of underlying nephropathy may contribute to renal osteopathy, as for instance diabetes mellitus and primary oxalosis.

Correspondence and offprint requests to: Tilman B. Drüeke, MD, INSERM Unité 507 and Division of Nephrology, Hôpital Necker, 161 rue de Sévres, F-75743 Paris Cedex 15, France.

Last but not least, some treatments given to uraemic patients exert marked effects on the skeleton such as corticosteroids and immunosuppressive drugs. Renal replacement therapy is part of such treatment-related factors. Thus, a low calcium concentration of the dialysis fluid may lead to a stimulation of parathyroid hormone (PTH) release during and after the dialysis whereas a high calcium concentration inhibits PTH secretion. The bacteriologic quality of the dialysate has been suggested to play a role in the occurrence of carpal tunnel syndrome, probably via endotoxin release and excessive cytokine generation, and the type of haemodialysis membrane has also been shown to influence the prevalence of carpal tunnel syndrome and destructive arthropathy in chronic dialysis patients [1].

In contrast, not much is known about a possible contribution to uraemic osteodystrophy of the dialysis procedure and, in particular, the type of haemodialysis membrane used for renal replacement therapy. Therefore, we decided some years ago to test this hypothesis in a retrospective study. We found evidence of higher bone turnover in patients on long-term haemodialysis treatment with cellulosic membranes (Cuprophane) than in patients dialysed with highly permeable, synthetic membranes (polyacrylonitrile AN-69 or high-flux polysulfone) for prolonged time periods [2]. Additional indirect evidence in favour of a possible contribution of the dialysis technique to bone complications is the observation of an association between plasma cytokine levels, known to be modified by the dialysis procedure, and bone cell activity in uraemic patients [3].

The goal of the present prospective, randomized study in chronic haemodialysis patients was to confirm our hypothesis, based on retrospective and indirect evidence, that the use of a relatively biocompatible, highly permeable synthetic dialysis membrane should be associated with a lower bone turnover than the use of a less biocompatible, low permeability cellulosic membrane. For this purpose, patients with comparable degrees of mild to moderate hyperparathyroidism were allocated to a 9-month treatment period with either cellulosic or polyacrylonitrile AN-69 membrane. Possible changes of their bone metabolism during this time period were evaluated by circulating bone markers, and a subgroup of patients also underwent repeat bone histomorphometric examination and detailed analysis of circulating IGF system components.

Patients and methods

Study protocol

The initial plan of our study was to recruit a total number of 40 haemodialysis patients with mild to moderate degrees of hyperparathyroidism. Two dialysis centres agreed to participate, one located in Lisbon, Portugal and the other in Amiens, France. Inclusion criteria were: stable haemodialysis treatment 3×4–5 h per week with cellulosic membrane (cellulose acetate or cellulose diacetate) for at least 6 months, normal plasma calcium, pre-dialysis plasma

phosphorus between 1.3 and 2.0 mmol/l, plasma intact PTH (iPTH) between 100 and 500 pg/ml (normal 10–65 pg/ml), dialysate calcium between 1.5 and 1.75 mmol/l, and bicarbonate as the dialysis fluid buffer. Exclusion criteria were: presence of inflammatory syndrome, diabetes mellitus or other systemic diseases, introduction or change of dose of calcium or vitamin D supplements for last 6 months, glucocorticoid administration, and dialyser reuse. All medications had to be kept stable during entire study period.

Twenty patients of each centre were randomly assigned to one of two treatment arms, the goal being to have comparable initial plasma iPTH values in each group. A step-by-step procedure was used, allocating randomly the first pair of patients with the highest baseline plasma iPTH to either arm, then the second pair with the next lower iPTH values and so on until the pair with the lowest iPTH values was reached. Unfortunately, the number of patients in the two centres who fulfilled the criterion of baseline iPTH values between 100 and 500 pg/ml and who agreed to participate at study was too small, so that the range of iPTH values had to be enlarged secondarily to values comprised between 16 and 1265 pg/ml.

The two treatment arms consisted of haemodialysis treatment for a period of 9 months either with cellulosic membrane (cellulose acetate or cellulose diacetate, CELL group) or with polyacrylonitrile AN-69 membrane (AN-69 group), under otherwise stably maintained dialysis conditions.

All the patients underwent bimonthly local monitoring of plasma total calcium, phosphorus, total protein, iPTH and total alkaline phosphatases. In addition, plasma samples were taken and stored at the start and at time points 6 and 9 months of study (and also at 12 months in Lisbon centre) for subsequent determinations of iPTH, bone-specific alkaline phosphatase, osteocalcin, total and free insulin-like growth factor-1 (IGF-1), IGF-II, IGF binding protein (IGFBP)-1 to -6, and cross-laps concentrations. Plasma interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor (sIL-6R) levels were determined at the start and at time points 6, 9, and 12 months.

In addition, the patients of the Lisbon centre underwent a bone biopsy immediately before the start of study and again at the end of study, which is within a maximum of 2 months after the 9-month treatment period.

Participating patients

In the Amiens centre, 14 Caucasian chronic haemodialysis patients of the initially recruited 20 subjects completed the study, six in the CELL group and eight in the AN-69 group. Among the five patients who left the study prematurely: one died, one moved to another centre and three received kidney grafts. The baseline dialysis treatment schedule during the 6 months prior to study was 3×4–5 h per week. Oral calcium carbonate supplements were prescribed to the majority of patients in the Amiens centre and the dose was maintained stable unless serum phosphorus increased. Alfacalcidol therapy of 0.25 µg/day or less was given to two patients and maintained stable throughout the 9 month-study period. The dialysate calcium concentration was 1.5 mmol/l in all patients.

In the Lisbon centre, only a total of 10 patients completed the study, five in the CELL group and five in the AN-69 group. It was actually impossible to obtain a total number of 20 patients with repeat bone biopsies at a 9 month interval. Sixteen patients were initially recruited. Six left prematurely: three received kidney transplants, two were transferred to

another centre, and one died of myocardial infarction. The baseline dialysis treatment schedule during the 6 months prior to study was 3×4 h per week. The dialysate calcium concentration was 1.5 mmol/l in all patients. Calcitriol therapy of 0.25 µg/day or less was given to one patient and this dose was maintained throughout the 9 month study period. Oral calcium carbonate supplements were prescribed to the majority of the patients and the dose was maintained stable in all of them throughout the study.

Assays

All blood samples were non-fasting morning samples. Plasma total calcium, phosphorous, total alkaline phosphatase, albumin, C-reactive protein (CRP), and transferrin were determined by standard biochemical methods.

Plasma iPTH levels were measured using an immunoradiometric assay (Nichols Institute Diagnostics, Paris, France), with normal values comprised between 10 and 65 pg/ml and intra- and inter-assay coefficients of variation of less than 7%.

To assess bone metabolism more specifically, bone-specific alkaline phosphatase (bAP; Hybritech, Köln, Germany) and osteocalcin (CIS, Dreieich, Germany) were determined by RIA. For quantification of degradation products of C-terminal telopeptides of type I collagen, plasma cross-laps were determined by Cross-laps One Step Elisa kit (Osteometer BioTech, Herlev, Denmark). In a personal study, plasma cross-laps levels were determined in 140 healthy men and 140 healthy women with normal renal function, aged 60–80 years. The range of values found in these individuals was 1.25–5.40 nmol/l for men and 1.35–7.40 nmol/l for women (unpublished results). In addition, they were also determined in healthy pre-menopausal women aged 40–50 years. In these women, the levels were lower, in the range of 0.65–2.85 nmol/l (unpublished results). Circulating IL-6 and sIL-6R were determined using commercially available kits (Biosource International, ClniSciences, Montrouge, Paris).

Plasma total IGF-I was measured with a new IRMA kit (IGF-I RIACT, Cis Bio, Gif sur Yvette, France), using two monoclonal antibodies directed against two different epitopes of the IGF-I molecule. No extraction step was performed, but the bound IGF-I was displaced from IGF-BPs by acidification. An excess IGF-II was then added to the acid-treated serum to prevent re-association of IGF-I with its carrier proteins when buffer was added. In our laboratory, the within-run CV (SD/mean of 10 measurements of three serum pools) was 1.8% at 52 ng/ml, 3.7% at 289 ng/ml, and 4.1% at 676 ng/ml, while the between-run CV (the same three serum pools measured in duplicate over six non-consecutive days) was 5.8% at 56 ng/ml, 4.5% at 299 ng/ml, and 4.1% at 700 ng/ml. The detection limit, defined as the concentration at the mean + 3SD of 20 measurements of the zero calibrator, was 1 ng/ml. Serial dilutions of eight sera with high (three acromegalic patients) or medium (five patients with renal failure on haemodialysis) IGF I concentrations gave recovery values of 89.2–104.5%.

All the other components of the circulating IGF system were measured as previously described [4]. Free IGF-I levels were determined by a specific RIA (DSL, Frankfurt, Germany) with intra- and inter-assay coefficients of variation of less than 11%. There was no cross-reaction with IGF-II, insulin, proinsulin, and growth hormone. IGF-II was measured by a specific RIA (DSL, Frankfurt, Germany) with intra- and inter-assay coefficients of variation of less than 7.5 and 10.5%. There was no cross-reaction with IGF-I,

insulin, proinsulin, and IGFBP-2, -3, -4, and -5. IGFBP-1 was measured by enzyme immunoassay (ELISA, Mediagnost, Tuebingen, Germany) with intra- and inter-assay coefficients of variation of less than 4 and 8% and no cross-reaction with other IGF-BPs. IGFBP-2 was measured by a specific RIA with intra- and inter-assay coefficients of variation of less than 9 and 8% and no cross-reaction with IGFBP-1, -3, -4, -5, and -6 (DSL, Frankfurt, Germany). IGFBP-3 was determined by a specific RIA with intra- and inter-assay coefficients of variation of less than 3.5 and 7.5% and no cross-reaction with other IGF-BPs (Mediagnost, Tuebingen, Germany). IGFBP-4 and -5 were measured by specific RIA as previously described (see Ref. [3]) with intra- and inter-assay coefficients of variation of less than 10% and no cross-reaction with other IGF-BPs. IGFBP-6 was determined by a specific RIA with intra- and inter-assay coefficients of variation of less than 11 and 10% and no cross-reaction with IGFBP-1, -2, -3, -4 and -5 (DSL, Frankfurt, Germany).

Bone biopsy and bone histomorphometry

Two transiliac bone biopsies, using the trephine of Bordier-Meunier with an internal diameter of 8 mm, were obtained in all Lisbon patients, one at the start of study and the other after 9–12 months, and analysed as reported previously [2]. For bone tetracyclin labelling, patients first received an oral dose of 250 mg doxytetracyclin twice daily for 3 days, then stopped taking tetracyclin for 10 days, and then resumed tetracyclin for another 3 days. Bone biopsy was performed 5 days after the last dose. Normal bone histomorphometric values are from de Vernejoul *et al.* [5]. The following bone histomorphometric parameters, expressed according to standardized nomenclature, were measured in trabecular bone: trabecular bone volume (BV/TV) expressed as the per cent of trabecular space (normal values 19.3±1.3%); osteoblast surface (Ob.S/BS) expressed as the osteoid surface covered with plump osteoblasts and expressed as the per cent of trabecular bone surface (normal values 5.4±1.9%); osteoclast surface (Oc.S/BS) defined as the fraction of trabecular bone surface covered with osteoclasts (normal values 1.39±0.77%); osteoclast number (N.Oc/mm²) per mm² of tissue section (normal values 1.11±0.69); aluminium surface (Al.S/BS) defined as the fraction of trabecular bone surface covered by aluminium (normal values, 0%); mineral apposition rate (MAR) (normal values 0.63±0.17 µm/day); mineralizing surface (MS) (normal values 14.2±1.3%); and bone formation rate (BFR) (normal values 0.3±0.05 µm²/µm/day).

Statistical evaluation

Statistics were computed using SPSS. Results have been expressed as mean±SEM. Data were analysed by Student's paired or unpaired *t* test and one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Newman-Keuls test. The analysis was separated for the individual subgroups. Correlations between variables (Pearson's correlation coefficient) were assessed using univariate linear regression analysis. *P*<0.05 was accepted as statistically significant.

Results

Baseline clinical and biochemical data

The baseline clinical and biochemical data of the 24 patients from Amiens and Lisbon centres combined

and of the 10 patients from Lisbon centre alone are summarized in Table 1. The patients of the two centres and within the groups were comparable with respect to age, gender, and duration of haemodialysis time. On average, the patients of the Lisbon centre had biochemical evidence of higher bone formation (bone-specific alkaline phosphatase, osteocalcin) and bone resorption (cross-laps) rates than the patients of the Amiens centre. Plasma total IGF-I levels were comparable between the patients of the two centres. Of note, inter-individual differences of total IGF-I levels were less marked than those of the circulating bone markers. In the Lisbon centre patients, plasma albumin, CRP, and transferrin levels were comparable between AN-69 and CELL groups: 3.86 ± 0.103 vs 3.62 ± 0.100 g/dl for albumin, $P = \text{NS}$; 7.4 ± 1.4 vs 6.5 ± 0.5 mg/l for CRP, $P = \text{NS}$; and 179 ± 13 vs 171 ± 17 mg/dl for transferrin, $P = \text{NS}$).

Biochemical markers of bone metabolism

As shown in Table 2, plasma total calcium and phosphorus levels were stable and comparable in all groups throughout the three time periods of study. Moreover, no significant changes in circulating bone-specific markers were observed between both groups. At baseline, iPTH levels were comparable between AN-69 group and CELL group patients and did not significantly change during the follow-up period of 9 months. Similarly, plasma concentrations of bone-specific alkaline phosphatase, osteocalcin, and cross-laps remained unchanged during this observation period.

IGF system components

In the AN-69 group, plasma IGF-I levels progressively decreased whereas no change was found in the CELL group (Table 2 and Figure 1). The differing behaviour of plasma IGF-I levels with time between AN-69 and CELL groups observed in the whole patient group was also seen when considering the Lisbon group

patients alone, namely a decrease in total IGF-I levels in AN-69-treated patients, but no change in CELL-treated patients (Figure 2). Table 3 summarizes data on circulating IGF system components in the five AN-69-group patients and the five CELL-group patients of the Lisbon centre, compared with reference values of healthy control subjects. Similar to total IGF-I concentrations, AN-69 patients revealed a moderate decrease in free IGF-I levels reaching significance at 6 months. In contrast with the total and free IGF-I levels, IGF-II levels remained unchanged in both groups. To address the question whether changes in the different IGFBPs may account for the fluctuations in free and total IGF-I levels in the AN-69 but not in the CELL groups, we further determined IGFBP-1 to -6 levels by specific immunoassays. Interestingly, in AN-69 patients plasma levels of IGFBP-1 increased continuously, reaching 2-fold higher levels after 12 months compared with baseline values. Furthermore, IGFBP-2 levels were moderately higher at 12 months whereas IGFBP-5 levels decreased with a nadir at 9 months (1.7-fold lower levels, $P < 0.05$). In contrast, in CELL-treated patients, levels of IGFBP-1 remained unchanged but those of IGFBP-5 significantly increased, with a maximum of 1.6-fold value at 9 months ($P < 0.05$).

No correlation was found between plasma iPTH and IGF-I levels at baseline or during study for all patients together. Similarly, no correlation existed between plasma iPTH and any of the other IGF system components in Lisbon group patients (data not shown).

Cytokine and inflammatory parameters

No differences between groups were observed in the change with time of plasma cytokine parameters IL-6 and sIL-6R in the patients of the Lisbon centre except a slightly, significantly ($P < 0.05$) lower IL-6 level in AN-69-group patients than in CELL group patients at the 12 months time point. Plasma IL-6 levels for the 0, 6, 9- and 12-month study time points were 6.6 ± 1.0 , 5.9 ± 1.4 , 8.3 ± 3.0 , and 7.2 ± 0.5 pg/ml in AN-69 group,

Table 1. Baseline clinical and biochemical data of AN69 group and CELL group patients of Amiens and Lisbon centres, respectively, at start of study (mean \pm SEM)

Parameter	Amiens centre +Lisbon centre AN69 group	Amiens centre +Lisbon centre CELL group	Lisbon centre alone AN69 group	Lisbon centre alone CELL group
Number of patients	13	11	5	5
Age (year)	57 \pm 4	69 \pm 5	59 \pm 8	55 \pm 4
Gender (male/female)	9/4	9/2	5/0	4/1
Body mass index	25.6 \pm 1.8	22.5 \pm 0.7	22.5 \pm 1.4	21.9 \pm 0.7
Time on haemodialysis (year)	5.6 \pm 1.6	5.1 \pm 1.0	3.2 \pm 0.9	3.6 \pm 0.5
Total calcium (mmol/l)	2.33 \pm 0.05	2.46 \pm 0.07	2.29 \pm 0.12	2.65 \pm 0.06
Phosphorus (mmol/l)	1.75 \pm 0.12	1.41 \pm 0.15	1.78 \pm 0.24	1.25 \pm 0.20
Intact PTH (pg/ml)	201 \pm 91	181 \pm 71	333 \pm 236	185 \pm 87
Bone-spec. alk. P'tase (μ U/l)	22.9 \pm 10.7	18.7 \pm 3.3	40.9 \pm 27.3	27.2 \pm 6.2
Osteocalcin (ng/ml)	48.8 \pm 22.7	44.8 \pm 14.8	88.8 \pm 57.6	62.2 \pm 30.9
Cross-laps (nmol/l)	19.7 \pm 6.8	24.7 \pm 6.8	31.5 \pm 17.1	39.9 \pm 11.8
IGF-I (ng/ml)	169 \pm 23	124 \pm 22	157 \pm 26	173 \pm 35

Table 2. Plasma markers of bone turnover of all AN-69 group and all CELL group patients (Amiens and Lisbon centres combined), and of Lisbon centre patients alone at start (T_0) and end (T_{9mo}) of study (mean \pm SEM)

Parameter	Amiens centre+Lisbon centre AN-69 group	Amiens centre+Lisbon centre CELL group	Lisbon centre alone AN-69 group	Lisbon centre alone CELL group
Number of patients	13	11	5	5
Total calcium (mmol/l)				
T_0	2.33 \pm 0.05	2.46 \pm 0.07	2.29 \pm 0.12	2.65 \pm 0.06
T_{6mo}	2.29 \pm 0.04	2.35 \pm 0.05	2.21 \pm 0.03	2.26 \pm 0.06
T_{9mo}	2.32 \pm 0.04	2.29 \pm 0.03	2.27 \pm 0.10	2.22 \pm 0.05
Total phosphorus (mmol/l)				
T_0	1.75 \pm 0.12	1.41 \pm 0.15	1.78 \pm 0.24	1.25 \pm 0.20
T_{6mo}	1.78 \pm 0.11	1.40 \pm 0.13	1.67 \pm 0.20	1.46 \pm 0.14
T_{9mo}	1.76 \pm 0.09	1.50 \pm 0.13	1.68 \pm 0.13	1.23 \pm 0.13
Intact PTH (pg/ml)				
T_0	201 \pm 91	181 \pm 71	333 \pm 236	185 \pm 87
T_{6mo}	291 \pm 113	264 \pm 126	504 \pm 272	346 \pm 213
T_{9mo}	316 \pm 159	275 \pm 134	545 \pm 330	344 \pm 264
Bone-specific alkaline phosphatase (μ U/l)				
T_0	22.9 \pm 10.7	18.7 \pm 3.3	40.9 \pm 27.3	27.2 \pm 6.2
T_{6mo}	24.7 \pm 10.7	29.0 \pm 10.8	44.1 \pm 26.3	44.0 \pm 20.1
T_{9mo}	28.4 \pm 13.8	27.9 \pm 12.5	46.6 \pm 26.3	45.1 \pm 26.2
Cross-laps (nmol/l)				
T_0	19.6 \pm 6.8	24.7 \pm 6.8	31.5 \pm 17.1	39.9 \pm 11.8
T_{6mo}	21.6 \pm 6.2	26.1 \pm 9.9	35.0 \pm 14.5	47.5 \pm 18.0
T_{9mo}	19.4 \pm 5.1	26.1 \pm 9.0	29.1 \pm 7.9	38.5 \pm 14.2
Osteocalcin (ng/ml)				
T_0	48.8 \pm 22.7	44.8 \pm 14.8	88.8 \pm 57.6	68.2 \pm 30.9
T_{6mo}	48.7 \pm 21.2	38.2 \pm 14.5	91.8 \pm 51.9	65.8 \pm 27.9
T_{9mo}	49.8 \pm 17.7	42.8 \pm 16.7	78.1 \pm 35.4	68.2 \pm 30.2
IGF-I (ng/ml)				
T_0	169 \pm 23	124 \pm 22	157 \pm 26	173 \pm 35
T_{6mo}	150 \pm 24	151 \pm 26	109 \pm 22*	205 \pm 35
T_{9mo}	119 \pm 10**	123 \pm 23	113 \pm 15*	143 \pm 28

** $P < 0.01$, T_0 vs T_{9mo} ; * $P < 0.05$, T_0 vs T_{6mo} and T_{9mo} .

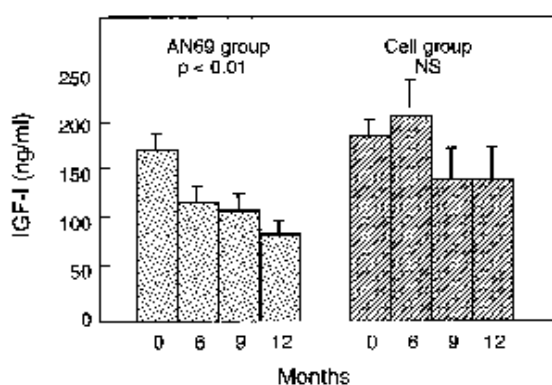


Fig. 1. Plasma IGF-I concentrations (mean \pm SE) during treatment with either AN-69 polyacrylonitrile (AN-69) or diacetate cellulose (CELL) dialysis membranes, respectively, in patients of Lisbon centre during study months 0 through to 12. Five patients were dialysed with AN-69 membrane, and five others with CELL membrane. $P < 0.01$, T_0 vs T_{12mo} .

and 15.1 ± 7.4 , 15.7 ± 5.8 , 11.7 ± 5.0 , and 18.6 ± 5.05 pg/ml in CELL group, respectively. Plasma sIL-6R levels were 81.2 ± 7.9 , 69.0 ± 5.6 , 68.2 ± 8.9 , and 63.8 ± 8.1 ng/ml in AN-69 group, and 85.6 ± 7.0 , 77.2 ± 15.3 , 77.2 ± 15.3 , and 84.0 ± 9.9 ng/ml in CELL group, respectively. Of interest, when comparing all

available plasma levels from Lisbon centre patients at all time points ($n = 40$), a significant correlation was found between the plasma levels of sIL-6R and those of osteocalcin ($r = 0.54$, $P < 0.001$), of bone-specific alkaline phosphatase ($r = 0.60$, $P < 0.002$), and of cross-laps ($r = 0.48$, $P < 0.002$).

Bone histomorphometry

At the start of the study, the mean values of the three static parameters of bone formation and bone resorption measured in the 10 patients of the Lisbon centre were elevated compared with values in healthy subjects: osteoblast surface (Ob.S/BS; $n = 10$), $12.4 \pm 3.2\%$; osteoclast surface (Oc.S/BS; $n = 10$), $7.0 \pm 2.3\%$; osteoclast number (N.Oc; $n = 10$), $3.34 \pm 0.75/\text{mm}^2$. At the 9 months time point, the values of these bone formation and resorption parameters had significantly decreased in AN-69 group patients compared with baseline; in contrast, same values had significantly increased in CELL group patients. Figure 2 shows the increase and decrease of the three parameters in the former and the latter group, respectively.

Dynamic parameters of bone turnover in these patients are shown in Table 4. Mean MAR and BFR values decreased in AN-69 group by 17 and 31%, respectively, whereas mean MS did not change. In

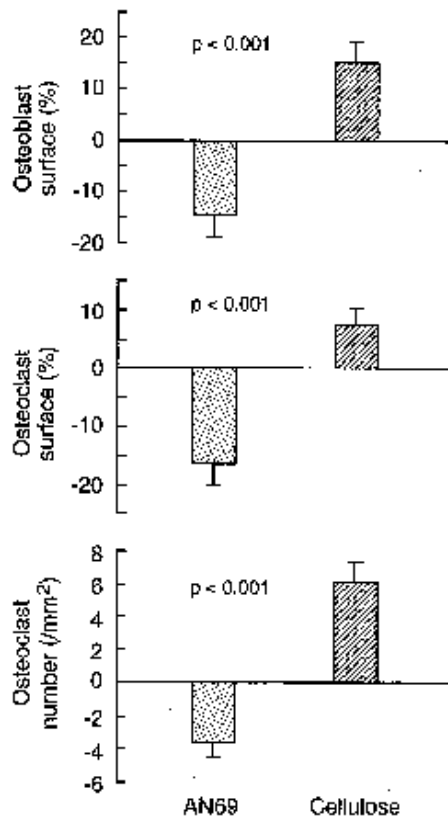


Fig. 2. Absolute changes (mean \pm SE) of bone formation and bone resorption parameters after treatment with either AN-69 polyacrylonitrile (AN-69) or diacetate cellulose (CELL) dialysis membranes, respectively, in patients of Lisbon centre at time point 9 months (second bone biopsy), compared with baseline values at 0 month (first bone biopsy). Osteoblast surface (Obl. S/BS), $n=5$ and 5, respectively; osteoclast surface (Ocl. S/BS), $n=5$ and 5, respectively; osteoclast number (Ocl. nr), $n=5$ and 5, respectively.

contrast, in the CELL group mean BFR and MS values increased by 50 and 48%; however, MAR remained unchanged. Although several of these changes were marked, none of them reached the level of statistical significance, presumably because of the small sample size.

Finally, Figure 3 shows a positive correlation between BFR and plasma IGFBP-5, and a negative correlation with IGFBP-4 at the start of study, when taking the values of all patients together. Similar positive and negative relations, respectively, were found with MAR and MS (data not shown).

Discussion

The major finding of this prospective study was an increase in bone cell number and activity in patients haemodialysed with CELL membrane whereas a decrease was observed in patients dialysed with polyacrylonitrile AN-69 membrane. This finding was based on repeat bone histomorphometry. Similar trends were also observed for dynamic parameters of bone turnover, with decreases in mean MAR and BFR in the AN-69 group, but increases in mean MS and BFR in the CELL group; however, these opposite changes did not reach the level of significance. These observations were made in the absence of significant changes of plasma intact PTH. As the mean starting plasma iPTH levels in both patient groups of our study were only modestly elevated and mean bone formation rate was only moderately elevated, this may have made the effects of different dialysis treatments more difficult to determine. Nonetheless, it is noteworthy that the improvement of skeletal activity in association with the synthetic, highly permeable dialysis membrane

Table 3. IGF system components (reference values) in AN-69 group ($n=5$ patients) and CELL group ($n=5$ patients) of Lisbon centre from start to end of study (mean \pm SEM; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs T_{0mo})

	T_{0mo}	T_{6mo}	T_{9mo}	T_{12mo}
<i>AN-69 group</i>				
Total IGF-I (45–288 ng/ml)	157 \pm 26	109 \pm 22*	113 \pm 15*	81 \pm 12**
Free IGF-I (0.94–9.4 ng/ml)	1.8 \pm 0.6	1.23 \pm 0.2*	1.42 \pm 0.1*	1.12 \pm 0.1
IGF-II (324–582 ng/ml)	896 \pm 73	784 \pm 91	703 \pm 21	746 \pm 89
IGFBP-1 (0.1–17 ng/ml)	47 \pm 14	48 \pm 6	67 \pm 15	93 \pm 15*
IGFBP-2 (121–1172 ng/ml)	2635 \pm 82	2581 \pm 325	2500 \pm 205	3200 \pm 233*
IGFBP-3 (1140–4968 ng/ml)	4794 \pm 736	3875 \pm 672	4168 \pm 467	3873 \pm 582
IGFBP-4 (160–796 ng/ml)	3100 \pm 550	2686 \pm 345	2728 \pm 453	2918 \pm 370
IGFBP-5 (319–713 ng/ml)	698 \pm 120	441 \pm 117*	391 \pm 44*	504 \pm 147
IGFBP-6 (41–198 ng/ml)	3763 \pm 1246	2551 \pm 267	2627 \pm 435	2557 \pm 420
<i>CELL group</i>				
Total-IGF-I (45–288 ng/ml)	173 \pm 35	205 \pm 35	143 \pm 28	142 \pm 26
Free IGF-I (0.94–9.4 ng/ml)	1.9 \pm 0.18	1.96 \pm 0.14	2.0 \pm 0.41	1.42 \pm 0.18
IGF-II (324–582 ng/ml)	848 \pm 60	791 \pm 29	757 \pm 38	788 \pm 23
IGFBP-1 (0.1–17 ng/ml)	51 \pm 21	46 \pm 12	53 \pm 19	71 \pm 19
IGFBP-2 (121–1172 ng/ml)	2607 \pm 239	2239 \pm 368	2178 \pm 365	2287 \pm 199
IGFBP-3 (1140–4968 ng/ml)	4098 \pm 345	4284 \pm 428	3969 \pm 338	4031 \pm 340
IGFBP-4 (160–796 ng/ml)	3230 \pm 247	2458 \pm 203	2865 \pm 392	2668 \pm 296
IGFBP-5 (319–713 ng/ml)	318 \pm 45	451 \pm 85	497 \pm 66*	372 \pm 105
IGFBP-6 (41–198 ng/ml)	3763 \pm 409	3894 \pm 274	3737 \pm 399	3780 \pm 295

Table 4. Dynamic parameters of bone turnover in AN69 group ($n=5$) and CELL ($n=5$) group patients of Lisbon centre at start ($T_{0mo.}$) and end ($T_{9mo.}$) of study (mean \pm SEM, $P=NS$)

Parameter	AN-69 group		CELL group	
	$T_{0mo.}$	$T_{9mo.}$	$T_{0mo.}$	$T_{9mo.}$
MAR ($\mu\text{m}/\text{day}$)	1.79 ± 0.33	1.48 ± 0.17	1.43 ± 0.15	1.38 ± 0.15
MS (%)	22.8 ± 8.2	22.6 ± 3.3	19.7 ± 5.1	28.7 ± 3.7
BFR ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}/\text{day}$)	0.49 ± 0.23	0.34 ± 0.08	0.26 ± 0.06	0.39 ± 0.07

MAR, mineral apposition rate (normal values $0.63 \pm 0.17 \mu\text{m}/\text{day}$); MS, mineralizing surface (normal values $14.2 \pm 1.3\%$); BFR, bone formation rate (normal values $0.3 \pm 0.05 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}/\text{day}$).

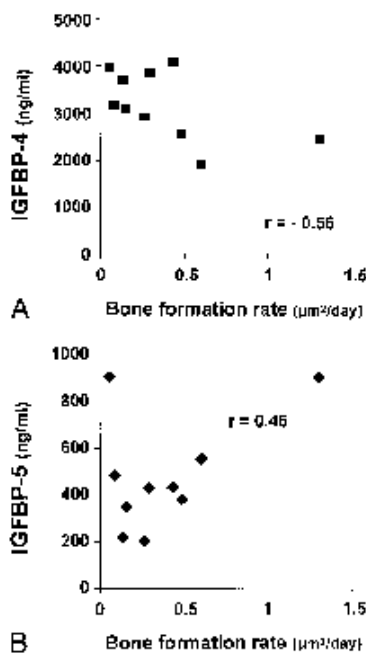


Fig. 3. Correlations between IGFBP-4, IGFBP-5 and bone formation rate in patients of Lisbon centre at start of study. Five patients were dialysed with AN-69 membrane, and five others with CELL membrane.

brought about a return to the upper range of normal, whereas the use of cellulosic membrane led to an aggravation of skeletal turnover. The present study confirms our previous hypothesis, based on findings made in a retrospective study, of an association between bone turnover and type of dialysis membrane [2].

The second important finding of this study was the progressive decrease of total and free plasma IGF-I concentrations in the AN-69 patient group whereas no significant change occurred in the CELL group. This latter observation is in keeping with the well-known role of IGF-I in the modulation of bone turnover, in that high IGF-I levels stimulate bone formation whereas low levels are associated with a reduction of

bone turnover [4]. It remains to be established whether the changes in serum levels of IGFBPs are the cause or consequence of the decrease in IGF-I levels in AN-69 group patients. Both IGFBP-1 and -2 are known to inhibit IGF-I action [6] whereas IGFBP-5 plays a key role in regulating bone formation [7]. Clinical studies in patients with metabolic bone diseases revealed that IGFBP-1 and -2 levels are negatively, but IGFBP-5 levels positively correlated with bone mineral density and histological indices of bone formation [4,8]. Our finding of a positive correlation between bone formation rate and plasma IGFBP-5, and a negative relation between bone formation rate and plasma IGFBP-4 in all Lisbon patients together is in agreement with these reports. Of note, no correlation was found between plasma iPTH and any of the IGF system components.

Our observations raise a number of intriguing questions. The first is why there were no concomitant changes of circulating markers considered to reflect bone activity (except the above mentioned changes of IGF system components). One would have expected the same directional changes of these markers as the ones indicated by histomorphometrically assessed bone parameters. One possibility is that circulating markers are less reliable than bone biopsy findings to assess changes of bone turnover in individual patients. This is particularly true in the case of normal or low bone turnover [9]. Another possibility is the small number and the low degree of homogeneity of the present patient population at the start of the study. This, together with the relatively weak sensitivity of available bone turnover markers in the circulation, may have prevented us from observing significant differences when in fact changes of moderate degree did occur. A third possibility is that whereas plasma markers are thought to reflect the average turnover of the entire skeleton bone biopsy can only inform, strictly speaking, about the focal condition at the site of bone tissue sampling. As bone biopsy usually provides better information about spongy bone than about cortical bone, one could speculate that the observed differences in osteoblast and osteoclast numbers and surface between the two groups of patients mainly reflect differences in spongy bone.

We also failed to observe a change of the plasma cytokine IL-6 or its circulating receptor sIL-6R. IL-6, which is produced by osteoblasts, is an established

factor of osteoclast activation, independent of the OPG/OPG-L (osteoprotegerin and osteoprotegerin-ligand) system [10]. In our patients, IL-6 was only correlated with CRP (data not shown), indicating its implication in the inflammatory state of uraemia. However, sIL-6R was correlated with markers of bone formation (bAP and osteocalcin) and bone resorption (cross-laps), which is in favour of a role in uraemic osteodystrophy. Circulating levels of cytokines probably do not reflect well the situation at the bone tissue level. The stimulation of other cytokines by cellulosic dialysis membranes, but not by synthetic membranes, and the subsequent interference with cellular and subcellular processes involving the skeletal action of PTH, vitamin D and other hormones and cytokines is also possible.

The second question is why plasma total IGF-I concentrations decreased with highly biocompatible AN-69 membrane, but not with less biocompatible CELL membrane. As the AN-69 membrane is known to adsorb numerous plasma proteins onto its surface, in contrast to cellulosic membrane [11], it is possible that circulating IGF-I is regularly removed during dialysis sessions with the former, but not the latter type of membrane. The results of a recent study appear to plead against such a possibility as no acute change of plasma IGF-1 concentration were observed during a dialysis session with AN-69 membrane [11]. Moreover, plasma IGF-1 is not necessarily modified by other types of biocompatible membranes. Thus, in a previous study aimed at examining the long-term effect of membrane biocompatibility on nutritional parameters, no difference in pre-dialysis serum total IGF-I values was observed between two groups of chronic haemodialysis patients treated for 18 months with either cellulosic membrane or polymethylmethacrylate (PMMA) membrane [12]. However, the physical properties and biocompatibility characteristics of the latter are different from those of AN-69 membrane. Another possibility would be an aggravation in the nutritional status of our patients treated with AN-69 membrane, compared with CELL membrane. However, there was no clinical or biochemical evidence in support of this theory. In contrast, highly biocompatible membranes have been recently shown to offer an advantage over cellulosic membranes in terms of morbidity and mortality [13–15].

The third question is what may be the relative importance of the IGF system, compared with other endocrine systems such as the PTH–vitamin D axis, for the metabolic activity of the skeleton in uraemic patients. In case of severe secondary hyperparathyroidism, high bone turnover is mainly a result of this cause and associated conditions such as insufficient calcium intake and vitamin D deficiency. However, at present parathyroid overfunction is generally better controlled than 10–20 years ago, and other factors may come into play which were previously less important or simply neglected. Thus, it has become clear that bone turnover is regulated by numerous factors other than calcium, phosphate, PTH, and vitamin D. The role of

numerous growth factors and cytokines in the regulation of bone metabolism has been progressively elucidated during recent years. Disturbances of the activity of several of these factors may play a role in uraemic bone disease as well [16]. To what extent such disturbances may be reflected by changes in circulating concentrations of such factors or only by local changes in concentration or activity, remains to be seen. The IGF system is one of them, and changes of circulating IGF and IGFBPs such as plasma IGFBP-4 and IGFBP-5 have been shown to be associated with abnormal bone turnover in uremia [4,17]. Thus, total and free IGF-I was lower in haemodialysis patients with osteopenia than in those without osteopenia [4], in accord with other studies in osteoporosis patients without renal failure [8,18,19]. Recently, Garnero *et al.* reported that in 435 healthy post-menopausal women decreased serum concentrations of IGF-I were strongly associated with an increased risk of osteoporotic fractures independently of bone mineral density [20]. In this study, however, serum IGF-I concentrations explained less than 6% of the inter-individual variance of bone mineral density at any skeletal sites. Studies in smaller groups of renal failure patients found no relationship between IGF-I levels and bone metabolism. Coen *et al.* failed to identify a correlation between plasma IGF-I levels and bone formation parameters in pre-dialysis patients [21]. In dialysis patients, Weinreich *et al.* were unable to find a difference in plasma IGF-I, IGF-II, IGFBP-2, or IGFBP-3 levels between two groups having either severe secondary hyperparathyroidism or adynamic bone disease [22]. The conflicting results of the links between serum IGF-I and bone metabolism could be because of different underlying metabolic diseases such as diabetes or obesity and differences in nutritional status [23, 24]. It remains to be determined whether IGFBP-5 is a more sensitive bone marker than IGF-I concentrations.

In conclusion, dialysis with CELL membrane was associated with stimulation of bone turnover whereas the use of AN-69 membrane slowed down bone cell activity, suggesting a beneficial effect of the latter on uraemic bone disease. However, the issue whether the observed association between the decrease in plasma IGF-I and the reduction of histologic parameters of bone formation and resorption is causal or coincidental requires further study. Moreover, the results of the present work need to be confirmed in a larger patient population.

Acknowledgements. The authors wish to thank Maria João Galvão, Hospital Curry Cabral, for her skillful assistance in preparing bone biopsies for histomorphometry analyses. It is also acknowledged that the study has been conducted with financial support by the Hospital Company.

References

1. van Ypersele de Strihou C, Drüeke T, eds. *Dialysis Amyloid. Oxford Clinical Nephrology Series.* Oxford University Press, Oxford, Great Britain: 1996

2. Ferreira A, Ureña P, Ang KS *et al.* Relationship between serum β 2-microglobulin, bone histology and dialysis membranes in uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: 1701–1707
3. Ferreira A, Simon P, Drüeke TB, Descamps-Latscha B. Potential role of cytokines in renal osteodystrophy. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 399–400
4. Jehle PM, Ostertag A, Schulten K *et al.* Insulin-like growth factor system components in hyperparathyroidism and renal osteodystrophy. *Kidney Int* 2000; 57: 423–436
5. de Vernejoul MC, Belenguer R, Halkidou H, Buisine A, Bielakoff J, Miravet L. Histomorphometric evidence of deleterious effect of aluminum on osteoblasts. *Bone* 1985; 6: 15–20
6. Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulations and functions. *Endocrin Rev* 1997; 18: 801–831
7. Richman C, Baylink DJ, Lang K, Dony C, Mohan S. Recombinant human insulin-like growth factor binding protein-5 stimulates bone formation parameters in vitro and in vivo. *Endocrinology* 1999; 140: 4699–4705
8. Jehle PM, Jehle DR, Mohan S, Boehm BO. Serum levels of insulin-like growth factor system components and relationship to bone metabolism in type 1 and type 2 diabetes mellitus patients. *J Endocrinol* 1998; 159: 297–306
9. Fournier A, Yverneau PH, Hué P *et al.* A dynamic bone disease in uremic patients. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1994; 3: 396–410
10. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Min Res* 2000; 15: 2–12
11. Bohé J, Joly M-O, Arkouche W, Laville M, Fouque D. Haemodialysis with the biocompatible high permeability AN-69 membrane does not alter plasma insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 590–594
12. Parker-III TF, Wingard RL, Husni L, Ikizler TA, Parker RA, Hakim RM. Effect of the membrane biocompatibility on nutritional parameters in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 1996; 49: 551–556
13. Hornberger JC, Chernew M, Petersen J, Garber AM. A multivariate analysis of mortality and hospital admissions with high-flux dialysis. *J Am Soc Nephrol* 1993; 3: 1227–1237
14. Hakim RM, Held PJ, Stannard DC *et al.* Effect of the dialysis membrane on mortality of chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 1996; 50: 566–570
15. Bloembergen WE, Hakim RM, Stannard DC *et al.* Relationship of dialysis membrane and cause-specific mortality. *Am J Kidney Dis* 1999; 33: 1–10
16. Gonzalez EA. The role of cytokines in skeletal remodeling: possible consequences for renal osteodystrophy. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 945–950
17. Andress DL, Pandian MR, Endres DB, Kopp JB. Plasma insulin-like growth factors and bone formation in uremic hyperparathyroidism. *Kidney Int* 1989; 36: 471–477
18. Wüster C, Blum WF, Schlemich S, Ranke MB, Ziegler R. Decreased serum levels of insulin-like growth factors and IGF-binding protein 3 in osteoporosis. *J Intern Med* 1993; 234: 249–255
19. Reed BY, Zerwekh JE, Sakhae K, Breslau NA, Gottschalk F, Pak CY. Serum IGF1 is low and correlated with osteoblastic surface in idiopathic osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1995; 10: 1218–1224
20. Garnero P, Sornay-Rendu E, Delmas PD. Low serum IGF-1 and occurrence of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *Lancet* 2000; 355: 898–899
21. Coen G, Mazzaferro S, Ballanti P *et al.* Plasma insulin-like growth factor-I and bone formation parameters in predialysis chronic renal failure. *Miner Electrolyte Metab* 1991; 17: 153–159
22. Weinreich T, Zapf J, SchmidtGayk H, Ritzel H, Delling G, Reichel H. Insulin-like growth factor 1 and 2 serum concentrations in dialysis patients with secondary hyperparathyroidism and adynamic bone disease. *Clin Nephrol* 1999; 51: 27–33
23. Bang P, Brismar K, Rosenfeld RG, Hall K. Fasting affects serum insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins differentially in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus versus healthy nonobese and obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 960–967
24. Nyomba BLG, Berard L, Murphy LJ. Free insulin-like growth factor I (IGF-I) in healthy subjects: relationship with IGF-binding proteins and insulin sensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 2177–2181

Received for publication: 29.9.00

Accepted in revised form: 6.2.01

5.4. Efeito da técnica de hemodiálise nos níveis séricos do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (manuscrito 17)

Face à ausência de quaisquer informações na literatura médica, decidimos investigar se, para além do tipo de membrana (discutido nos capítulos anteriores), também o grau de convecção atingida durante a sessão de hemodiálise contribui para a remoção (por ultrafiltração e/ou por adsorção à membrana) do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).

Esta citocina participa diretamente na ativação osteoclástica, mediante a ligação a um recetor específico existente na superfície destas células e independentemente do eixo OPG/RANK/RANKL (que também faz parte da família do fator de necrose tumoral) (116; 76; 35)

Avaliámos prospectivamente os efeitos da convecção e da ultrafiltração nos níveis séricos de TNF- α num grupo de 24 doentes prevalentes em hemodiálise.

Foram utilizadas membranas de hemodiálise sintéticas de polissulfona (baixa e alta permeabilidade) e comparada a técnica de hemodiálise convencional com a técnica de hemodiafiltração “*on-line*”. Nesta última, otimizámos o efeito convectivo através da infusão (em pré-diluição) de 100 mL/minuto de um líquido de substituição produzido a partir de água “ultrapura”.

Nestas condições, em que otimizámos a convecção e a ultrafiltração durante a sessão de hemodiafiltração “*on line*” com utilização de uma membrana de polissulfona de alta permeabilidade, verificámos que todos os doentes apresentavam redução dos níveis séricos de TNF- α no final da sessão.

Tendo em conta que assistimos a uma crescente utilização destas técnicas de elevada convecção (que implicam o recurso a membranas de alta permeabilidade e mais biocompatíveis), os resultados dos nossos estudos acima descritos apontam para um efeito aditivo na redução dos níveis circulantes de citocinas moduladoras da remodelação óssea.

Recentemente, outros autores demonstraram a redução de citocinas envolvidas na remodelação óssea, nomeadamente da IL-1, IL6 e do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) mediante a utilização de uma membrana sintética de alta permeabilidade (poliacrilonitrilo) e biofiltração sem acetato (117).

On-line haemodiafiltration decreases serum TNF α levels in haemodialysis patients

Sir,
Blood contact with the dialysis membrane has been documented as a major cause of cytokine activation and release. This interaction is associated with haemodialysis-related acute manifestations, such as fever and hypotension (less frequent at present) [1], and chronic morbidity like inflammation, malnutrition, atherosclerosis, cardiovascular disease, anaemia and even a higher mortality rate [1,2]. Increased cytokine production/activation may also be responsible for bone remodelling, participating in the stimulation/inhibition of osteoclasts and osteoblasts and the aggravation of β -2-microglobulin amyloidosis [3].

The response to erythropoietin in haemodialysis patients also seems to be mediated by various cytokines that participate directly in the erythropoietic process [4]. We had the opportunity to demonstrate that in a group of chronic haemodialysis patients the change from low- to high-flux polysulfone membranes permitted a significant reduction in erythropoietin requirements for the maintenance of a stable haemoglobin at 11.5 g/dl [5]. These results may compensate, by saving erythropoietin, the increased cost associated with the use of high flux membranes and on-line haemodiafiltration.

An increased cytokine activation secondary to blood exposition to bioincompatible dialysis components has been reported by several authors. Different cytokines are involved

in the chronic inflammation that results from this bioincompatibility of the haemodialysis treatment. Among the cytokines most widely linked to the inflammatory response has emerged the tumour necrosis factor (TNF α). Unfortunately, most authors compare different types of membranes, with variable degrees of biocompatibility and diffusive/convective properties, making an individual evaluation of each of these properties very difficult as well as of their influence on cytokine activation.

With the purpose of separately evaluating the effects of increased convective capacity on the serum levels of cytokines, we used synthetic membranes of the same type (polysulfone) during low-flux haemodialysis, high-flux haemodialysis and high-flux + on-line haemodiafiltration.

A prospective study was carried out in 24 patients who were on intermittent haemodialysis for > 3 months. We measured the serum levels of C3c (185 kDa), C4 (205 kDa) and TNF α (19 kDa) at the beginning and end of the 'mid-week dialysis session' during three consecutive weeks. TNF α serum levels were measured by quantitative immunoassay RD systems.

During the first week, a low-flux polysulfone was used (ultrafiltration coefficient between 11.1 and 18 ml/h/mmHg); during the second week a high-flux polysulfone was used (ultrafiltration coefficient between 40 and 55 ml/h/mmHg); and finally, during the third week the same membrane as the week before was used but with the on-line haemodiafiltration technique. All of these membranes were steam sterilized and not recycled. The blood pump rate was > 300 ml/min and the dialysate pump rate was 800 ml/min. We used

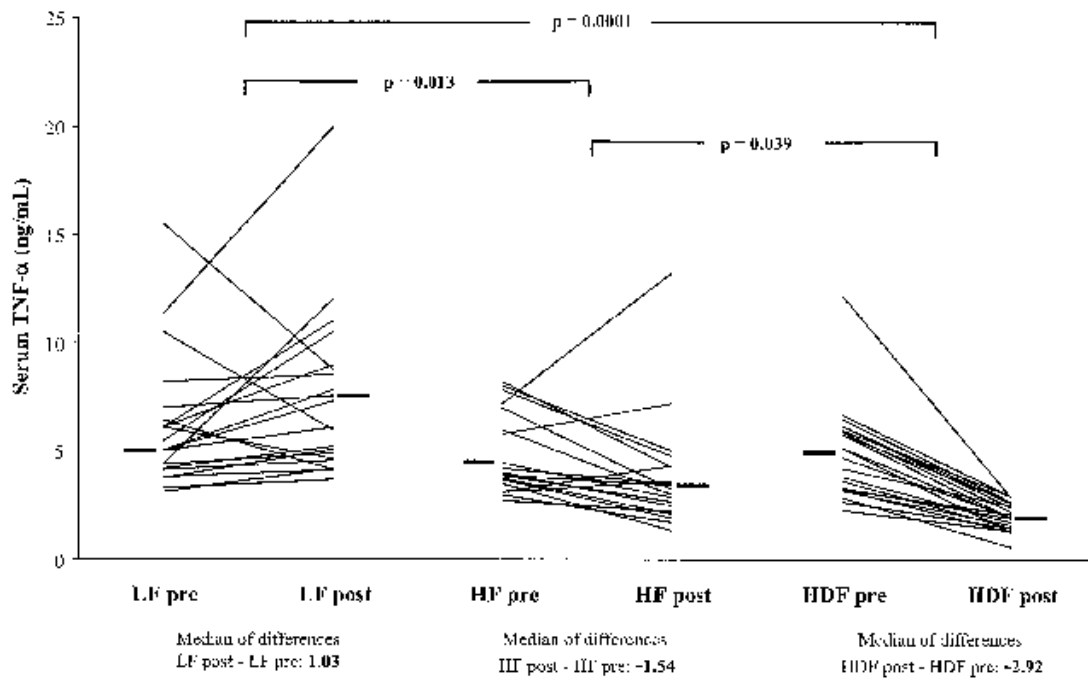


Fig. 1. Serum TNF α levels before (pre) and at the end (post) of renal replacement therapy. Bold horizontal bars are median. HF, high-flux haemodialysis; LF, low-flux haemodialysis; HDF, high-flux haemodialysis + on-line haemodiafiltration.

pre-dilution on-line haemodiafiltration, with a reposition volume of 100 ml/min (Hemodiafiltration 4008-H Fresenius monitor). The water used was endotoxin-free (measured by Chromogenic Kinetic LAL assay).

The variations between post- and pre-treatment TNF α serum levels during low-flux haemodialysis, high-flux haemodialysis and high-flux + on-line haemodiafiltration, respectively, are shown in Figure 1. Differences between the three groups were evaluated by Friedman test. Wilcoxon signed ranks test was used for pairwise comparison. A *P*-value <0.05 was considered statistically significant.

As shown in Figure 1, the serum levels of TNF α increased during the low-flux session, but decreased during the high-flux session and decreased even more during on-line haemodiafiltration. This profile was seen in all of the 24 patients undergoing on-line haemodiafiltration.

The serum levels of C3c and C4 increased during all three types of dialysis, but significantly less so with the on-line haemodiafiltration technique. This points to the importance of ultrafiltration for the removal of these molecules. The increments during the dialysis session of serum C3c and C4 levels were, respectively: in low-flux dialysis, 31.9 and 9.1 mg/dl; in high-flux haemodialysis, 40.1 and 13.8 mg/dl; and in high-flux + on-line haemodiafiltration, 14.3 and 5.3 mg/dl. The increment in C3c and C4 during on-line haemodiafiltration was significantly lower than that observed in high-flux dialysis (*P*=0.04 and 0.003, respectively) and low-flux dialysis (*P*=0.004 and 0.003, respectively).

Our results show that the potentiation by on-line haemodiafiltration of the convective effect of high-flux polysulfone membranes optimizes their efficacy in terms of solute removal, as demonstrated by the observed decrease in the serum levels of pro-inflammatory cytokines such as TNF α . Although these results need to be confirmed on a long-term basis and in larger cohort studies, they point to the potential advantages of more convective techniques such as on-line haemodiafiltration in reducing the chronic inflammatory response and the morbidity of chronic haemodialysis patients.

¹Hemodial-Vila Franca de Xira
²Immunology Department
 Hospital de Curry Cabral
 Lisbon
 Portugal
 Email: anibalferreira@netcabo.pt

Célia Gil¹
 Carlos Lucas¹
 Cristina Possante¹
 Cristina Jorge¹
 Fernanda Gomes¹
 Maria Candeias²
 Helena Lages²
 Emília Arranhado²
 Anibal Ferreira¹

1. Pertosa J, Grandaliano G, Gesualdo L, Schena FP. Clinical relevance of cytokine production in hemodialysis. *Kidney Int* 2000; 58: S104-S111
2. Panichi V, Migliori M, De Pietro S *et al.* The link of biocompatibility to cytokine production. *Kidney Int* 2000; 58: S96-S103
3. Ferreira A, Ghazali A, Galvao J *et al.* Effect of type of dialysis membrane on bone in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1230-1238
4. Vilaverde M, Perez-Garcia R, Verde E *et al.* High-flux polysulfone improves the response to recombinant human erythropoietin (rh-EPO) in patients on long term hemodialysis (HD). *Nefrologia* 1999; 19: 161-167
5. Gil C, Possante M, Catarino MC *et al.* Low flux versus high flux membranes in chronic hemodialysis patients (abstract). *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: A218.

5.5. Citoquinas, marcadores bioquímicos e histomorfometria óssea: proposta de modelo de integração, para avaliação repetida e não invasiva da remodelação óssea em hemodialisados (manuscrito 18)

Apesar da biopsia óssea com avaliação qualitativa e histomorfométrica ser o método mais sensível e específico no diagnóstico da patologia óssea do doente urémico, a sua utilização na atividade clínica nefrológica é limitada por diversos fatores:

1) trata-se de um ato invasivo frequentemente recusado pelos doentes e pelos seus médicos;

2) os centros com experiência confirmada, na avaliação diagnóstica das biopsias ósseas de osso não descalcificado, são escassos a nível mundial;

3) a biopsia óssea apenas permite obter uma “fotografia”, num determinado momento, da remodelação, mineralização e volume ósseo, sendo difícil a repetição desta técnica invasiva para avaliar eventuais modificações destes parâmetros.

Como temos vindo a descrever ao longo deste capítulo, para além dos marcadores convencionais da remodelação óssea (séricos e plasmáticos), particular atenção tem vindo a ser dada à investigação do papel das citoquinas, fatores de crescimento (e respetivos antagonistas e recetores solúveis), na remodelação e mineralização óssea.

Tendo em conta que estas moléculas atuam a nível autócrino, parácrino e endócrino e que são, frequentemente, os interlocutores finais de diversas linhagens celulares envolvidas no metabolismo ósseo, a sua quantificação parece ser relevante.

Na sequência dos nossos estudos anteriormente descritos, decidimos testar a possibilidade de integrar os resultados dos níveis séricos de marcadores clássicos da remodelação óssea com os resultados dos doseamentos séricos de diversas citoquinas envolvidas neste processo, de forma a construir um modelo para a avaliação não invasiva da remodelação óssea.

Este modelo, que teria a vantagem de poder ser utilizado de forma repetida, teria de ser previamente confrontado e validado com o exame histomorfométrico efetuado em lâminas de osso não descalcificado.

Realizámos um estudo prospetivo em 47 hemodialisados, no qual foram incluídos todos os doentes (com pelo menos de 6 meses em hemodiálise) que foram por nós biopsados durante um período de 24 meses.

As biopsias ósseas foram realizadas, a pedido dos nefrologistas assistentes dos doentes, por haver suspeita de patologia óssea não esclarecida, dificuldade na interpretação dos marcadores séricos ou necessidade de exclusão de depósitos significativos de alumínio, em doentes candidatos a paratiroidectomia.

Determinámos os níveis circulantes de marcadores convencionais da remodelação óssea (como a paratormona e a fosfatase alcalina) e de diversas citocinas envolvidas no metabolismo ósseo e mineral.

Nesta investigação, para além dos doseamentos de interleucina-1 (IL-1) do antagonista do recetor da interleucina-1 (IL-1Ra) e da interleucina-6 (IL-6) por métodos convencionais de Elisa (realizados no INSERM U 507-Service de Néphrologie, do Hospital Necker, Paris) utilizámos, pela primeira vez em doentes urémicos, uma nova técnica de citometria de fluxo para determinação simultânea de diversas citocinas envolvidas na remodelação óssea.

No laboratório de imunologia, do Serviço de Nefrologia do Hospital Curry Cabral, utilizámos esta técnica inovadora de determinação simultânea de diversas citocinas, num pequeno volume de amostra (apenas 50 microlitros), por método de citometria de fluxo.

Por este método, determinámos os níveis circulantes de interleucina-1beta (IL-1 β); IL-6, interleucina-8 (IL-8), interleucina-10 (IL-10), interleucina 12p70 (IL-12p70) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α).

Neste estudo observámos associações significativas entre os níveis circulantes de diversas citocinas e diferentes parâmetros histomorfométricos, incluindo correlações entre os níveis de IL-1Ra, sIL-6r e IL-10 com a área óssea total.

Os níveis circulantes de IL-1, IL-6, IL-12p70 e de TNF- α , correlacionaram-se positivamente com a taxa de formação óssea (BFR-bone formation rate).

Por análise de regressão múltipla, os níveis de IL-1Ra e de IL-10 foram preditores independentes da área óssea, os níveis de IL-6 e de IL-12p70 foram preditores da taxa de aposição mineral (MAR) e os níveis de IL-12p70 foram preditores da taxa de formação óssea (BFR).

Num modelo de regressão linear que elaborámos, 61,1% da variação média da taxa de formação óssea observada neste grupo de doentes podia ser explicada pelos níveis circulantes de fosfatase alcalina total, IL-12p70 e de albuminemia.

Os nossos resultados ilustram a possibilidade de integrar, num mesmo modelo, resultados dos níveis circulantes de marcadores da remodelação óssea, com os resultados dos níveis circulantes de diversas citocinas envolvidas no metabolismo ósseo, de forma a otimizar as possibilidades de diagnóstico não invasivo da remodelação óssea.

Sendo a interação exercida pelas células envolvidas na remodelação óssea mediada por citocinas e fatores de crescimento (que exercem os seus efeitos de forma autócrina, parácrina ou mesmo à distância), a caracterização destes mecanismos fisiopatológicos é relevante no diagnóstico e terapêutica da osteodistrofia renal, tal como é igualmente defendido por Malluche e colaboradores (118).

A sua avaliação e caracterização (localmente no tecido ósseo e sistemicamente, nas formas circulantes) poderão diminuir as limitações atualmente presentes na avaliação não invasiva da remodelação óssea, surgindo como um complemento aos doseamentos de marcadores bioquímicos clássicos.

Evaluation of bone remodeling in hemodialysis patients: serum biochemistry, circulating cytokines and bone histomorphometry

Aníbal Ferreira¹, Maria Saraiva¹, Geert Behets², Ana Macedo³, Maria Galvão¹, Patrick D'Haese², Tilman B. Drüeke⁴

¹Department of Nephrology, Hospital Curry Cabral, Lisbon - Portugal

²University of Antwerp, Antwerp - Belgium

³Key-Point, Lisbon - Portugal

⁴U-845 and Department of Nephrology, Necker Hospital, Paris - France

ABSTRACT

Background: To optimize the noninvasive evaluation of bone remodeling, we evaluated, besides routine serum markers, serum levels of several cytokines involved in bone turnover.

Methods: A transiliac bone biopsy was performed in 47 hemodialysis patients. Serum levels of intact parathyroid hormone (iPTH; 1-84), total alkaline phosphatases (tAP), calcium, phosphate and aluminum (Al) were measured. Circulating levels of interleukin-6 (IL-6), IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and soluble IL-6 receptor (sIL-6r) were determined using ELISA. Circulating IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) were simultaneously quantified by flow cytometric immunoassay.

Results: Patients with low/normal bone formation rate (L/N-BFR) had significantly lower serum iPTH ($p < 0.001$) and tAP ($p < 0.008$) and significantly higher Al ($p < 0.025$) than patients with high BFR. Serum calcium and phosphorus, however, did not differ ($p = NS$). An iPTH > 300 pg/mL in association with tAP > 120 U/L showed low sensitivity (58.8%) and low negative predictive value (44.0%) for the diagnosis of high BFR disease. An iPTH < 300 pg/mL in association with normal or low tAP, < 120 U/L, was associated with low sensitivity (66.7%) but high specificity (97.1%) for the diagnosis of L/N-BFR. Serum IL-1, IL-6, IL-12p70 and TNF- α were positively

correlated with BFR, serum IL-1Ra and IL-10 with bone area, and by multiple regression analysis, tAP and IL-6 were independently predictive of BFR.

Conclusions: Significant associations were found between several circulating cytokines and bone histomorphometry in dialysis patients. The usefulness of these determinations in the noninvasive evaluation of bone remodeling needs to be confirmed in larger dialysis populations.

Key words: Bone biopsy, Cytokines, Histomorphometry, Intact parathyroid hormone, Renal Osteodystrophy, Total alkaline phosphatases

INTRODUCTION

Renal osteodystrophy is a multifactorial disorder of bone remodeling, bone mineralization and/or bone quality (volume and structure). It occurs early during the course of chronic kidney disease (CKD; in stage 3), as part of CKD-related bone and mineral disorder (CKD-MBD) (1, 2). Disturbances of bone and mineral metabolism are particularly marked in patients undergoing renal replacement therapy and after kidney transplant, and have been associated with an increase

in extraskeletal calcifications, morbidity and mortality (3). The bone biopsy remains the gold standard in the evaluation of bone remodeling and bone mineralization (4). According to the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) consensus definition, it is proposed that the term *renal osteodystrophy* be used exclusively to define changes in bone morphology (requiring a bone biopsy) observed in patients with CKD (1).

Bone histomorphometry is not used in the majority of CKD patients, although it may be of considerable help in the diagnosis of patients with atypical or unexplained skeletal features. Moreover, it remains of great value for direct measurement of bone turnover and also for research purposes. The evaluation of bone turnover (T), bone mineralization (M) and bone volume (V), provided by bone biopsy, would represent the most useful information for clinical practice (TMV classification), as proposed by the KDIGO recommendations (1). Bone biopsy, an invasive procedure which is not easily accepted by CKD patients in most countries, gives a picture of bone morphology at a given point in time (5). Even though it allows the quantification of numerous static and dynamic histomorphometric parameters, bone histology should always be interpreted by the nephrologist in conjunction with clinical, biochemical and epidemiological data. The noninvasive assessment of bone remodeling using new circulating biomarkers is of particular interest in this respect (6).

Serum parathyroid hormone (PTH) levels have become the preferred surrogate measure of bone disease in CKD patients. However, it is limited by lack of sensitivity in the clinical setting (7, 8), particularly in the diagnosis of low-turnover bone disease (9). Because it had become apparent that the second-generation PTH assays measuring the so-called intact PTH (iPTH) at the same time assessed large fragments of the polypeptide (10), novel third-generation assays have been developed to measure the whole PTH molecule alone. The problem with the third-generation assays is that they still need to be validated with respect to bone histomorphometry (10-12). The currently available correlations between serum PTH and bone histomorphometry have all been obtained with second-generation iPTH assays. In addition to this major methodological problem, the specificity of PTH as an indicator of bone turnover also has been questioned by different authors (4, 7, 13, 14).

In the last few decades, numerous circulating markers of bone turnover have been proposed for the noninvasive evaluation of bone remodeling. They include serum markers of bone formation such as osteocalcin, total alkaline phosphatases (tAP), bone-specific alkaline phosphatase (bAP) and procollagen type I C-terminal peptide (PICP), as well as markers of bone resorption such as pyridinoline, deoxypyri-

dinoline, tartrate-resistant acid phosphatase and procollagen type I C-terminal telopeptide (ICTP) (2, 6, 15, 16).

Some of these humoral markers may be useful in the discrimination between high and normal bone turnover (16-18), but their value remains more questionable for the diagnosis of adynamic bone disease (18, 19). A higher sensitivity and specificity in the noninvasive diagnosis of bone remodeling in CKD patients can be obtained by the combination of several of these markers of bone formation and bone resorption (6, 13, 17). However, a convincing distinction between normal- and low-turnover bone disease is much more difficult to achieve in the individual patient, based on the use of such noninvasive markers (9, 13, 14).

In the last few years, several groups of investigators, including ourselves, have demonstrated a major role for several local and circulating growth factors and cytokines in bone metabolism, in particular for the interaction between osteoclasts and osteoblasts (20, 21).

To optimize the noninvasive evaluation of bone remodeling, we evaluated, in addition to routine serum markers, the circulating levels of a variety of cytokines known to be involved in bone turnover. Abnormalities in several of these factors are frequently observed in CKD patients (22, 23). The goal of the present study was to evaluate the combined assessment of conventional serum markers of bone turnover with more recently discovered local activators and inhibitors such as cytokines and their receptors and antagonists in the noninvasive and sequential evaluation of bone remodeling.

SUBJECTS AND METHODS

The present study was performed in 47 white prevalent hemodialysis patients, 17 women and 30 men, aged 48.2 ± 15.0 years (mean \pm SD), and treated with a standard hemodialysis procedure of 3 x 4 hours/week, for a minimum duration of 6 months and a mean duration of 81.0 ± 52.5 months. None of the patients was diabetic, presented active liver disease or had been treated with steroids or bisphosphonates. Thirty-one patients were treated with calcitriol. The primary causes of CKD stage 5 were hypertension (n=12), glomerulonephritis (n=10), pyelonephritis (n=6), polycystic kidneys (n=5), interstitial nephrosis (n=5) and other (n=9). Patients were dialyzed with high-flux polysulphone dialyzer and volumetric monitors. Ultrapure water was used, and endotoxin levels were checked by the chromogenic kinetic limulus amoebocyte lysate (LAL) method.

All patients who had undergone a bone biopsy at our institution during a time period of 24 months were included in the study. The bone biopsies were performed based on requests by the treating nephrologists for a precise diagnosis

of the underlying osteopathy. The main reasons to perform a bone biopsy were a suspicion of aluminum-related bone disease or a history of significant aluminum exposure (after a treatment with aluminum-based phosphate binders), the indication of surgical parathyroidectomy (particularly in conjunction with previous or ongoing exposure to heavy metals such as aluminum or iron), unexplained hypercalcemia, severe bone pain and pathological fractures.

Bone biopsies

After informed consent was obtained, a transiliac (5-mm diameter) bone biopsy was performed. Iliac crest bone samples for mineralized bone histology and histomorphometry were fixed with ethanol at room temperature, dehydrated and embedded in methylmethacrylate. To measure not only static but also dynamic parameters of bone formation, biopsies were taken after double tetracycline administration (3 days on, 10 days off, 2 days on). These labels were visualized on unstained 10- μ m sections by fluorescence microscopy. Sections of 5 μ m were stained using the Goldner method and histomorphometrically analyzed for static parameters. Aluminum deposits on trabecular surface and in cortical bone were quantified after specific aluminon staining. A magnification of $\times 200$ was used.

All histomorphometric measurements were performed on a KS-400 image analysis system, running custom macro programs. To obtain histomorphometric and histodynamic measures, an interactive color video-based image analysis system was used.

Results have been reported according to standardized nomenclature (24). The following variables were measured: bone area (B.Ar), osteoid area (O.Ar), osteoid perimeter (O.Pm), eroded perimeter (E.Pm) and quiescent perimeter (Q.Pm). Double-labeled perimeter (dL.Pm) and total perimeter (tL.Pm) were measured on unstained sections. Per section, 10-15 consecutive fields were analyzed. Out of these primary measurements, the following derived parameters were calculated: bone area (B.Ar [%]): the area of trabecular bone including both mineralized bone and osteoid, expressed as a percentage of the total tissue area; osteoid area (O.Ar [%]): the measured area of osteoid, expressed as a percentage of total B.Ar; osteoid perimeter (O.Pm [%]): trabecular bone perimeter occupied by osteoid as a percentage of the total bone perimeter; osteoid width (O.Wi [μ m]): the mean width of surface osteoid seams, calculated by dividing the measured osteoid area by the length of the osteoid seams; eroded perimeter (E.Pm [%]): the percentage of trabecular bone perimeter characterized by the presence of scalloped bone resorptive lacunae; double-labeled perimeter (dL.Pm [%]):

percentage of total endosteal perimeter exhibiting a double fluorescent tetracycline label; mineral apposition rate (MAR [μ m/day]): the rate by which osteoid is mineralized, calculated as the average distance between midpoints of 2 consecutive tetracycline labels, divided by the time interval between the labeling periods (10 days); adjusted apposition rate (AjAr [μ m/day]): mineral apposition rate averaged over the entire osteoid perimeter; bone formation rate (BFR [μ m²/mm² per day]): area of bone formed per unit of time, with reference to tissue area, calculated as the product of mineral apposition rate and mineralizing perimeter; the latter is calculated as the sum of doubly labeled plus half of singly labeled perimeter per bone perimeter; osteoid maturation time (Omt [days]): the ratio of osteoid width (O.Wi/MAR, where O.Wi is measured in μ m and MAR in μ m/day); and mineralization lag time (Mlt [days]): mean interval between deposition and mineralization of any infinitesimal volume of matrix, averaged over the entire life span of the osteoid seam.

Patients were divided into 2 groups according to the accepted criteria for the diagnosis of high bone turnover (High BT) or low/normal bone turnover (Low-Norm BT) (25). A BFR $> 613 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ per day and the presence of fibrosis were used to define high-turnover bone disease (25). A BFR between 97 and $613 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ per day was considered normal (25). In 2 patients a diagnosis of normal bone turnover was made in the presence of higher BFR, due to the absence of fibrosis and the normality of all other static and dynamic parameters, underlining the relevance of a global evaluation of bone parameters.

The biopsies were examined and classified by 2 independent observers who had no knowledge of clinical and biochemical findings.

Serum biochemistry

Blood samples were withdrawn at the same time as the bone biopsies, and serum levels of iPTH, tAP, calcium, phosphorus, aluminum and circulating cytokines were evaluated. Serum iPTH was measured with a commercial immunoradiometric assay (Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, CA, USA), based on the double antibody technique. The normal iPTH range with this assay is 10-65 pg/mL.

Serum phosphorus and total calcium were also determined by standard automated techniques, with a normal range of 3.0-4.5 mg/dL and 8.8-10.5 mg/dL, respectively. Serum tAP was measured by a standard automated technique as well. Normal values were in the range of 35-120 U/L. Serum levels of aluminum were evaluated by electrothermal atomic absorption spectrometry with Zeeman background correction.

Serum circulating levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra), and soluble interleukin-6 receptor (sIL-6r) were determined by ELISA (Medgenix). Serum interleukin-1 (IL-1), IL-6, interleukin-8 (IL-8), interleukin-10 (IL-10); interleukin-12p70 (IL-12p70) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) were simultaneously quantified by flow cytometry using Becton Dickinson Cytometric Bead Array (BD-CBA) methodology. This flow cytometric immunoassay employs a series of particles (beads) with discrete fluorescence intensities to simultaneously detect multiple soluble analytes such as cytokines. Each bead in the BD-CBA kit provides a capture surface for a specific cytokine. The mixture of BD-CBA beads is in suspension in order to quantify the analytes by flow cytometry. The system uses the sensitivity of amplified fluorescence detection by flow cytometry to measure, in a small sample volume, soluble analytes in a particle-based immunoassay. We used the BD Human Inflammation CBA kit to measure the above-mentioned cytokine levels in a single sample. The beads with distinct fluorescence intensities coated with specific capture antibodies were mixed together and detected in the FL3 channel of the flow cytometer. This mixture (50 μ l/tube) was incubated with diluted recombinant standards (50 μ l/tube) as test samples (50 μ l/tube). After 1.5 hours of incubation (protected from light), the samples were washed with 1 mL wash buffer and centrifuged. The residual volume of 100 μ L was incubated for 1.5 hours protected from light with phycoerythrin (PE)-conjugated antibodies (50 μ l/tube). The tubes were again washed with 1 mL of wash buffer and centrifuged. Wash buffer (300 μ L) was added to each tube. The samples were acquired with Cell Quest Software in a BD FACS Scan. The flow cytometer setup was previously completed with FACSComp software in Lyse/No Wash mode with BD Calibrite beads. The cytometer setup for the BD-CBA was performed using Cytometer Setup Beads, a FITC Positive Control Detector and a PE Positive Control Detector to adjust the settings for side light scatter (SSC), forward light scatter (FSC), threshold, FL1 PMT, FL2 PMT, FL3 PMT and compensation settings. The number of events acquired was 1,800 to ensure that the sample file contained approximately 300 events per capture bead. Normal levels and limits of detection for cytokines in this cytometric bead array were determined in 8 volunteers (26). The analysis of BD-CBA data was optimized using the BD-CBA software, which uses several matrices to define the standard curves and quantitative results for each cytokine.

Statistical analysis

In descriptive analysis, variables were expressed as median values with range for continuous parameters and fre-

quencies with percentages for categorical parameters; and 95% confidence intervals were presented. Comparisons between values were made using the Mann-Whitney test. Correlations between parameters were evaluated using the Spearman correlation. Further, multiple linear regression was performed considering in the first block the classical clinical parameters that were correlated with BFR, and adding in a second block the cytokines which were also correlated. To perform this analysis, variables that were not normally distributed were submitted to a normalization process through logarithm application. The method used for variable selection when modeling BFR was the stepwise method.

For all analyses performed, a p value of <0.05 was considered as statistically significant. Statistical analysis was performed using SPSS 15.0 for Windows statistical software.

RESULTS

As pointed out above, the 47 patients of the study were classified according to their BT, based on BFR. Eleven patients (23%) were allocated to the Low-Norm BT group (6 patients presented normal bone and 5 adynamic bone disease), and 36 patients (77%) to the High BT group.

Biochemical parameters are presented in Table I. The Low-Norm BT patients had lower serum iPTH and tAP, but higher serum aluminum levels than the High BT patients. In fact, the need to exclude aluminum overload in mineralization front before parathyroidectomy was one of the most frequent reasons for a bone biopsy, as mentioned in the "Methods" section. Serum calcium and phosphorus levels were similar in the 2 groups. Seven patients had aluminum deposits in more than 10% of the trabecular surface (5 in Low-Norm BT group and 2 in High BT group), but only 2 of them (1 in each group) in more than 50% of the trabecular surface.

An increase in iPTH (>300 pg/mL) together with a high tAP value (>120 U/L) showed a very low sensitivity (58.8%) and low negative predictive value (44.0%) for the diagnosis of high-turnover bone disease. An iPTH level below 300 pg/mL in association with normal or low serum tAP (<120 U/L) was associated with a low sensitivity (66.7%) but high specificity (97.1%) for the diagnosis of Low-Norm BT.

Bone histomorphometric and histodynamic data are presented in Table II. High BT patients had significantly higher osteoid area and osteoid perimeter than Low-Norm BT patients, reflecting an increase in bone formation, but without significant impairment of mineralization. Osteoid width was also increased in this group, but clearly below the osteomalacia threshold. High resorption activity was illustrated by a marked increase in eroded perimeter, as observed in the High BT patients. In addition to BFR, the other dynamic

TABLE I
BIOCHEMISTRY DATA ACCORDING TO BONE TURNOVER GROUP

Serum parameters	Low-normal bone turnover group (n=11)	High bone turnover group (n=36)	p Value
iPTH, pg/mL	38 (1-965)	1,077 (215-2,547)	<0.001
Ca, mg/dL	10.5 (8.4-12.6)	9.7 (7.9-11.2)	NS
P, mg/dL	5.8 (1.8-10.7)	6.3 (0-9.8)	NS
Al, µg/L	53.5 (36-148)	35 (0-98)	0.025
tAP, U/L	56 (45-588)	155 (41-1,967)	<0.008

All values are expressed as median (range).

Al = serum aluminum; Ca = serum calcium; iPTH = intact parathyroid hormone; NS = not significant; P = serum phosphorus; tAP = total alkaline phosphatases.

TABLE II
BONE HISTOMORPHOMETRY DATA ACCORDING TO BONE TURNOVER GROUP

Bone parameters	Low-normal bone turnover group (n=11)	High bone turnover group (n=36)	p Value
B.Ar, %	18.7 (12.4-25.2)	20.2 (10.2-45.4)	NS
O.Ar, %	1.2 (0.2-38.2)	5.0 (0.5-27.8)	<0.001
O.Wi, µm	6.3 (4-47.0)	8.9 (5.0-26.1)	<0.001
O.Pm, %	17.8 (2.9-90.7)	38.6 (7.1-72.9)	0.001
E.Pm, %	2.0 (0-4.9)	11.5 (4.5-27.5)	<0.001
dL.Pm, %	6.2 (1.4-16.7)	23.0 (8.5-44.7)	<0.001
MAR, µm/day	1.5 (0.6-2.0)	1.9 (1.1-4.2)	0.03
AjAr, µm/day	0.7 (0.4-1.5)	2.0 (0.5-10.1)	<0.001
BFR, µm ² /mm ² per day	245 (69.1-763.6)	1750 (792.0-6420.7)	<0.001
Mlt, days	6.9 (4.3-20.2)	5.4 (0.5-32.0)	NS
Omt, days	4.2 (2.3-11.6)	4.5 (1.6-12.6)	NS

All values are expressed as median (range).

B.Ar = bone area; O.Ar = osteoid area; O.Wi = osteoid width; O.Pm = osteoid perimeter; E.Pm = eroded perimeter; dL.Pm = double-labeled perimeter; MAR = mineral apposition rate; AjAr = adjusted apposition rate; BFR = bone formation rate; Mlt = mineralization lag time; Omt = osteoid maturation time; NS = not significant.

histomorphometric parameters were also significantly increased in High BT group. In contrast, mineralization lag time and osteoid maturation time were normal and similar in the 2 groups, excluding the presence of a significant mineralization defect in these patients.

Serum cytokine levels are presented in Table III, split into 2 groups according to the rate of bone turnover. Serum IL-1 α , IL-1Ra, IL-6, sIL-6r, IL-8, IL-10, IL-12p70 and TNF- α concentrations did not differ. Serum calcium, aluminum, IL-10 and IL-1Ra correlated negatively with bone area (B.Ar). Serum tAP correlated positively with osteoid area (O.Ar), osteoid perimeter (O.Pm), BFR and mineralization lag time (Mit). Serum iPTH also presented highly significant correlations with static (O.Pm and E.Pm) and dynamic (BFR) parameters of bone formation and bone resorption (Tab. IV). Concerning the relation between BFR and routine serum parameters, iPTH and tAP were the only parameters that showed a positive correlation ($r = 0.55$, $p < 0.001$; and

$r = 0.51$, $p = 0.001$, respectively) (Tab. V). These parameters contributed in a statistical manner to explain BFR changes, according to multiple linear regression coefficients (Tab. VI). When adding to the model the cytokine parameters that were correlated with BFR, namely IL-6, IL-12p70, TNF- α and IL-1beta, the model estimated to explain BFR variations included only tAP and IL-6 (Tab. VI).

DISCUSSION

Despite considerable recent advances in our knowledge of mineral metabolism disturbances and therapeutic modalities, CKD-MBD with its skeletal expression of renal osteodystrophy remains 1 of the most disturbing complications in chronic dialysis patients, and also in kidney transplant recipients.

Bone histology remains the gold standard for the diagnosis of renal osteodystrophy. A clear distinction between

TABLE III
SERUM CYTOKINE LEVELS ACCORDING TO BONE TURNOVER GROUP

Serum parameters	Low-normal bone turnover group (n=7)	High bone turnover group (n=33)	p Value	Normal level (26) (pg/mL)	Limits of detection (pg/mL)
IL-1 α , pg/mL	9.6 (0-27.5)	8.6 (0-810)	NS	<48	7.2-5,000
IL-1Ra, pg/mL	541 (184-935)	259 (16-2322)	NS	<260	8-5,000
IL-6, pg/mL	3.3 (0-51.7)	2.0 (0-68.8)	NS	<5.6	3-5,000
sIL-6r, pg/mL	76.5 (57.0-113)	74 (42.0-428)	NS	<80	16-5,000
IL-8, pg/mL	17.5 (9.7-29.4)	16.3 (6.4-69.6)	NS	<40	3.6-5,000
IL-10, pg/mL	3.8 (0-13.8)	1.5 (0-20.4)	NS	<3.7	2.8-5,000
IL-12p70, pg/mL	2.6 (0-8.0)	4.0 (0-172.4)	NS	<9.4	1.9-5,000
TNF- α , pg/mL	0.9 (0-4.5)	2.0 (0-26.0)	NS	<3.7	2.8-5,000

All values are expressed as median (range). Normal levels and limits of detection according to reference (26).

IL-1 α = serum interleukin-1 α ; IL-1Ra = interleukin-1 receptor antagonist; IL-6 = interleukin-6; sIL-6r = soluble interleukin-6 receptor; IL-8 = interleukin-8; IL-10 = interleukin-10; IL-12p70 = interleukin-12p70; TNF- α = tumor necrosis factor-alpha; NS = not significant.

TABLE IV
SIGNIFICANT CORRELATIONS BETWEEN SERUM BIOCHEMISTRY PARAMETERS AND BONE HISTOMORPHOMETRY DATA

Parameters	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Al (µg/L)	tAP (U/L)	iPTH (pg/mL)	IL-10 (pg/mL)	IL-1Ra (pg/mL)
B.Ar, %	-0.3 (<0.025)		-0.4 (<0.004)			-0.4 (<0.005)	-0.4 (<0.031)
O.Ar, %	-0.3 (<0.036)	-0.3 (<0.025)		+0.7 (<0.001)			
O.Pm, %		-0.4 (<0.009)		+0.6 (<0.001)	+0.4 (<0.003)		
E.Pm, %					+0.6 (<0.001)		
Mlt, days				+0.3 (<0.048)			

Al = serum aluminum; B.Ar = bone area; Ca = serum calcium; E.Pm = eroded perimeter; iPTH = intact parathyroid hormone; Mlt = mineralization lag time; NS = not significant; O.Ar = osteoid area; O.Pm = osteoid perimeter; P = serum phosphorus; tAP = total alkaline phosphatases.

TABLE V
CORRELATIONS WITH BONE FORMATION RATE (BFR)

Serum parameters	(correlation)	p Value
Ca (mg/dL)	-0.165	0.162
P (mg/dL)	0.087	0.301
Al (µg/L)	-0.251	0.064
iPTH (pg/mL)	0.550	<0.001*
tAP (U/L)	0.505	0.001*
IL-6 (pg/mL)	0.334	0.038*
sIL-6r (pg/mL)	0.254	0.092
IL-1Ra (pg/mL)	-0.079	0.341
IL-12p70 (pg/mL)	0.358	0.028*
TNF-α (pg/mL)	0.331	0.040*
IL-10 (pg/mL)	-0.095	0.312
IL-1 _s (pg/mL)	0.332	0.039*
IL-8 (pg/mL)	0.130	0.251

Ca = calcium; P = phosphorus; Al = aluminum; iPTH = intact parathyroid hormone; tAP = total alkaline phosphatases; IL-6 = interleukin-6; sIL-6r = soluble interleukin-6 receptor; IL-1Ra = interleukin-1 receptor antagonist; IL-12p70 = interleukin-12p70; TNF-α = tumor necrosis factor-alpha; IL-10 = interleukin-10; IL-1_s = serum interleukin-1_s; and IL-8 = interleukin-8.

*Statistically significant.

high, normal and low bone turnover disease, and a precise evaluation of bone mineralization in uremic patients still requires the invasive and expensive technique of bone histomorphometry, which includes the assessment of static and kinetic variables after double tetracycline labeling (1, 27). Precise knowledge of the underlying bone disease would allow, at least theoretically, a more appropriate treatment approach than that based solely on presently available serum markers of bone turnover (5).

In recent years, a variety of circulating biochemical markers of bone turnover have been tested and used with the purpose of evaluating bone remodeling in uremic patients in the absence of bone biopsy. Used individually or in association with other methods, these biomarkers should allow the nephrologist to improve the diagnosis of renal osteodystrophy in CKD patients (6, 14, 15). This is all the more necessary since the number of centers with expertise in bone histomorphometry has progressively decreased. Moreover, the information provided by bone biopsy (which gives a snapshot of bone lesions) may be significantly increased by the combination with bone remodeling serum marker levels.

Recently, we have shown in a population of 119 hemodialysis patients treated according to the Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) guidelines and submitted to a bone biopsy, that adynamic bone disease was the most frequent abnormality (59%). Interestingly, serum iPTH was in the normal or high K/DOQI guideline range in more than one third of the patients with low bone turnover (28). A burning question in clinical practice therefore is how the precise diagnosis of a given type of renal osteodystro-

TABLE VI
MULTIPLE LINEAR REGRESSION COEFFICIENTS

Model 1	Estimated coefficients	95% confidence interval	p Value
iPTH (pg/mL)	0.794	(0.289-1.299)	0.003
tAP (U/L)	1.366	(0.339-2.393)	0.011
Model 2			
tAP (U/L)	1.622	(0.987-2.256)	<0.001
IL-6 (pg/mL)	1.377	(0.253-2.501)	0.018

iPTH = intact parathyroid hormone; tAP = total alkaline phosphatases; IL-6 = interleukin-6.

phy can be reached without performing a bone biopsy, yet providing the patient with the best possible treatment to maintain optimal bone structure and function.

The normal remodeling cycle requires that bone resorption and bone formation take place in a synchronized way, which in turn depends on the systematic development and activation of osteoclasts and osteoblasts, respectively. Osteoclasts originate from hematopoietic granulocyte-macrophage colony-forming units, whereas osteoblasts originate from pluripotential mesenchymal stem cells (29).

Recently, there has been a remarkable improvement in our understanding of the complex biology of bone, with the demonstration of the important role played by a multitude of local and circulating growth factors and cytokines (30). The results of a small number of studies support the hypothesis that the cytokine/cytokine-receptor/receptor antagonist network plays a major role in the pathogenesis of renal osteodystrophy (31, 32), and that the serum levels of some of these local mediators might well reflect bone cell activity (33-36).

Activation of the bone remodeling cycle (activation of osteoblasts) appears to be influenced by high levels of IL-1, such as the ones reported in dialysis patients (37). Similarly, high levels of IL-1 receptor antagonist, which are thought to oppose the effects of IL-1, have been detected in these patients by our group (20). We found an inverse relationship between IL-1 receptor antagonist and osteoblast surface, suggesting that a high serum concentration of the IL-1 receptor antagonist makes the skeleton relatively insensitive to circulating IL-1. On the other hand, at low serum concentration, the IL-1 receptor antagonist would allow the cytokine to fully exert itself in the stimulation of bone formation. In the present study, a negative correlation between IL-1Ra and bone area (B.Ar) was found, in accord with our previous results and the

role of this cytokine in osteoblast activation.

Elevated serum levels of IL-6 have also been reported in dialysis patients, as well as in predialysis patients. Montalban et al found a correlation between serum IL-6 and bone remodeling markers in patients with renal osteodystrophy (38). The presence of high serum levels of IL-6 and IL-6 soluble receptor has been repeatedly observed in chronic hemodialysis patients, and our group has reported an inverse relationship between the soluble IL-6 receptor to IL-6 ratio and osteoclast surface (20). These findings are in line with the role of IL-6 in the promotion of osteoclast differentiation, development and activity, as reported by several research groups during the last few years, both in studies performed in vitro and those performed in vivo (21, 38-41). Some of these effects seem to be mediated through the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) ligand/RANK system (40). Our present results also show that IL-6 serum levels are positively correlated with BFR.

Interestingly, in multiple linear regression analysis, IL-6 serum levels were independently predictive of BFR. In our opinion, these results are particularly relevant, as IL-6 is a highly stable cytokine, with recognized systemic effects (38, 40).

In the present study, serum IL-10 levels correlated negatively with bone area (B.Ar). IL-10 is produced by monocytes, macrophages, B cells and T cells. It inhibits the production of several proinflammatory cytokines, including IL-1, and thereby interferes with osteoblast stimulation (42). This action could be the mechanism underlying the observed reduction in bone area, but this hypothesis requires further investigation.

IL-12 is a proinflammatory cytokine produced by monocytes/macrophages, B cells and dendritic cells. It enhances myelopoiesis of primitive bone marrow progenitor cells and

synergizes other cytokines to stimulate proliferation of resting cells. Its effects on bone turnover still need to be clarified, but due to its effects on the monocyte/macrophage lineage, it probably also affects osteoclast proliferation and maturation (43, 44).

Our study presents several limitations, including a relatively high aluminum exposition of the cohort evaluated, the use of only second-generation intact PTH levels and the absence of serum vitamin D sterol measurements. The results of our study also need to be confirmed in larger patient populations, with a better balance between cases having high and low bone turnover bone. Interestingly a significant mineralization defect was not observed in any of our patients, excluding osteomalacia associated with aluminum intoxication or severe vitamin D deficiency.

In conclusion, we show that serum IL-1, IL-6, IL-12p70 and TNF- α are positively correlated with BFR, serum IL1-Ra and IL-10 with bone area and that serum IL6 is an independent predictor of BFR, in a population of prevalent

dialysis patients. The quantification of the serum levels of these cytokines through a simple and reproducible flow cytometry method may be relevant for research purposes or to complement the classical biochemical markers of bone turnover (such as iPTH and tAP). The usefulness of these serum cytokine determinations in the noninvasive evaluation of bone remodeling needs to be confirmed in larger dialysis populations.

Financial Support: None.

Conflict of interest statement: None.

Address for correspondence:

Aníbal Ferreira
Hospital Curry Cabral
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Nova de Lisboa
Rua dos Quarteis 96-4º dto.
1300-483 Lisboa, Portugal
anibalferreira@netcabo.pt

REFERENCES

1. Moe SM, Drüeke T, Cunningham J, et al. Definition, evaluation and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2006;69:1945-1953.
2. Coen G, Mazzaferro S, Ballanti P, et al. Renal bone disease in 76 patients with varying degrees of predialysis chronic renal failure: a cross sectional study. *Nephrol Dial Transplant.* 1996;11:813-819.
3. Martin KJ, Olgaard K, Coburn JW, et al. Diagnosis, assessment and treatment of bone turnover abnormalities in renal osteodystrophy. *Am J Kidney Dis.* 2004;43:558-565.
4. Ferreira A. Diagnosis of renal osteodystrophy: when and how to use biochemical markers and non-invasive methods; when one biopsy is needed. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15:8-14.
5. Ho LT, Sprague S. Percutaneous bone biopsy in the diagnosis of renal osteodystrophy. *Semin Nephrol.* 2002;22:268-275.
6. Ferreira A, Drüeke TB. How to diagnose the different forms of renal osteodystrophy: role of biochemical markers. *Am J Med Sci.* 2000;320:85-89.

7. David V, Lafage-Proust MH, Laroche N, Christian A, Rueggsegger P, Vico L. Two-week longitudinal survey of bone architecture alteration in the hindlimb-unloaded rat model of bone loss: sex differences. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;290:440-447.
8. Qi Q, Maunier-Faugere MC, Geng Z, Malluche H. Predictive value of serum parathyroid hormone levels for bone turnover in patients on chronic maintenance dialysis. *Am J Kidney Dis.* 1995;22:622-631.
9. Cohen-Solal ME, Sebert JL, Boudailliez B, et al. Comparison of intact, midregion and carboxy terminal assays of parathyroid hormone for the diagnosis of bone disease in hemodialyzed patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;71:516-524.
10. Barreto FC, Barreto DV, Moyses RMA, et al. K/DOQI-recommended intact PTH levels do not prevent low-turnover bone disease in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2008;73:771-777.
11. Lepage R, Ray L, Bossard J-H, et al. A non-(1-84) circulating parathyroid hormone (PTH) fragment interferes significantly with intact PTH commercial assay measurements in uremic samples. *Clin Chem.* 1998;44:805-809.
12. Malluche H, Mawad H, Trueba D, Monier-Faugere M-C. Parathyroid hormone assays: evolution and revolutions in the care of dialysis patients. *Clin Nephrol.* 2003;59:313-318.
13. Nguyen-Yamamoto L, Rousseau L, Brossard JH, Lepage R, D'Amour P. Synthetic carboxy-terminal fragments of parathyroid hormone (PTH) decrease ionized calcium concentration in rats by acting on a receptor different from PTH/PTH related peptide receptor. *Endocrinology.* 2001;142:1386-1392.
14. Coen G, Ballanti P, Bonnucci E, et al. Bone markers in the diagnosis of low turnover osteodystrophy in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13:2294-2302.
15. Goodman WG, Salusky IB, Jüpnér H. New lessons from old assays (PTH), its receptors, and the potential biological relevance of PTH fragments. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17:1731-1736.
16. Ureña P, de Vernejoul MC. Circulating biochemical markers of bone remodeling in uremic patients. *Kidney Int.* 1999;55:2141-2156.
17. Ureña P, Ferreira A, Kung V, et al. Serum pyridinoline as a specific marker of collagen breakdown and bone metabolism in hemodialysis patients. *J Bone Miner Res.* 1995;10:932-939.
18. Bervoets AR, Spasovski GB, Behets GJ, et al. Useful biochemical markers for diagnosing renal osteodystrophy in predialysis end-stage renal failure patients. *Am J Kidney Dis.* 2003;41:997-1007.
19. Ureña P, Hruby M, Ferreira A, Ang KS, de Vernejoul MC. Plasma total versus bone alkaline phosphatase as markers of bone turnover in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 1996;7:1-7.
20. Couttenye MM, D'Haese PC, Van Hoof VO, et al. Low serum levels of alkaline phosphatase of bone origin: a good marker of adynamic bone disease in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 1996;11:1065-1072.
21. Ferreira A, Simon P, Drüeke T, Descamps-Latscha B. Potential role of cytokines in renal osteodystrophy. *Nephrol Dial Transplant.* 1996;11:399-400.
22. Duarte ME, Carvalho EF, Cruz EA, Lucena SB, Andress DL. Cytokine accumulation in osteitis fibrosa of renal osteodystrophy. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35:25-29.
23. Herbelin A, Nguyen AT, Zingraff J, Ureña P, Descamps-Latscha B. Influence of uremia and hemodialysis on circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha. *Kidney Int.* 1990;37:116-125.
24. Herbelin A, Ureña P, Nguyen AT. Elevated circulating levels of interleukin-6 in patients with chronic renal failure. *Kidney Int.* 1991;39:954-960.
25. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. *J Bone Miner Res.* 1987;6:595-610.
26. Salusky IB, Coburn JW, Brill J, et al. Bone disease in pediatric patients undergoing dialysis with CAPD or CCPD. *Kidney Int.* 1988;33:895-898.
27. Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med.* 2006;355:2591-2592.
28. Ferreira A. Development of renal bone disease. *Eur J Clin Invest.* 2006;36:2-12.
29. Ferreira A, Frazão JM, Monier-Faugere M-C, et al. Effects of sevelamer hydrochloride and calcium carbonate on renal osteodystrophy in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19:405-412.
30. Boyle WB, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;423:337-342.
31. Hruska KA, Teitelbaum SL. Mechanisms of disease: renal osteodystrophy. *N Engl J Med.* 1995;333:166-174.
32. Jung Y, Wang J, Schneider A, et al. Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts: a possible mechanism for stem cell homing. *Bone.* 2006;38:497-508.
33. Hruska KA. New concepts in renal osteodystrophy. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13:2755-2760.
34. KohAJ, Demiralp B, Neiva KG, et al. Cells of the osteoclast lineage as mediators of the anabolic actions of parathyroid hormone in bone. *Endocrinology.* 2005;146:4584-4596.
35. Ferreira A, Ghazali A, Galvão J, et al. Effect of type of dialysis membrane on bone in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16:1230-1238.
36. Steddon SJ, McIntyre CW, Schroeder NJ, Burrin JM, Cunningham J. Impaired release of interleukin-6 from human osteoblastic cells in the uremic milieu. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19:3078-3083.
37. Barreto FC, Barreto DV, Moyses RM, et al. Osteoporosis in hemodialysis patients revisited by bone histomor-

- phometry: a new insight into an old problem. *Kidney Int.* 2006;69:1852-1857.
38. Descamps-Latscha B, Herbelin A, Nguyen AT, et al. Balance between IL-1 beta, TNF alpha, and their specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis: relationships with activation markers of T cells, B cells and monocytes. *J Immunol.* 1995;154:882-892.
 39. Montalban C, Garcia-Unzueta MT, De Francisco A, Amado JA. Serum interleukin-6 in renal osteodystrophy: relationship with serum PTH and bone remodeling markers. *Horm Metab Res.* 1999;31:14-17.
 40. Santos FR, Moyses RM, Montenegro FL, Jorgetti V, Noronha IL. IL-1beta, TNF-alpha, TGF-beta and BFGF expression in bone biopsies before and after parathyroidectomy. *Kidney Int.* 2003;63:899-907.
 41. Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E(2) signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kB (RANK) ligand / RANK system. *Endocrinology.* 2005;146:1991-1998.
 42. Kudo O, Sabokbar A, Pocock A, et al. Interleukin-6 and interleukin 11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone.* 2003;32:1-7.
 43. Ernest HS, Choy MD, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2001;344:907-916.
 44. Jacobsen SE, Veyby OP, Smelan EB. Cytotoxic lymphocyte maturation factor (interleukin 12) is a synergistic growth factor for hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 1993;178:413-418.
 45. Kollet O, Ayelet Dar, Lapidot T. The multiple roles of osteoclast in host defense: bone remodeling and hematopoietic stem cell mobilization. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:51-69.

Received: December 16, 2008

Revised: March 16, 2009

Accepted: April 22, 2009

© Società Italiana di Nefrologia

Ao longo da última década, diversas citocinas e fatores de crescimento (bem como, os respetivos antagonistas e recetores solúveis), presentes no microambiente do tecido ósseo, foram identificadas como agentes reguladores do metabolismo mineral.

Estes factores locais funcionam como intérpretes entre as várias populações celulares, nomeadamente do estroma ósseo, do sistema imunitário, células endoteliais, osteócitos, osteoblastos e osteoclastos.

Na nossa investigação tivemos a possibilidade de descrever, pela primeira vez, associações entre os níveis séricos de beta-2 microglobulina e parâmetros histomorfométricos obtidos em biopsias ósseas de doentes hemodialisados.

Observámos ainda que os diferentes efeitos na remodelação óssea induzidos por membranas de hemodiálise de diferente permeabilidade (e de variável biocompatibilidade) podem ser explicados, pelo menos em parte, pela variação nos níveis séricos de beta-2-microglobulina.

Os nossos primeiros estudos retrospectivos, acima relatados, confirmaram-nos as hipóteses de investigação iniciais, da existência de uma aparente associação entre níveis circulantes de diversas citocinas / factores de crescimento / recetores / antagonistas solúveis e a remodelação óssea.

Com base nestes resultados promissores, efectuámos os estudos prospectivos descritos no presente capítulo, nos quais evidenciámos, pela primeira vez, a associação entre níveis séricos de beta-2-microglobulina e remodelação óssea, bem como entre os níveis séricos de diversas citocinas e a activação osteoblástica e osteoclástica, em doentes com insuficiência renal crónica em hemodiálise.

Os nossos resultados estão em concordância com achados anteriormente descritos *in vitro* e em modelos animais.

Os resultados desta nossa investigação constituem, em nossa opinião, um novo fator que pode, em associação com vários outros (discutidos no capítulo 7), justificar a maior prevalência de doença óssea adinâmica observada atualmente nos doentes hemodialisados: a utilização crescente de membranas de hemodiálise mais biocompatíveis e com maior capacidade de remoção da beta 2-microglobulina conduz a uma menor activação da remodelação óssea.

5.6. Bibliografia do Capítulo 5.

1. *Derived osteoblastic cells and control of bone formation.* **Marie,J.P.; de Vernejoul,M.C.** 1993, Bone, Vol. 14, pp. 463-468.
2. *Mechanisms of disease: renal osteodystrophy.* **Hruska,K.A.; Teitelbaum,S.L.** 1995, N Eng J Med, Vol. 333, pp. 166-174.
3. *Involvement of different second messengers in parathyroid hormone and interleukin-1-induced interleukin-6 and interleukin-11 production in human bone marrow stromal cells.* **Kim,S.G.; Kim ,C.H.; Chai,C.S.; Park,J.Y.; Lee,K-U.** 1997, J Bone Min Res, Vol. 12, pp. 896-902.
4. *Cytokines in bone: local translators in cell-to-cell communications.* **Yoneda,T.** 1993, Cellular and molecular biology of bone-San Diego Academic Press, pp. 375-412.
5. *FGF-23 in bone biology.* **Wessling-Perry,K.** 4, 2010, Pediatr Nephrol, Vol. 25, pp. 603-608.
6. *Fibroblast growth factor-23 in early chronic kidney disease: additional support in favor of a phosphate-centric paradigm for the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism.* **Evenepoel,P.; Meijers,B.; Viaene,L; Bammens,B; Claes,K.; Kuypers,D.; Vandershueren,D.; Vanrenterghem,Y.** 7, 2010, Clin J Am Soc Nephrol, Vol. 5, pp. 1268-1276.
7. *Fibroblast Growth Factor 23 and disordered vitamin D metabolism in chronic kidney disease: updating the "trade-off" hypothesis.* **Gutiérrez,O.M.;** 2010, Clin J Am Soc Nephrol, Vol. 5, pp. 1710-1716.
8. *PTH increases FGF23 gene expression and mediates the high-FGF23 levels of experimental kidney failure: a bone parathyroid feedback loop.* **Lavi-Moshayoff,V; Wasserman,G.; Meir,T.; Sillver,J.; Naveh-Many,P.** 4, 2010, Am J Physiol Renal Physiol, Vol. 299, pp. 882-889.
9. *A role for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in control of bone marrow collagen deposition.* **McCarthy,D.M.; Hibbin,J.A.; Goldman,J.M.** 1984, Lancet, Vol. 1, pp. 78-80.
10. *Hémodialyse, syndrome du canal carpien et substance amyloïde.* **Assenat,H.; Calemard,E.; Charra,B.; et,al.** 1980, Nouv Presse Méd, Vol. 9, pp. 1715-1720.
11. *Beta-2-microglobulin amyloidosis and renal bone disease.* **Drüeke,T.** 1991, Miner Electrolyte Metab, Vol. 17, pp. 261-272.
12. *Muskuloskeletal manifestations of amyloidosis.* **Kurer,M.H.J.; Bailod,R.A.; Madgwick,C.J.K.** 1991, J Bone Joint Surg, Vol. 73, pp. 271-276.

13. *Dyalysis-related amyloidosis.* **Bardin,T.; Zingraff,J.; Kuntz,D.** 1986, Nephrol Dial Transplant, Vol. 1, pp. 151-154.
14. *Carpal tunnel syndrome with cystic bone lesions secondary to amyloidosis in chronic hemodialysis patients.* **Fenves,A.Z.; Emmett,M.; White,M.G.; et,al.** 1986, Am J Kidney Dis, Vol. 7, pp. 130-134.
15. *Current clinical and pathogenic understanding of beta-2-m amyloidosis in long term haemodialysis patients.* **Gejyo,F.; Narita,I.** 2003, Nephrology, Vol. 8, pp. S45-S49.
16. *Hemodialysis associated amyloidosis and beta-2-microglobulin a clinical and immunohistochemical study.* **Bardin,T.; Kuntz,D.; Zingraff,J.; et,al.** 1987, Am J Med, Vol. 83, pp. 419-424.
17. *Synovial amyloidosis in patients undergoing long-term hemodialysis.* **Bardin,T.; Kuntz,D.; Zingraff,J.; et,al.** 1985, Arthritis Rheum, Vol. 185, pp. 1052-1058.
18. *Pathological fractures associated with idiopathic amyloidosis of bone in chronic hemodialysis patients.* **DiRaimondo,C.R.; Casey,T.T.; DiRaimondo,C.V.; et,al.** 1986, Nephron, Vol. 43, pp. 22-27.
19. *Destructive spondylarthropathy in hemodialysed patients.* **Kuntz,D.; Naveau,.; Bardin,T.; et,al.** 1984, Arthritis Rheum, Vol. 27, pp. 369-375.
20. *Pseudotumor of the craniocervical junction during long-term hemodialysis.* **Rousselin,B.; Hélon,O.; Zingraff,J.; et,al.** 1990, Arthritis Rheum, Vol. 33, pp. 1567-1573.
21. *Tissue distribution of dialysis amyloidosis.* **Nöel,L.H.; Zingraff,J.; Bardin,T.; et,al.** 1987, Clin Nephrol, Vol. 27, pp. 175-178.
22. *Histochemical and immunohistochemical characterization of amyloid associated with chronic hemodialysis as beta 2 microglobulin.* **Shirahama,T.; Skinner,M.; Cohen,A.S.; et,al.** 1985, Lab Invest, Vol. 53, pp. 705-709.
23. *Beta-2-microglobulin deposition in bone in chronic renal failure.* **Onishi,S.; Andress,D.L.; Maloney,N.A.; et,al.** 1991, Kidney Int, Vol. 39, pp. 990-995.
24. *Serum levels of β 2-microglobulin as a new form of amyloid protein in patients undergoing long-term haemodialysis.* **Gejyo,F.; Homma,N.; Suzuki,Y.; Arakawa,M.** 1986, N Eng J Med, Vol. 314, pp. 515-516.
25. *Beta-2-microglobulin is an amyloidogenic ptotein in man.* **Gorevic,PD.; Casey,T.T.; Stone,W.J.; et,al.** 1985, J Clin Invest, Vol. 76, pp. 2425-2429
26. *Amyloidosis: some recent developments.* **Pepys,M.B.** 1998, Q J Med, Vol. 252, pp. 283-298.

27. *Beta-2 microglobulin generation rate and clearance rate in maintenance hemodialysis patients.* **Maeda,K.; Shinzato,T.; Ota,T.; et,al.** 1990, *Nephron*, Vol. 56, pp. 118-125.
28. *In vitro formation of amyloid fibrils from intact beta-2 microglobulin.* **Connors,L.H.; Shirama,T.; Skinner,M.; et,al.** 1985, *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 131, pp. 1063-1068.
29. *A histological study on the synovial tissue of the rat knee joints in the experimental beta-2-microglobulin derived amyloidosis.* **Ueda,T.** 1992, *Ryumachi*, Vol. 32, pp. 308-317.
30. *Lysine-specific cleavage of beta-2-microglobulin in amyloid deposits associated with hemodialysis.* **Linke,R.P.; Hampl,H.; Lobeck,H.; et,al.** 1989, *Kidney Int*, Vol. 36, pp. 675-681.
31. *Beta-2-microglobulin modified with advanced glycation end products is a major component of hemodialysis-associated amyloidosis.* **Miyata,T; Oda,O.; Inagi,R.; et,al.** 1993, *J Clin Invest*, Vol. 92, pp. 1243-1252.
32. *Beta-2 microglobulin modified with advanced glycation end products in the pathogenesis of hemodialysis-associated amyloidosis.* **Miyata,T; Inagi,R.; Lida,Y.; et,al.** 1994, *J Clin Invest*, Vol. 93, pp. 521-528.
33. *Advanced glycation end products stimulate necrosis factor- α and interleukin-1 β secretion by peritoneal macrophages in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis.* **Rashid,G.; Korzets,Z.; Bernheim,F.J.** 2006, *Isr Med Assoc J*, Vol. 2, pp. 36-39.
34. *Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factor.* **Bertolini,D.R.; Nedwin,G.E.; Bringman,T.S.; et,al.** 1986, *Nature*, Vol. 319, pp. 518-518.
35. *Osteoclast differentiation and activation.* **Boyle,W.B.; Simonet,W.S.; Lacey,D.L.** 2003, *Nature*, Vol. 423, pp. 337-342.
36. *Beta-2-microglobulin enhances insulin-like growth factor I receptor levels and synthesis in bone cell cultures.* **Centrella,M.; McCarty,T.L.; Canalis,L.** 1989, *J Biol Chem*, Vol. 264, pp. 18268-18271.
37. *Immunoreactivity and proliferative action of beta-2-microglobulin on human bone-derived cells in vitro.* **Evans,D.B.; Thavarajah,M.; Kanis,J.A.** 1991, *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 175, pp. 795-803.
38. *beta-2 microglobulin induces calcium efflux from cultured neonatal mouse calvariae.* **Moe,S.M.; Sprague,S.M.** 1992, *Am J Physiol*, Vol. 263, pp. 540-545.
39. *In vivo effect of beta-2-microglobulin on bone resorption in mice.* **Kang,M.S.; Li,C.C.; Peterson,J.** 1990, *Kidney Int*, Vol. 37, p. 304 (abstract).

40. *Beta-2-microglobulin is not a bone cell mitogen.* **Jennings,J.C.; Mohan,S.; Baylink,D.J.** 1989, *Endocrinology*, Vol. 125, pp. 404-409.
41. *β2-Microglobulin in postmenopausal osteoporosis.* **Ricco,H.; Rippol,E.; Revilla,M.; Relea,P.; Villa,I.** 1993, *Calc Tissue Int*, Vol. 53, pp. 78-80.
42. *Metabolic dependent increase of serum beta-2-microglobulin levels in patients with Paget's disease of bone.* **Rico,C.E.; Foti,R.; Tamburino,C.** 1992, *Horm Metab Res*, Vol. 24, pp. 143-144.
43. *Beta-2-microglobulin in disease with high bone remodeling.* **Rippol,E.; Arribas,I.; Relea,P.; et,al.** 1995, *Calc Tissue Int*, Vol. 57, pp. 272-276.
44. *Relationship between serum beta-2 microglobulin, bone histology, and dialysis membranes uraemic patients.* **Ferreira,A.; Ureña,P.; Ang,K.S.; Simon,P.; Morieux,C.; Souberbielle,J-C.; Vernejoul,M-C.; Drüeke,T.B.** 9, 1995, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 10, pp. 1701-1707.
45. *An immunoassay for the measurement of free pyridinoline in serum: a marker of bone resorption.* **Kung,V.T.; Gomez,B.; Lungard,R.; Seyedin,S.; Clark,B.; Riggs,L.** 1993, *J Bone Min Res*, pp. S151-S155.
46. *Autocrine induction of collagenase by serum amyloid A-like proteins.* **Brinckerhoff,C.E.; Michell,T.I.; Karmilowicz,M.J.; et,al.** 1989, *Science*, Vol. 243, pp. 655-657.
47. *Proteinases and matrix degradation.* **Werb,Z.; Alexarder,C.M.** 1993, *Textbook of Rheumatology Philadelphia Saunders*, Vol. 4th Edition, pp. 248-268.
48. *Papel da Beta-2-microglobulina na Osteodistrofia Renal.* **Ferreira,A.; Drüeke,T.** 1995, *Rev Port Nefrol Hipert*, Vol. 9, pp. 211-216.
49. *Beta-2-microglobulin amyloidosis and bone disease.* **Ferreira,A.; Ureña,P.; de Vernejoul,M.C.** 1994, *Rev Rhum (Engl Ed.)*, Vol. 61, pp. 23S-26S.
50. *Influence of haemodialysis membranes on beta-2-microglobulin kinetics: in vivo and in vitro studies.* **Zingraff,J.; Beyne,P.; Ureña,P.; et,al.** 1988, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 3, pp. 284-290.
51. *Beta-2-microglobulin as a prognostic marker for development of AIDS.* **Bhalla,R.B.; Safai,B.; Pahwa,S.** 1985, *Clin Chem*, Vol. 31, pp. 1411-1412.
52. *beta-2-microglobulin, a uremic toxin with a double meaning.* **Canaud,B.; Morena,M.; Cristol,J.P.; Krieter,D.** 8, 2006, *Kidney Int*, Vol. 69, pp. 1297-1299.
53. *Proteomic analysis of serum, outflow dialysate and absorbed protein onto dialysis membranes (polyssulphone and PMMA) during hemodialysis treatment using SELDI-TOF-MS.* **Ishikawa,I.; Chikazawa,Y.; Sato,K.; Nakagawa,M.; Imamura,H.; Hayama,S.; Yamaya,H.; Asaka,M.; Tomosugi,N.; Yokoyama,H.; Matsumoto,K.** 4, 2006, *Am J Nephrol*, Vol. 26, pp. 272-380.

54. *Biocompatibility of dialysis membranes-role of adsorption.* **Chanard,J.** 7, 2003, *Nephrologie*, Vol. 24, pp. 359-365.
55. *Phosphate and FGF-23.* **Jüppner,H.;** Suppl 121, 2011, *Kidney Int*, Vol. 79, pp. S24-S27.
56. *Overview of the FGF23 - Klotho axis.* **Kuro-o,M.;** 2010, *Pediatr Nephrol*, Vol. 25, pp. 583-590.
57. *Fibroblast growth factor 23 (FGF23) predicts progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study.* **Fliser,D.;** **Kollerits,B.;** **Neyer,U.;** **Ankerst,D.P.;** **Lhotta,K.;** **Lingenhel,A.;** **Ritz,E.;** **Kronenberg,F.** 2007, *J Am Soc Nephrol*, Vol. 18, pp. 2601-2607.
58. *Regulation of fibroblast growth factor-23 in chronic kidney disease.* **Westerberg,P-A.;** **Linde,T.;** **Wikström,B.;** **Ljunggren,O.;** **Stridsberg,M.;** **Larson,T.** 2007, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 22, pp. 3202-3207.
59. *New concepts in renal osteodystrophy.* **Hruska,K.A.** 1998, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 13, pp. 2755-2760.
60. *Principles of Bone Biology.* **Schmidt,A.;** **Harada,S.;** **Rodan,G.** 2002, in *Principles of Bone Biology* (eds.Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A., Academic-San Diego), pp. 1455-1466.
61. *Bone cell response in uremia.* **Gonzalez,E.;** **Martin,K.** 1996, *Seminars Dial*, Vol. 9, pp. 339-346.
62. *Adenyl cyclase and interleukin 6 are downstream effectors of parathyroid hormone resulting in stimulation of bone resorption.* **Greenfield,E.M.;** **Shaw,S.M.;** **Gornik,S.A.;** **et,al.** 1995, *J Clin Invest*, Vol. 96, pp. 1238-1244.
63. *Serum interleukin-6 in renal osteodystrophy: relationship with serum PTH and bone remodeling markers.* **Montalban,C.;** **Garcia-Unzueta,M.T.;** **De Francisco,A.;** **Amado,J.A.** 1999, *Horm Metab Res*, Vol. 31, pp. 14-17.
64. *Unbiased determination of cytokine localization in bone: Colocalization of interleukin-6 with osteoblasts in serial sections from monkey vertebrae.* **Johnson,C.S.;** **Jerome,C.P.;** **Brommage,R.** 5, 2000, *Bone*, Vol. 26, pp. 461-467.
65. *Parathyroid hormone (PTH) and PTH-like protein (Plp) stimulate interleukin-6 production by osteogenic cells - A possible role of interleukin-6 in osteoclastogenesis.* **Löwik,C.;** **Vanderpluijm,G.;** **Bloys,H.;** **Hoekman,K.;** **Kijovet,O.;** **Aarden,L.A.;** **Papapoulos,S.E.** 1989, *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 162, pp. 1546-1552.
66. *Interleukin 11: a new cytokine critical for osteoclast development.* **Girasole,G.;** **Passeri,G.;** **Jilka,R.L.;** **Manolagas,S.C.** 1994, *J Clin Invest*, Vol. 93, pp. 1516-1524.
67. *Control of osteoblast function and regulation of bone mass.* **Shun-Ici,H.;** **Gideon,A.R.** 2003, *Nature*, Vol. 43, pp. 349-355.

68. *Bone resorption by osteoclasts.* **Teitelbaum,S.L.** 2000, Science, Vol. 289, pp. 1508-1514.
69. *Regulation of the differentiation and function of osteoclasts.* **Chambers,T.J.** 2000, J Pathol, Vol. 192, pp. 4-13.
70. *Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling.* **Bonewald,L.F.; Mundy,G.R.** 1990, Clin Orthop Relat Res, Vol. 250, pp. 261-276.
71. *Transforming growth factor-beta regulates growth as well as collagen and fibronectin synthesis of human marrow fibroblasts.* **Kimura,A.; Katoh,O.; Hyodo,H.; Kuramoto,A.** 1989, Br J Hematol, Vol. 72, pp. 486-491.
72. *Extracellular matrix and growth factors: an integrated interplay controlling tissue repair and progression to disease.* **Haralson,M.A.** 1993, Lab Invest, Vol. 69, pp. 369-372.
73. *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density.* **Simonet,W.S.; Lacey,D.L.; Dunstan,C.R.; Kelly,M.; Chang,M.S.; Luthy,R.; et,al.** 1997, Cell, Vol. 89, pp. 309-319.
74. *Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis - inhibitory factor and is identical to TRACE/RANKL.* **Yasuda,H.; Shima,N.; Nakagawa,N.; Yamaguchi,K.; Kinosaki,M.; Mochizuki,S.; et,al.** 1998, Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 95, pp. 3697-3602.
75. *Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification.* **Bucay,N.; Sarosi,I.; Dunstan,C.R.; et,al.** 1998, Genes Dev, Vol. 5, pp. 1260-1268.
76. *RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism.* **Li,J.** 2000, Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 97, pp. 1566-1571.
77. *Expansile skeletal hyperphosphatasia is caused by a 15-base pair tandem duplication in TNFRSF1. A encoding RANK and is allelic to familial expansive osteolysis.* **Whyte,M.P.; Hughes,A.E.** 2002, J Bone Min Res, Vol. 17, pp. 26-29.
78. *Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function.* **Udagawa,N.** 2000, Endocrinology, Vol. 141, pp. 3478-3484.
79. *RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function.* **Schoppet,M.; Preissner,K.T.; Hofbauer,L.C.** 2002, Arterioscler Tromb Vasc Biol, Vol. 22, pp. 549-553.
80. *The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption.* **Hofbauer,L.C.; Khosla,S.; Dunstan,C.R.; Lacey,D.L.; Boyle,W.J.; Riggs,B.L.** 2000, J Bone Min Res, Vol. 15, pp. 2-12.

81. *Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells.* **Hofbauer,L.C.; Khosla,S.; Dunstan,C.R.; Lacey,D.L.; Spelsberg,T.C.; Riggs,B.L.** 1999, *Endocrinology*, Vol. 140, pp. 4367-4370.
82. *Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis.* **Hofbauer,L.C.; Gori,F.; Riggs,B.L.; Lacey,D.L.; Dunstan,C.R.; Spelsberg,T.C.; et,al.** 1999, *Endocrinology*, Vol. 140, pp. 4382-4389.
83. *Serum osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor kappa B (RANKL) in healthy children and adolescents.* **Wasilewska,A.; Rybi-Szuminska,A.A.; Zoch-Zwierz,W.** 12, 2009, *J Pediatr Endocrinol Metab*, Vol. 22, pp. 1099-1104.
84. *Interleukin-27 inhibits human osteoclastogenesis by abrogating RANK-mediated induction of nuclear factor of activated T cells c1 and suppressing proximal RANK signaling.* **Kallioliias,G.D.; Zhao,B.; Triantafyllopoulou,A.; Park-Min,K.H.; Ivashkiv,L.B.** 2, 2010, *Arthritis Rheum*, Vol. 62, pp. 402-413.
85. *Serum osteoprotegerin and renal osteodystrophy.* **Coen,G.; Ballantini,P.; Balducci,A.; et,al.** 2, 2002, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 17, pp. 233-238.
86. *Elevated osteoprotegerin levels predict cardiovascular events in new hemodialysis patients.* **Nishiura,R.; Fujimoto,S.; Sato,Y.; et,al.** 3, 2009, *Am J Nephrol*, Vol. 2, pp. 257-263.
87. *Serum osteoprotegerin is a predictor of progression of atherosclerosis and coronary calcification in hemodialysis patients.* **Kurnatowska,I.; Grzelak,P.; Kaczmarska,M.; Stefanczyk,L.; Nowicki,M.** 4, 2011, *Nephron Clin Pract*, Vol. 117, pp. 297-304.
88. *Plasma osteoprotegerin, arterial stiffness, and mortality in normoalbuminemic Japanese hemodialysis patients.* **Nakashima,A.; Carrero,J.J.; Qureshi,A.R.; et,al.** 6, 2011, *Osteoporos Int*, Vol. 22, pp. 165-1701.
89. *Associations between osteoprotegerin and femoral neck BMD in hemodialysis patients.* **Doumouchtsis,K.K.; Kostakis,A.I.; Doumouchtsis,S.K.; et,al.** 1, 2008, *J Bone Min Res*, Vol. 26, pp. 66-72.
90. *Localization of osteogenic protein-1 (OP-1) mRNA and protein expression in kidney.* **Paredes,A.; Piqueras,A.I.; Briscoe,D.M.** 1993, *J Am Soc Nephrol*, Vol. 4, p. 700 (abstract).
91. *Treatment of a murine model of high-turnover renal osteodystrophy by exogenous BMP-7.* **Gonzalez,E.; McCartney,J.E.; Hruska,K.A.; Tondravi,M.M.; Lund,R.J.; Martin,K.** 4, 2002, *Kidney Int*, Vol. 61, pp. 1322-1331.
92. *Bone morphogenetic protein 7: a novel treatment for chronic renal and bone disease.* **Li,T.; Mathew,S.; Hruska,K.A.; Surendran,K.; Zawaideh,M.A.** 4, 2004, *Current Opinion Nephrol Hypert*, Vol. 13, pp. 417-422.

93. *Low turnover osteodystrophy and vascular calcification are amenable to skeletal anabolism in an animal model of chronic kidney disease and the metabolic syndrome.* **Davies,M.R.; Hruska,K.A.; Lund,R.J.; Mathew,S.** 2005, J Am Soc Nephrol, Vol. 16, pp. 917-928.
94. *Connections between vascular calcification and progression of chronic kidney disease: therapeutic alternatives.* **Hruska,K.A.; Lund,R.J.; Mathew,S.; Davies,M.R.** 2005, Kidney Int, Vol. 39, pp. S142-S151.
95. *Influence of uremia and hemodialysis on circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor alfa.* **Herbelin,A.; Nguyen,A.T.; Zingraff,J.; Ureña,P.; Descamps-Latscha,B.** 1990, Kidney Int, Vol. 37, pp. 116-125.
96. *Elevated circulating levels of interleukin-6 in patients with chronic renal failure.* **Herbelin,A.; Ureña,P.; Nguyen,A.T.** 1991, Kidney Int, Vol. 39, pp. 954-960.
97. *Impaired release of interleukin-6 from human osteoblastic cells in the uremic milieu.* **Steddon,S.J.; McIntyre,C.W.; Schroeder,N.J.; Burrin,J.M.; Cunningham,J.** 2004, Nephrol Dial Transplant, Vol. 19, pp. 3078-3083.
98. *Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients.* **Pecoits-Filho,R.; Heimbürger,O.; Bárány,P; et,al.** 2003, Am J Kidney Dis, Vol. 43, pp. 1212-1218.
99. *Balance between IL-1beta, TNF alpha, and their specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis: relationships with activation markers of T cells, B cells and monocytes.* **Descamps-Latscha,B.; Herbelin,A.; Nguyen,A.T.; Roux-Lombard,P.; Zingraff,J.; Moynot,A.; Verger,C.; Dahmane,D.; De Groote,D.; Jungers,P.; Dayer,J.M.** 1995, J Immunol, Vol. 154, pp. 882-892.
100. *Mortality, malnutrition and atherosclerosis in end-stage renal disease: What is the role of interleukin-6?* **Stenvinkel,P.; Barany,P; Heimbürger,O.; et,al.** 2002, Vol. 61, pp. S103-S108.
101. *Potential role of cytokines in renal osteodystrophy.* **Ferreira,A.; Simon,P.; Drüeke,T.; Descamps-Latscha,B.** 1996, Nephrol Dial Transplant, Vol. 11, pp. 399-400.
102. *Soluble IL-6 receptor levels in patients on chronic hemodialysis.* **Disthabanchong,S.; Gonzalez,E.A.; Martin,K.J.** 4, 2002, Clin Nephrol, Vol. 58, pp. 289-295.
103. *IL-10, IL-6 and TNF-alpha: Central factors in the altered cytokine network of uremia - The good, the bad and the ugly.* **Stenvinkel,P.; Ketteler,M.; Johnson,R.; Lindholm,B.; Pecoits-Filho,R.; Riella,M.; Heimbürger,O.; Cederholm,T.; Girndt,M.** 2005, Kidney Int, Vol. 67, pp. 1216-1233.
104. *Systemic and intraperitoneal interleukin-6 system during the first year of peritoneal dialysis .* **Carvalho,M.J.; Heimbürger,O.; Lindholm,B.; Stenvinkel,P.** 1, 2006, Perit Dial Int, Vol. 26, pp. 53-63.

105. *Comparative effect of oral pulse and intravenous calcitriol treatment in hemodialysis patients: The effect on serum IL-1 and IL-6 levels and bone mineral density.* **Turk,S.; Akbulut,M.; Yildiz,A.; Gurbileck,M.; Gonen,S.; Tombul,Z.; Yeksan,M.** 2, 2002, ephron, Vol. 90, pp. 188-194.
106. *Bone resorption and mRNA expression of IL-6 and IL-6 receptor in patients with renal osteodystrophy.* **Langub,M.C.; Nicholas,J.; Koszewski,J.; Turner,H.V.; Monier-Faugere,M-C.; Geng,Z.; Malluche,H.** 1996, Kidney Int, Vol. 1996, pp. 515-520.
107. *Cytokine accumulation in osteitis fibrosa of renal osteodystrophy.* **Duarte,M.E.; Carvalho,E.F.; Cruz,E.A.; Lucena,S.B.; Andress,D.L.** 1, 2002, Braz J Med Biol Res, Vol. 35, pp. 25-29.
108. *IL-1beta, TNF-alpha, TGF-beta and BFGF expression in bone biopsies before and after parathyroidectomy.* **Santos,F.R.; Moyses,R.M.; Montenegro,F.L.; Jorgetti,V.; Noronha,I.L.** 2003, Kidney Int, Vol. 63, pp. 899-907.
109. *Effects of TGF-beta, TNF alpha, IL-beta and il-6 alone or in combination, and tyrosine kinase inhibitor on cyclooxygenase expression, prostaglandin E2 production and bone resorption in mouse calvaria bone cells.* **Park,Y.G.; Kang,S.K.; Kim,W.J.; Lee,Y.C.; Kim ,C.H.** 2004, Int J Biochem Cell Biol, Vol. 36, pp. 2270-2280.
110. *Local bone injections of LPS and M-CSF increase bone resorption by different pathways in vivo in rats.* **Orcel,P.; Feuga,M.; Bielakoff,J.; de Vernejoul,M.C.** 27, 1993, Am J Physiol, Vol. 264, pp. 391-397.
111. *Osteoporosis in hemodialysis patients revisited by bone histomorphometry: a new insight into an old problem.* **Barreto,F.C.; Barreto,D.V.; Moyses,R.M.A.; Neves,C.L.; Jorgetti,V.; Draibe,S.E.; Canziani,M.E.; Carvalho,A.B.** 2006, Kidney Int, Vol. 69, pp. 1852-1857.
112. *Insulin-like growth factor system components in hyperparathyroidism and renal osteodystrophy.* **Jehle,P.M.; Ostertag,A.; Shulten,K.; et,al.** 2000, Kidney Int, Vol. 57, pp. 423-436.
113. *Biochemical markers of bone turnover in the diagnosis of renal osteodystrophy in dialysed children.* **Baskin,E.; Bakkaloglu,G.; Topaloglu,R.; Besbas,N.; Saatçi,U.; Ozen,S.** 1, 2004, Turk J Pediatr, Vol. 46, pp. 28-31.
114. *Differential regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II from cultures neonatal mouse calvaria by parathyroid hormone, transforming growth factor-beta and 1,15-dihydroxyvitamin D3.* **Linkhart,T.A.; Keffer,M.J.** 1991, Endocrinology, Vol. 128, pp. 1511-1518.
115. *Serum levels of insulin-like growth factor system components and relationship to bone metabolism in type 1 and type 2 diabetes mellitus patients.* **Jehle,P.M.; Jehle,D.R.; Mohan,S.; Boehm,B.O.** 1998, J Endocrinol, Vol. 159, pp. 297-306.

116. *A block at the toll gate.* **Mak,T.W.; Yeh,W.C.** 2002, *ature*, Vol. 418, pp. 835-836.
117. *Osteoprotegerin, IL-6, IL-1 and TGF-beta concentrations during acetate-free biofiltration.* **Buemi,M.; Floccari,F.; Crisafulli,A.; Cavallaro,E.; Ruello,A.; Caccamo,C.; Loddo,S.; Aloisi,C.; Corica,F.; Romeo,A.; Frisina,N.; Teti,D.** 2, 2005, *J Nephrol*, Vol. 18, pp. 148-153.
118. *Role of cytokines in renal osteodystrophy.* **Monier-Faugere,M-C.; Malluche,H.H.** 4, 1997, *Current Opinion Nephrol Hypert*, Vol. 6, pp. 327-332.
119. *Renal osteodystrophy in predialysis and hemodialysis patients: comparison of histological patterns and diagnostic predictivity of intact PTH.* **Coen,G.; Ballanti,P.; Bonnucci,E.** 2002, *Nephron*, Vol. 91, pp. 103-111.

6 Carência em 25-hidroxivitamina D no insuficiente renal crônico

Os doentes com insuficiência renal crônica apresentam carência em vitamina D ativa, a qual foi atribuída, até recentemente, apenas à redução da massa renal funcionante e, conseqüentemente, à diminuição da atividade da 1- α -hidroxilase nas células tubulares proximais renais (1; 2).

Deste modo, o agravamento crescente da função renal acompanha-se de uma redução progressiva dos níveis circulantes da forma mais ativa de vitamina D, a 1,25(OH)₂D₃ ou calcitriol.

Mais recentemente, foi possível demonstrar que outros mediadores e mecanismos etiopatogênicos responsáveis por esta deficiência em vitamina D estão presentes, desde os estádios iniciais da insuficiência renal crônica.

Neste contexto, ganha particular relevância o aumento dos níveis circulantes de FGF-23, em resposta adaptativa à necessidade de aumentar a fração de excreção de fósforo na urina (3; 4; 5) (6).

Embora a carência em vitamina D ativa seja reconhecida e tratada, com menor ou maior sucesso, pelos nefrologistas, há mais de 3 décadas, apenas nos últimos anos foi valorizada a carência em vitamina D nativa ou calcidiol (7) (8) (9).

Esta última, corresponde à 25(OH)vitamina D₃ (ou calcidiol), a qual tem de sofrer a hidroxilação pela 1- α -hidroxilase (CYP27B1), para se transformar na forma ativa (1).

Face ao entendimento, até ao passado recente, que a 1- α -hidroxilase atuava quase exclusivamente no rim, facilmente se entende o esquecimento e a pouca relevância dada, historicamente, à vitamina D nativa, nos doentes urêmicos (10).

No entanto, tendo em conta que, recentemente, foram identificados múltiplos órgãos e tecidos com células que apresentam significativa atividade da 1- α -hidroxilase, o metabolismo da vitamina D tem merecido um crescente interesse da comunidade médica de diversas especialidades (11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18) e, inclusivamente, tem extravasado para fora da literatura científica convencional (19).

O calcidiol, para além de substrato para a síntese de calcitriol, parece atuar, por mecanismos autócrino e/ou parácrino em muitos tecidos, que expressam o recetor da vitamina D, e nos quais foi demonstrada, muito recentemente, atividade da 1- α -hidroxilase (20) (21).

Estima-se que apenas 5% do calcidiol seja utilizado no rim para a síntese de calcitriol e, conseqüentemente, para exercer funções endócrinas sistémicas, à distância.

Pelo contrário, mais de 85% do calcidiol é utilizado diretamente nas células alvo, que expressam simultaneamente o recetor celular para a vitamina D e a 1- α -hidroxilase (CYP27B1) (9).

Nestas células, por mecanismo autócrino e/ou parácrino, a vitamina D vai exercer grande parte dos seus efeitos locais, que provavelmente são tão ou mais relevantes, como os efeitos esqueléticos e sobre o metabolismo mineral.

Perante a escassez de informação, na literatura médica, sobre a deficiência em calcidiol nos doentes com IRC em estágio 5d (isto é, em diálise) (22) (23), resolvemos aprofundar este tema.

Na nossa investigação, cujos resultados são apresentados nos capítulos seguintes, demos particular relevância às seguintes vertentes:

- Caracterização da população hemodialisada portuguesa no que respeita aos níveis séricos de calcidiol, identificando a população com suficiência, insuficiência ou deficiência nesta vitamina;
- Correlação entre os níveis de calcidiol e a presença de fatores de risco cardiovascular, (que têm sido identificados nos doentes urémicos), nomeadamente as calcificações vasculares, a insuficiência cardíaca, a hipertrofia ventricular e a inflamação;
- Finalmente, numa avaliação prospetiva, de intervenção terapêutica, tentar corrigir a insuficiência ou deficiência em 25(OH)vitamina D3 e avaliar se essa correção se associa a uma redução dos fatores de risco cardiovascular. Esta última intervenção foi totalmente inovadora, visto ser a primeira avaliação prospetiva da suplementação com vitamina D nativa, em doentes hemodialisados.

Surpreendentemente (e à semelhança do que foi descrito por outros investigadores numa população de doentes com IRC, de gravidade variável, em fase pré dialítica), a prevalência de deficiência ou insuficiência em vitamina D foi muito superior ao esperado (24).

Apenas 20,6% dos nossos doentes hemodialisados apresentavam níveis séricos normais (mesmo considerando os valores médios anuais, após o Verão e após o Inverno) (25).

A nossa investigação conduziu-nos a resultados originais, ao identificar os níveis baixos de 25(OH)vitamina D3 como um provável fator de risco cardiovascular em hemodialisados, visto que a deficiência nesta vitamina se associou, de forma muito significativa, ao aumento da prevalência de calcificações vasculares, a pressão de pulso mais elevada e a níveis séricos aumentados de “BNP-Brain natriuretic peptide” (25).

O passo seguinte do nosso projeto de investigação clínica nesta área consistiu na suplementação com colecalciferol, de forma a tentar corrigir a insuficiência ou deficiência em calcidiol em doentes hemodialisados e, desse modo, tentar interferir sobre a expressão de fatores de risco cardiovascular, descritos nesta população.

Os nossos resultados, publicados em 2010, mostram, pela primeira vez em doentes hemodialisados, que é possível reduzir a prevalência de fatores de risco de morbidade e mortalidade, mediante a correção da insuficiência ou deficiência em calcidiol, efetuada através da terapêutica com colecalciferol oral (26).

Esta intervenção terapêutica, ao longo dum estudo prospetivo com um ano de duração, não se associou a quaisquer efeitos acessórios e permitiu reverter vários fatores de risco cardiovascular em doentes hemodialisados.

A relação eficácia/custo desta abordagem terapêutica é altamente vantajosa, tendo em conta o baixo custo da suplementação com colecalciferol e a larga janela terapêutica existente (muito baixa probabilidade de atingir níveis de toxicidade).

Este nosso estudo de suplementação com colecalciferol em doentes hemodialisados, foi integrado numa meta-análise recente, na qual foram avaliados todos os manuscritos publicados entre 1966 e final de 2009, sobre este tema (27). Neste longo período, foram apenas identificados 22 estudos, dos quais 5 correspondiam a ensaios clínicos aleatorizados e com dupla ocultação ou com ocultação parcial.

A nossa investigação constituiu o estudo prospetivo realizado numa população mais vasta de doentes (158 hemodialisados) e por um período longo (1 ano).

Tendo em conta que os nossos doentes foram tratados de acordo com as orientações dos KDOQI, os nossos achados têm merecido particular destaque e estimulado outras linhas de investigação.

Com base nestes resultados promissores, acabamos de iniciar um estudo prospetivo, aleatorizado (ao contrário do acima referido), em hemodialisados incidentes, para confirmar e aprofundar os efeitos da correção da insuficiência / deficiência em calcidiol, mediante a suplementação com colecalciferol oral.

6.1 Insuficiência em vitamina D nos doentes com insuficiência renal crónica

Na pele exposta à luz solar (mais especificamente às radiações ultravioleta tipo B), dá-se a conversão de 7-deidrocolesterol em pré-vitamina D3, a qual é imediatamente transformada em vitamina D3 (28).

A outra fonte de vitamina D é a dieta, a partir da qual se obtém a vitamina D2 ou ergocalciferol (de origem vegetal) e a vitamina D3 ou colecalciferol (de origem animal) (8).

A vitamina D (Vitamina D2 + vitamina D3) circula ligada aos quilomicrons, tendo uma vida média em circulação muito curta (cerca de 24 horas) e sendo transportada para o tecido adiposo (onde fica depositada) e/ou para o fígado (29).

No fígado, por ação da 25-hidroxilase da vitamina D, o ergocalciferol transforma-se em ercalcidiol e o colecalciferol em calcidiol.

Habitualmente o ercalcidiol e o calcidiol são denominados conjuntamente por 25-hidroxivitamina D, sendo determinados conjuntamente pela maioria dos ensaios para determinação da vitamina D e dos seus metabolitos (30).

O método mais rigoroso para determinar os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D, permitindo-nos separar o ercalcidiol do calcidiol, é a cromatografia líquida de elevada eficácia. No entanto, este método é muito laborioso, com custos elevados e apenas disponível em poucos laboratórios.

Para obviar estas limitações, foi desenvolvido em 1985 um método de radioimunoensaio para determinação da 25-hidroxivitamina D, o qual mostrou uma excelente correlação com os resultados obtidos por cromatografia líquida de alta eficácia (31).

Desde 2004 foram introduzidos no mercado, métodos de determinação da 25-hidroxivitamina D totalmente automatizados, por quimiluminescência (32) (33). Obviamente estes métodos automatizados medem a soma da 25-hidroxivitamina D₂ com a 25-hidroxivitamina D₃, o que não parece ter qualquer relevância clínica, visto a ação de ambas ser sobreponível (34).

A relevância das medições (no soro ou no plasma) dos níveis circulantes de 25-hidroxivitamina D deve-se ao facto desta forma da vitamina D apresentar uma vida média em circulação muito prolongada (superior a 3 semanas) e, conseqüentemente, ser o melhor marcador bioquímico para avaliar o grau de suficiência ou insuficiência / deficiência nesta vitamina (32).

Os níveis circulantes desejáveis de 25-hidroxivitamina D situam-se entre 30 e 60 ng/mL (35) (36). Entre 15 e 30 ng/mL considera-se um quadro de insuficiência e o limiar de 15 ng/mL define o valor abaixo do qual se diagnóstica a deficiência em vitamina D (36).

No extremo oposto, valores superiores a 150 ng/mL são considerados tóxicos, apesar de raríssimas vezes atingidos, o que ilustra a larga “janela

terapêutica de segurança” para suplementação com vitamina D (como discutiremos nos capítulos seguintes) (29).

Os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D são influenciados pela estação do ano (sendo mais elevados após o Verão), pelo gênero (habitualmente mais baixos nas mulheres) e pelo IMC - índice de massa corporal (indivíduos com IMC mais elevado têm, mais frequentemente, insuficiência ou deficiência em 25-hidroxivitamina D) (37) (38).

No estudo de 326 indivíduos, sem insuficiência renal, integrados no European Vertebral Osteoporosis Study (EVOS), Gomez-Alonso e colaboradores demonstraram que com níveis de 25-hidroxivitamina D superiores a 40 ng/mL não se observava nenhum caso associado de hiperparatiroidismo (definido por um nível sérico de paratohormona intacta superior a 65 pg/mL) (39).

Pelo contrário, nos níveis de insuficiência e deficiência de 25-hidroxivitamina D já se observavam quadros laboratoriais de hiperparatiroidismo, em 16% e 33% dos casos, respectivamente. Nesta população, os únicos marcadores independentes de predição dos níveis séricos de PTH intacta foram a creatinina sérica e os níveis circulantes de 25-hidroxivitamina D.

A vitamina D, hidroxilada na posição 25, sempre foi considerada a forma inativa desta vitamina, por oposição à sua forma mais ativa, que é a 1,25-dihidroxivitamina D.

Esta forma ativa resulta da ação da 1- α -hidroxilase (CYP27B1) sobre a 25-hidroxivitamina D. Também neste caso se pode separar, por cromatografia líquida de alta eficácia, a 1,25-dihidroxivitamina D₂ (ou ercalcitriol) da 1,25-dihidroxivitamina D₃ (ou calcitriol) (30).

A 1,25-dihidroxivitamina D tem uma semivida muito curta, de 4 a 6 horas, e circula em níveis séricos ou plasmáticos cerca de 1000 vezes inferiores aos da 25-hidroxivitamina D.

As determinações da 1,25-dihidroxivitamina D são influenciadas por múltiplos fatores, entre os quais são de salientar, pela sua relevância, os níveis

circulantes de 25-hidroxivitamina D e a atividade da 24-hidroxivitamina D hidroxilase (CYP24A1), que metaboliza e inativa a 1,25-dihidroxivitamina D (30).

A atividade da 1- α -hidroxilase renal é influenciada por múltiplos fatores, particularmente pelas hormonas e iões diretamente envolvidas no metabolismo fosfo-cálcico: a sua ação é estimulada pela paratormona, pela calcitonina, pela hormona do crescimento, pelos estrogénios, pela prolactina, pela hipocalcemia e pela hipofosfatemia sendo, pelo contrário, inibida pelo produto da sua ação (a 1,25-dihidroxivitamina D), pelo FGF-23 (como já discutimos em capítulos anteriores) e pela acidose metabólica (29) (40).

O FGF-23 é, provavelmente, o mais importante regulador dos níveis séricos de fósforo e de calcitriol, exercendo os seus efeitos sobre este último, mediante o controlo da atividade da 1- α -hidroxilase renal (síntese de calcitriol) e sobre a 24-hidroxivitamina D hidroxilase (metabolização do calcitriol) (41).

A 24-hidroxivitamina D hidroxilase (CYP24A1) para além de metabolizar o calcitriol, também metaboliza a 25-hidroxivitamina D. No entanto, tendo em conta que tem uma afinidade para esta última 10 vezes inferior à que apresenta para o calcitriol, as implicações nos níveis circulantes das 2 formas de vitamina D são significativamente diferentes (42).

Para além da hiperfosfatemia, também os níveis séricos elevados de calcitriol vão estimular a síntese e elevação dos níveis circulantes de FGF-23, estabelecendo-se assim um sistema equilibrado do retro controlo (4) (43).

Deste modo, o FGF-23 é, simultaneamente, uma hormona fosfatúrica (uma fosfatidina) e uma hormona de contra regulação da vitamina D no eixo endócrino osso-rim-glândulas paratiróides (44).

No entanto, no quadro urémico, a redução progressiva do número da função renal conduz à diminuição da fosfatúria e da fração de excreção de fósforo, induzidas pelo FGF-23.

Nestas circunstâncias observa-se uma redução da resposta renal ao FGF-23, secundária à menor expressão tubular do klotho, o seu coreceptor específico (45) (43).

O klotho é uma proteína com uma única porção transmembranária, que se expressa sobretudo no tubo contornado proximal e, em muito menor concentração, no tubo contornado distal (46).

A expressão do complexo klotho-recetor tipo 1 do FGF observa-se igualmente nas glândulas paratiróides, o outro tecido alvo do FGF-23 (47).

Na urémia, a expressão transmembranária do klotho no tecido paratiroide está acentuadamente diminuída, o que constitui um fator de agravamento do hiperparatiroidismo secundário (48).

Nas fases avançadas da insuficiência renal crónica (IRC fases 4 e 5), os níveis circulantes de FGF-23 chegam a atingir níveis 10000 vezes superiores aos da população normal, o que tem sido associado a aumento da morbilidade e mortalidade cardiovascular nesta população (6).

Apesar de não haver ainda evidência científica sobre o significado clínico de níveis circulantes tão elevados de FGF-23, os efeitos podem resultar do papel direto do FGF-23 ou da sua ação através de outros mecanismos etiopatogénicos, incluindo a redução dos níveis de 1,25-dihidroxitamina D (46).

Atendendo a todas estas variáveis e limitações, os doseamentos de 1,25-dihidroxitamina D não são habitualmente úteis, reprodutíveis nem consistentes, no diagnóstico da deficiência em vitamina D.

Por estes motivos, a determinação dos níveis circulantes de 1,25-dihidroxitamina D não se justifica, na grande maioria dos casos, mesmo no contexto de investigação clínica.

A 1,25-dihidroxitamina D exerce as suas principais funções no esqueleto e no metabolismo fosfo-cálcico, através da ligação ao complexo VDR-RXR (recetor da vitamina D - recetor x do ácido retinóico).

Este complexo vai promover a absorção intestinal de cálcio (através da ativação do TRPV6, “transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6”) e da calbindina (uma proteína fixadora do cálcio).

A 1,25-dihidroxitamina D liga-se igualmente ao seu recetor específico, existente nos osteoblastos, o que vai provocar um aumento da expressão do RANKL (“receptor activator of nuclear factor- κ B”).

A ligação do RANKL circulante ao seu receptor específico RANK, vai induzir a diferenciação dos pré-osteoclastos em osteoclastos e, desse modo, completar o ciclo da formação/reabsorção óssea (29).

Existem muitas outras ações extra-esqueléticas da 1,25-dihidroxitamina D, que resultam da ligação desta vitamina aos seus recetores específicos existentes em múltiplos tecidos, nomeadamente: células musculares lisas dos vasos, células endoteliais, cardiomiocitos, células tubulares renais (dos tubos proximais, distais e coletores), hepatócitos, células dos ilhéus β do pâncreas, células tipo C da tiroide, células das parótidas, células do aparelho gastrointestinal (esófago, estômago e intestino), bem como da pele, do tecido mamário, dos ovários, placenta e endométrio, dos espermátócitos e de muitos outros tecidos, incluindo os neurónios cerebrais.

No sistema imunitário existem recetores específicos para a 1,25-dihidroxitamina D no timo, na medula óssea, bem como nos linfócitos T e B (1) (28) (49).

Alguns destes tecidos expressam igualmente a enzima 25-hidroxitamina D-1- α -hidroxilase, permitindo a transformação intracelular de 25-hidroxitamina D em 1,25-dihidroxitamina D.

Nestas circunstâncias, a 25-hidroxitamina D pode exercer efeitos autócrinos ou parácrinos em múltiplos tecidos, deixando de ser apenas um substrato para transformação em calcitriol no tecido renal (49) (50).

Como já referimos, cerca de 85% da 25-hidroxitamina D circulante é utilizada, diretamente, nas células que expressam a 25-hidroxitamina D-1- α -hidroxilase, onde exerce os seus efeitos por mecanismo parácrino / autócrino e

apenas 15% é metabolizada no rim, na síntese de 1,25-dihidroxitamina D (28) (51).

Estes efeitos intra-celulares da 1,25-dihidroxitamina D podem ser independentes dos níveis circulantes desta forma mais ativa da vitamina D e parecem até correlacionar-se predominantemente com a disponibilização do seu substrato (a 25-hidroxitamina D) e com o balanço entre as enzimas de síntese e de catabolização do calcitriol, isto é, das atividades da 1- α -hidroxilase e da 24-hidroxitamina D hidroxilase, respetivamente (29).

Também as proteínas fixadoras da vitamina D “VDBP-vitamin D binding protein” (presentes no sangue, nas membranas celulares e/ou no interior das células alvo), bem como o “fator de transcrição nuclear”, contribuem para o controlo dos efeitos endócrinos (à distância) da vitamina D, bem como dos efeitos autócrinos e parácrinos desta vitamina (1) (9).

É precisamente nos quadros de diminuição da função renal, com perda de atividade das células tubulares renais, que parece ganhar mais relevância (ou pelo menos ser mais evidente) a importância da hidroxilação extra renal da 25-hidroxitamina D (1).

À semelhança do que é claramente apontado por Cannata J. (35), também nós defendemos que o papel da 25 hidroxitamina D tem sido pouco valorizado e o estudo das suas acções nitidamente negligenciado, nos doentes urémicos.

Os doentes hemodialisados com insuficiência ou deficiência em 25-vitamina D apresentaram uma acentuada redução da taxa de formação óssea (BFR-bone formation rate), bem como um aumento do volume osteóide e da superfície de tecido osteóide, numa avaliação retrospectiva de 104 hemodialisados, sujeitos a biopsia óssea com avaliação histomorfométrica, efetuada por Choen e colaboradores.

Estes resultados apontam para um efeito estimulador da 25-hidroxitamina D, sobre a formação e sobre a mineralização óssea (52).

Igualmente, após transplantação renal, identificaram-se níveis de insuficiência em 25-hidroxitamina D em 75,5% dos doentes (dos quais 27,3%

correspondiam a níveis de deficiência (< 15 ng/mL)) numa população de 419 transplantados renais (53).

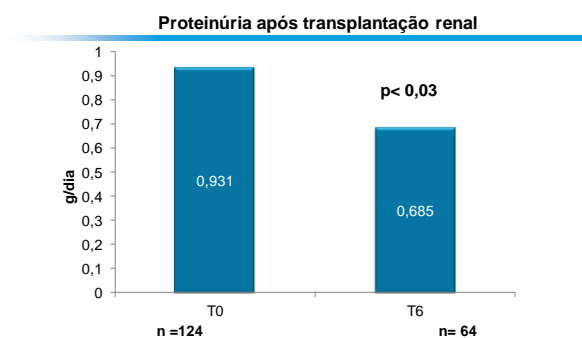
Os níveis de 25 hidroxivitamina D apresentavam uma correlação negativa, e estatisticamente significativa, com os níveis circulantes de iPTH (53).

Também nós iniciámos um protocolo de suplementação com colecalciferol em 124 doentes transplantados na nossa unidade, tendo como objetivo manter os doseamentos de vitamina D nativa em níveis séricos de suficiência (superiores a 30 ng/mL).

A análise interina dos resultados (ainda não publicados), ao fim de 6 meses de suplementação, evidencia que foi possível elevar os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D de 14.6 ± 7.8 ng/mL para 30.5 ± 12.3 ng/mL.

Dos 58,9% de doentes que apresentavam deficiência em 25-hidroxivitamina D antes da suplementação com colecalciferol, apenas 6,2% se mantiveram deficientes nesta vitamina ao fim de 6 meses.

Mais relevante foi a redução da proteinúria de $0,931 \pm 1,48$ g/24h para $0,685 \pm 0,66$ g/24h após os 6 meses de suplementação com colecalciferol, tendo-se observado uma correlação negativa entre a gravidade da proteinúria e os níveis séricos de 25 hidroxivitamina D ($r=0,30$; $P=0,01$), após suplementação.



A conexão entre vitamina D e proteinúria tem merecido particular atenção dos nefrologistas nos últimos anos, tendo em conta resultados de estudos

observacionais, confirmados no modelo animal, que evidenciaram um aparente efeito protetor da utilização de vitamina D ativa.

A redução da proteinúria em doentes diabéticos com IRC em fase 3 e 4, tratados com paricalcitol (um análogo da vitamina D ativa) foi primeiramente descrita em estudos observacionais, ganhou consistência em modelos animais e foi recentemente confirmada no estudo VITAL, um ensaio clínico aleatorizado, controlado e duplamente cego (54) (55) (56).

Os nossos resultados indicam que a correção da deficiência em vitamina D nativa também se associou a uma redução significativa da proteinúria, numa população de doentes transplantados renais.

Tendo em conta o baixíssimo custo desta intervenção, em que utilizámos colecalciferol por via oral, a relação eficácia/custo é bastante positiva.

Os níveis séricos de PTH intacta, de calcemia e de fosfatemia não variaram significativamente com a suplementação que efetuámos nos nossos doentes transplantados.

Para além dos efeitos sobre o metabolismo ósseo e mineral dos doentes urémicos e do eventual contributo para a redução da proteinúria acima afluído, ao longo dos últimos anos, foram descritos, para a 25-hidroxivitamina D, papéis de grande relevância na fisiopatologia e terapêutica em múltiplas patologias.

Neste sentido vão igualmente os resultados da nossa investigação clínica, que descreveremos de forma detalhada nos capítulos seguintes.

Fomos particularmente estimulados pelo fato dos doentes urémicos, e especificamente dos hemodialisados, apresentarem níveis séricos muito baixos de 25-hidroxivitamina D (na grande maioria dos casos níveis de deficiência marcada) e, simultaneamente, terem uma morbi-mortalidade predominantemente associada a patologia dos órgãos alvo da ação da vitamina D (nomeadamente cardiovascular).

Mediante a ligação ao recetor da vitamina D (recetor nuclear), as diversas formas da vitamina D e os respetivos análogos de síntese parecem controlar a expressão de mais de 200 genes, sendo responsáveis pela diferenciação celular,

por efeitos anti-proliferativos e anti-inflamatórios ou por uma ação imunomoduladora em muitos tecidos (49).

São precisamente estes efeitos que têm justificado a utilização (com bons resultados clínicos) da vitamina D na terapêutica (de forma isolada ou em associação) de patologias tão diversas como a psoríase, artrite reumatóide, doença inflamatória intestinal, diabetes tipo 1 e diversos quadros infecciosos (7) (49) (57).

Os efeitos imunomoduladores da vitamina D estão bem documentados, mas também têm sido alvo de particular interesse nos últimos anos, atendendo à integração de resultados de investigações recentes de áreas muito variadas, como a imunologia, a microbiologia, a oncologia e mesmo a cardiologia e doença aterosclerótica / inflamação crónica.

Os monócitos e os macrófagos, quando expostos a lipopolissacáridos ou ao micobacterium tuberculosis, aumentam a expressão dos genes do recetor da vitamina D e da enzima 25-hidroxivitamina D-1- α -hidroxilase, com o conseqüente aumento da síntese de vitamina D activa.

Nestas circunstâncias, o aumento da 1,25-dihidroxivitamina D induz a síntese de catelicidina, um peptídeo com capacidades de destruição do micobacterium tuberculosis e de inativação de muitos outros agentes infecciosos (11) (58).

A deficiência em 25-hidroxivitamina D e a conseqüente redução na síntese de vitamina D activa, conduz à menor resistência a agentes infecciosos e poderá justificar as diferentes respostas descritas em populações de diversas latitudes ou com diferentes características (59).

Por exemplo, vários investigadores admitem que a maior gravidade dos quadros de tuberculose, observados nos Americanos melanodérmicos, se deve ao facto de apresentarem, habitualmente, níveis muito baixos de vitamina D (12).

Observa-se igualmente uma relação inversa entre os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D3 e a resistência à ação da insulina bem como da intolerância à glicose, que está associada a esta última (14).

Em doentes urémicos, a terapêutica com vitamina D corrigiu a resistência à insulina, apontando para um papel desta vitamina no metabolismo glucídico (quer ao nível do recetor celular para a insulina, quer nas células β do pâncreas) (60).

Também no que respeita ao risco de desenvolver neoplasias, os níveis séricos de insuficiência / deficiência em vitamina D foram claramente associados a um aumento da prevalência de tumores de diversos tecidos, nomeadamente cólon, reto, mama, próstata e cérebro (61).

Curiosamente, em estudos prospetivos e retrospectivos (envolvendo no total mais de trinta mil doentes), níveis de 25-hidroxivitamina D inferiores a 20 ng/ml associaram-se a um aumento de 30% a 50 % na incidência e mortalidade por carcinomas do cólon, reto, próstata e mama (62).

Pelo contrário, estas relações já não se observaram (ou foram muito menos significativas) para os níveis séricos de 1,25-dihidroxivitamina D, o que parece apontar para uma maior relevância da vitamina D nativa (25-hidroxivitamina D) (62).

Também nós, numa população homogénea de hemodialisados, encontramos um perfil muito semelhante ao acima descrito, como discutiremos nos capítulos seguintes.

Os mecanismos de atuação da 25 hidroxivitamina D, para explicar esta significativa redução da incidência de neoplasias, ainda estão por esclarecer.

As explicações que mais frequentemente têm sido apontadas consistem na indução da apoptose e na prevenção da angiogénese, mas muitos outros mecanismos poderão igualmente estar envolvidos (63).

6.2 Deficiência em 25-hidroxi-vitamina D em doentes hemodialisados

Nos doentes hemodialisados identificam-se múltiplas causas, que podem condicionar quadros de insuficiência (entre 15 e 30 ng/mL) ou mesmo de deficiência (inferiores a 15 ng/mL) em vitamina D nativa (25-hidroxivitamina D).

Muitas destas causas estão claramente identificadas na população em geral, mas surgem amplificadas nos doentes urémicos.

Diversos estudos evidenciam que 60 a 100% da população Europeia e Norte Americana, com mais de 65 anos, apresenta insuficiência ou deficiência em vitamina D nativa (64) (65) (66) (67).

A exposição ao sol (mais especificamente às radiações ultravioleta tipo B), está habitualmente reduzida nesta faixa etária, o que parece ser particularmente relevante nas zonas de elevada latitude.

Foi claramente identificada uma associação entre a latitude geográfica e os níveis circulantes de vitamina D, visto que à medida que se caminha do equador para os polos observa-se uma redução progressiva dos níveis circulantes de 25-hidroxivitamina D.

Curiosamente, nas populações residentes em latitudes mais elevadas, observa-se um risco aumentado de linfoma de Hodgkin e de carcinomas do cólon, pâncreas, próstata, e do ovário (68).

Estas neoplasias têm sido associadas a deficiência em 25-hidroxivitamina D, a qual surgiu como fator de risco independente nestes doentes (16) (69) (70).

Por exemplo, num estudo epidemiológico realizado em 38826 doentes americanos, a probabilidade de sofrer o desenvolvimento de um carcinoma do cólon correlacionou-se de forma negativa e inversa com os níveis médios circulantes de 25-hidroxivitamina D (62).

Numa outra população de mulheres com deficiência em 25-hidroxivitamina D, níveis desta vitamina inferiores a 12 ng/mL associaram-se a um risco aumentado em 253%, de desenvolver um carcinoma do cólon (71).

Em países como o Brasil, nomeadamente nas regiões tropicais brasileiras, os níveis médios de 25-hidroxivitamina D são significativamente mais elevados (24) do que os que foram descritos em países de latitude elevada (América do Norte e Europa) (72) (73).

No entanto, como discutimos nos capítulos seguintes, mesmo em países soalheiros como o Brasil ou Portugal, a prevalência de deficiência e insuficiência em vitamina D nativa é muito elevada, na população urémica e particularmente nos doentes dialisados.

Numa população de 144 doentes brasileiros, residentes numa zona subtropical, com insuficiência renal crónica em estádios 2 a 5 (excluindo doentes diabéticos ou em diálise), Cuppari e colaboradores encontraram níveis de insuficiência em 25-hidroxivitamina D em 39,6% de doentes e, apenas num caso, níveis deficientes desta vitamina (24).

Na nossa investigação, apresentamos a única avaliação até agora publicada, sobre níveis de 25-hidroxivitamina D em doentes urémicos portugueses. Em 223 doentes hemodialisados encontramos níveis deficientes (< 15 ng/mL) de 25-hidroxivitamina D em 20,6% dos doentes e níveis insuficientes nesta vitamina (entre 15 e 30 ng/mL) em 33,6% dos doentes (25).

Apesar dos doseamentos efetuados (em todos os doentes) no mês de Novembro (após o Verão / Outono) serem mais elevados que os obtidos (nos mesmos doentes) em Junho (após o Inverno / Primavera), esta diferença não foi estatisticamente significativa. De qualquer modo, na nossa investigação, considerámos como valor basal de 25-hidroxivitamina D, o valor médio entre as 2 determinações acima referidas, nas 2 épocas do ano (25).

A diferença entre os resultados encontrados na população brasileira e os que foram descritos na nossa investigação, justifica-se por diversos fatores, nomeadamente: a diferente latitude, o facto de todos os nossos doentes estarem em programa regular de hemodiálise (versus nenhum dos brasileiros) e ainda por 27% dos nossos doentes serem diabéticos (versus nenhum dos doentes brasileiros).

A nefropatia diabética associou-se a redução da expressão da 25-alfa-hidroxilase e a níveis diminuídos de 25-hidroxivitamina D, particularmente se associada a proteinúria acentuada e a perda urinária de proteína de fixação da vitamina D (“VDBD-vitamin D binding protein”) (74) (75) (76) (51).

A utilização de protetores solares de aplicação cutânea, e a hiperpigmentação da pele, são fatores reconhecidos de deficiência ou insuficiência em vitamina D nativa (64) (73) (72).

Para além de uma reduzida exposição ao sol e às radiações ultravioleta tipo B, existem outras causas que contribuem para a insuficiência / deficiência em vitamina D, tão frequentemente identificada nos doentes prevalentes, em diálise.

Uma dieta enriquecida em óleo de peixe previne a deficiência em vitamina D. Pelo contrário, a deficiente nutrição (particularmente frequente nos doentes em diálise), pode amplificar a carência nesta vitamina.

A utilização de alguns fármacos, nomeadamente alguns anti-convulsivantes aumenta frequentemente o catabolismo da 25-hidroxivitamina D, contribuindo para a redução dos seus níveis circulantes (29).

A insuficiência renal crónica (IRC) acompanha-se ainda da redução do citocromo P450 hepático (Cit P450) e, especificamente, das isoformas desta enzima que participam na 25-hidroxilação da vitamina D (calcidiol).

Num modelo animal de IRC, os ratos urémicos apresentavam níveis circulantes de calcidiol 52% inferiores aos do grupo controlo. Os ratos urémicos (em comparação com os do grupo controlo) produziam 71% menos calcidiol e 48% menos calcitriol, após a administração de vitamina D3 ou de 1- α -hidroxivitamina D3, respetivamente (77).

A relevância da deficiente hidroxilação hepática da vitamina D, no quadro urémico, ganha consistência após ter sido recentemente demonstrado, no modelo animal com IRC, a diminuição da expressão hepática dos citocromos P2C11, 2J3, 3A2 e 27A1. Estes citocromos são as isoformas do citocromo P450, diretamente envolvidos na 25 hidroxilação hepática da vitamina D (77).

O hiperparatiroidismo secundário parece ser responsável, pelo menos em grande parte, pela redução da expressão destes citocromos hepáticos, visto a paratiroidectomia prévia prevenir a redução dos níveis de calcidiol e dos citocromos hepáticos envolvidos na 25-hidroxilação da vitamina D.

6.3 Deficiência em 25-hidroxi-vitamina D e inflamação

Na nossa investigação, baseada numa avaliação de 223 doentes prevalentes e estabilizados em programa regular de hemodiálise, os níveis séricos de 25-hidroxitamina D apresentaram-se baixos ($21,6 \pm 12,2$ ng/mL) e correlacionaram-se negativamente, e de forma muito significativa ($r = -0,25$; $P < 0,001$), com os níveis de proteína C reativa (*vide* no capítulo seguinte o manuscrito 18 desta dissertação) (25).

O eventual papel da 25-hidroxitamina D como mediador (ou, pelo menos, como marcador) anti-inflamatório nos hemodialisados (e muito provavelmente noutras populações) foi ainda reforçado pela correlação positiva, e estatisticamente significativa, com a albuminemia, observada quer na análise univariada quer na análise multivariada dos doentes que estudámos (25).

Na análise multivariada desta população, os níveis reduzidos de 25-hidroxitamina D associaram-se a hipoalbuminemia (IC de 95%: 1,24 a 2,68; $P = 0,003$).

Mais recentemente, o grupo de Pecoits-Filho confirmou os nossos resultados, numa população de 384 hemodialisados (78). Estes autores, descrevem, tal como nós, uma proporção significativamente maior de doentes com níveis elevados de PCR (proteína C reactiva de alta sensibilidade), nos casos em que se diagnosticou insuficiência ou deficiência em 25-hidroxitamina D.

Também estes autores brasileiros, à semelhança dos nossos resultados previamente publicados, descreveram uma correlação positiva entre a albumina sérica e os níveis plasmáticos de 25-hidroxitamina D ($r = 0,34$; $P = 0,007$) (78).

Finalmente, importa sublinhar que quer na nossa população quer na população brasileira acima descrita (totalizando mais de 600 doentes hemodialisados), as correlações entre PCR (proteína C reactiva de alta sensibilidade) e 1,25-hidroxitamina D não foram significativas.

Como discutiremos no capítulo 7, estes resultados ilustram a relevância da avaliação (e provavelmente da correção) dos níveis circulantes de 25-hidroxivitamina D, por oposição aos níveis de 1,25-hidroxivitamina D, que parecem envolver pouco significado clínico.

Não apenas nos hemodialisados, mas igualmente na população com IRC em estádios menos avançados de evolução da doença, foi evidenciada uma associação entre níveis baixos de 25-hidroxivitamina D e inflamação, manifestada por elevação da PCR (79).

Em 16301 participantes no “Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III)”, nos quais a função renal foi quantificada através do recurso à equação da “MDRD-Modification of Diet in Renal Disease”, esta relação inversa entre os níveis de 25-hidroxivitamina D e os valores da PCR foi claramente evidenciada (79).

6.4 Deficiência em 25-hidroxi-vitamina D e disfunção cardiovascular (manuscrito 19)

Múltiplas expressões da patologia cardiovascular, observada nos doentes urémicos, têm vindo a ser associadas a níveis insuficientes, ou deficientes, de 25-hidroxivitamina D.

Tendo em conta que as células musculares lisas vasculares, as células endoteliais e os cardiomiocitos expressam recetores para a vitamina D (a qual vai exercer alguns dos seus efeitos pleotróficos nestes tecidos), o papel da vitamina D como moduladora da morbilidade e da mortalidade cardiovascular, adquire plausibilidade (80).

Por exemplo, por cada 10° para Norte ou para Sul do equador a tensão arterial média aumentou 2,5 mmHg e a prevalência de HTA elevou-se 2,5% (81).

Deste modo, a variabilidade da exposição às radiações ultravioleta tipo B (e conseqüentemente os diferentes níveis circulantes de 25-hidroxivitamina D)

poderá contribuir para as conhecidas diferenças geográficas e raciais de prevalência da HTA.

Pelo contrário, a exposição de doentes hipertensos a radiações ultravioleta tipo B, três vezes por semana, durante três meses, associou-se ao aumento em 180% dos níveis plasmáticos de 25-hidroxivitamina D e à normalização dos valores da tensão arterial (sistólicos e diastólicos), com reduções médias de 6 mmHg (82; 80).

De acordo com os dados de um modelo animal (rato transgênico que não expressa o recetor da vitamina D), foi elegantemente demonstrado por Li e colaboradores que a ativação dos recetores da vitamina D exerce uma ação reguladora e inibitória do sistema endócrino da renina-angiotensina (83).

Estes animais têm níveis aumentados do ARN mensageiro da renina e da angiotensina e valores aumentados de tensão arterial (sistólica e diastólica), em comparação com os animais que expressam o recetor da vitamina D (grupo controlo) (13).

A ativação do sistema renina-angiotensina induz hipertrofia e modificações pro-inflamatórias do miocárdio, pelo que a sua inibição pela vitamina D poderia justificar, em grande parte, os efeitos cárdio-protetores que têm sido associados a esta vitamina (que efetivamente se comporta como uma hormona) (83) (13).

A associação entre o risco aumentado de enfarte de miocárdio e níveis diminuídos de 25-hidroxivitamina D, foi descrita, pela primeira vez, num estudo epidemiológico comunitário, há mais de 2 décadas (84).

Ao longo dos últimos anos foi demonstrado que os doentes com patologia do miocárdio, nomeadamente doentes com arritmias severas e/ou morte súbita de causa cardiovascular (independentemente da função renal), apresentavam níveis significativamente mais baixos de vitamina D (85).

As alterações na condução elétrica, na contratilidade e na estrutura do miocárdio induzidas pela deficiência em vitamina D (de acordo com os resultados de diversos modelos animais) poderão justificar estes achados (86) (85).

Também a insuficiência cardíaca congestiva tem vindo a ser associada, frequentemente, a insuficiência ou deficiência em 25-vitamina D (15) (87).

No entanto, a alteração cardíaca que mais frequentemente tem sido característica da IRC é a hipertrofia ventricular esquerda (88), a qual está presente em cerca de 75% dos hemodialisados (89) e se apresenta, no doente urémico, com particularidades relevantes, que incluem a fibrose, a apoptose dos cardiomiocitos e a degenerescência capilar (78).

Como foi evidenciado em modelos animais de IRC, a redução da ativação dos recetores da vitamina D, associou-se ao aumento da renina sérica e da tensão arterial, as quais condicionaram o desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda (86).

Neste modelo animal de IRC avançada, demonstrou-se que a vitamina D tem efeitos relevantes na contração, na proliferação e na diferenciação dos cardiomiocitos (90).

Numa população de doentes com nefropatia diabética, Chochol e colaboradores demonstraram que níveis reduzidos de 25-hidroxivitamina D se associaram, de forma independente, a um aumento de doença cardiovascular (91).

Também nos 1739 participantes no estudo “Framingham Offspring” se observou um risco de incidência de morbidade cardiovascular (que ocorreu em 120 doentes, durante o período de avaliação de 5,4 anos) significativamente aumentado nos doentes com insuficiência ou deficiência em 25-hidroxivitamina D (92).

London e colaboradores evidenciaram que os níveis de 25-hidroxivitamina D e de 1,25-dihidroxivitamina D se correlacionavam negativamente com a velocidade da onda de pulso ao nível da artéria aorta e positivamente com a distensibilidade das artérias braquiais ($P < 0.01$) e femorais ($P < 0.001$) (93).

Na nossa investigação, a que já fizemos referência anteriormente, efetuada em 223 hemodialisados, dos quais apenas 20,6% tinham níveis séricos normais de 25-hidroxivitamina D (isto é, superiores a 30 ng/mL), identificámos diversos e

significativos fatores de risco cardiovascular associados a insuficiência/deficiência em vitamina D nativa (25).

Os níveis séricos reduzidos, traduzindo insuficiência ou deficiência em 25-vitamina D, correlacionaram-se negativa e significativamente com a idade ($r = -0.31$; $P < 0.001$), com o diagnóstico de diabetes mellitus ($r = -0.20$; $P = 0.0004$), com os níveis circulantes (\log_{10}) de BNP-“brain natriuretic peptide” ($r = -0.22$; $P = 0.002$), com uma pressão de pulso elevada (superior a 65 mmHg) ($r = -0.21$; $P = 0.003$) e com a presença de significativas calcificações vasculares, (definidas por um índice superior a 3, de acordo com a proposta validada por Adragão e colaboradores (94)) ($r = -0.26$; $P < 0.0001$).

Também na análise multivariada os níveis séricos de 25-vitamina D se associaram, de forma independente, a valores patologicamente elevados de BNP ($P = 0.0005$), a uma pressão de pulso superior a 65 mmHg ($P = 0.0006$) e a um índice de calcificação vascular superior a 3 ($P = 0.0002$).

O diagnóstico de doença coronária (caracterizado por queixas de angina de peito, por antecedentes de enfarte agudo de miocárdio, por uma prova de esforço / sobrecarga positiva, por antecedentes de angioplastia coronária ou por história de pontagem coronária) estava presente em cerca de um terço dos nossos doentes (29%). Este resultado ilustra a relevância da patologia cardiovascular na morbidade e na mortalidade dos hemodialisados.

A forma de vitamina D ativa prescrita a 86% dos doentes era o paricalcitol (via endovenosa nas sessões de hemodiálise, assegurando a adesão à terapêutica). Apenas 15 doentes faziam doses (baixas) de calcitriol oral (dose média semanal de $1.1 \pm 0.5 \mu\text{g}$).

Os doentes medicados com paricalcitol oral apresentavam níveis significativamente mais baixos de 1,25-dihidroxitamina D ($4.7 \pm 4.6 \text{ pg/mL}$; $P < 0.001$).

Este resultado da nossa investigação foi particularmente relevante, pois evidenciou, pela primeira vez, num ensaio clínico, a especificidade do paricalcitol em relação ao calcitriol e a outras formas ativas da vitamina D.

Estes achados poderão justificar-se por o método de doseamento da 1,25-dihidroxitamina D não permitir o doseamento do paricalcitol e, por outro lado, porque será de admitir que a terapêutica com paricalcitol estimule a metabolização do calcitriol, em formas inativas, mediante a ativação da via da 24 hidroxilase (28) (9).

Apesar dos níveis séricos de 25-vitamina D serem mais elevados após o Verão (Novembro) que antes do Verão (Junho) esta diferença não atingiu significado estatístico.

Estes resultados ilustram a pouca importância da exposição ao sol, nesta população de doentes IRC em estágio 5d, o que, como já referimos, também foi demonstrado em doentes brasileiros (24).

Face à elevada morbidade e mortalidade cardiovascular dos doentes hemodialisados, decidimos utilizar, em simultâneo, diversos marcadores laboratoriais e imagiológicos já validados como fatores de risco, nesta população.

Definimos hipertrofia ventricular esquerda com base no IMVE-índice de massa do ventrículo esquerdo, calculado pela fórmula de Devereux, avaliado por ecocardiograma (módulo M e bidimensional) realizado pelo mesmo observador e nas mesmas condições (antes da sessão de diálise do meio da semana). Um IMVE superior a 125 g/m² foi considerado como limiar para a definição de hipertrofia ventricular esquerda (95).

O IMVE foi identificado como um índice de predição independente da sobrevivência de doentes hemodialisados, tendo a sua avaliação seriada um valor prognóstico elevado (96).

Também os níveis plasmáticos de BNP - “brain natriuretic peptide” têm sido apontados como um bom marcador de risco cardiovascular na população em geral e nos doentes urémicos (97) (98) (99) (100).

Num estudo prévio havíamos demonstrado que os níveis séricos de BNP não se modificaram significativamente entre o início e o final da sessão de hemodiálise. Por este motivo considerámos, na nossa investigação, os níveis séricos pré-diálise (100).

O BNP é sintetizado pelos cardiomiocitos, em resposta ao estiramento ventricular e ao aumento de pressão dentro das cavidades cardíacas (predominantemente do ventrículo esquerdo) (101).

Tendo em conta que os cardiomiocitos expressam recetores para a vitamina D e que têm a possibilidade de hidroxilar a 25-vitamina D, graças à presença a 1- α -hidroxilase intracelular, ganha mais consistência a hipótese da vitamina D nativa exercer um efeito protetor da patologia cardiovascular, mediante a actuação por mecanismos endócrino, parácrino e/ou autócrino (21) (20).

No que respeita à prevalência de calcificações vasculares, que nos doentes urémicos assume características particulares, por envolver predominantemente a lamina elástica das artérias de grande e médio/pequeno calibre (semelhantes à descritas nas “calcificações de Monckeberg”) encontramos uma associação negativa e significativa com os níveis séricos de 25-vitamina D.

Quer na análise univariada, quer na multivariada, níveis séricos mais elevados de 25-vitamina D associaram-se a um índice de calcificação mais baixo.

O mesmo resultado já tinha sido demonstrado previamente por Cannata-Andía e colaboradores, que evidenciaram uma correlação negativa entre os níveis séricos de 25-vitamina D3 e a presença de calcificações vasculares (102).

Na nossa população, a prevalência de calcificações vasculares não se correlacionou com os níveis séricos de fósforo, de cálcio, de PTH intacta nem de 1,25-vitamina D3. No entanto, estes resultados não se podem extrapolar para outras séries, tendo em conta que os doentes deste estudo apresentaram um excelente controlo do metabolismo fosfo-cálcico.

Apesar das limitações inerentes a um estudo observacional e de corte transversal, a nossa investigação demonstrou que a deficiência ou insuficiência em 25-vitamina D é muito frequente nos doentes hemodialisados e que estes níveis baixos se correlacionaram com fatores de risco cardiovascular, já validados nesta população.

Tendo em conta estes resultados, fomos impelidos a realizar um estudo prospetivo, no qual realizámos suplementação de vitamina D nativa e cujos resultados discutiremos no capítulo 6.6.

Original Article

25-Hydroxyvitamin D3, arterial calcifications and cardiovascular risk markers in haemodialysis patients

Patrícia João Matias^{1,2,3}, Carina Ferreira^{1,2,3}, Cristina Jorge^{1,2,3}, Marília Borges⁴, Inês Aires^{1,2,3}, Tiago Amaral^{1,2,3}, Célia Gil^{1,2,3}, José Cortez^{4,5} and Aníbal Ferreira^{1,2,3,5}

¹Hemodial—Dialysis Unit, Vila Franca de Xira, ²Dialverca-Dialysis Unit, Forte da Casa, ³NIDAN, ⁴Laboratório Dr Fernando Teixeira and ⁵Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal

Abstract

Background. Decreased vitamin D serum levels have been recently related to arterial stiffening and vascular calcifications in haemodialysis (HD) patients, but the pathophysiology of this association is not yet clear. The aim of this study was to evaluate the relationship between vascular calcifications, cardiovascular risk factors [including brain natriuretic peptide (BNP), pulse pressure (PP) and left ventricular mass index] and 25-hydroxyvitamin D3 [25(OH)D3] and 1,25-dihydroxyvitamin D3 [1,25(OH)₂D3] serum levels.

Methods. We performed a cross-sectional study with 223 prevalent HD patients, 48% females, 27% diabetics, with the mean age of 62.7 ± 15.3 years and the mean HD time of 42.9 ± 39.3 months. Forty-seven percent of the patients were taking active forms of vitamin D.

Results. Serum levels of [25(OH)D3] were low (21.6 ± 12.2 ng/mL) and negatively correlated with age ($r = -0.31$, $P < 0.001$), diabetes mellitus (DM) ($r = -0.20$, $P = 0.004$), C-reactive protein ($r = -0.25$, $P < 0.001$), log₁₀ BNP ($r = -0.22$, $P = 0.002$), PP > 65 mmHg ($r = -0.21$, $P = 0.003$) and vascular calcifications ($r = -0.26$, $P < 0.001$). Levels of [25(OH)D3] were positively correlated with [1,25(OH)₂D3] ($r = 0.25$, $P < 0.001$) and albumin ($r = 0.23$, $P = 0.001$). On multivariate analysis, levels of [25(OH)D3] were independently associated with DM ($P < 0.001$), lower albumin levels ($P = 0.003$), higher BNP values ($P = 0.005$), PP > 65 mmHg ($P = 0.006$) and a higher vascular calcification score (≥ 3) ($P = 0.002$).

Conclusions. These results suggest that lower levels of [25(OH)D3] are a cardiovascular risk marker in HD patients, since they are strongly associated with higher BNP levels, increased PP and with the presence of vascular calcifications. The exact role of [25(OH)D3] deficiency on cardiovascular morbi-mortality needs to be clarified in large randomized controlled trials.

Keywords: haemodialysis; mortality; vascular calcifications; vitamin D

Introduction

Cardiovascular disease is the most common cause of death in dialysis patients [1]. Increasing evidence shows that abnormalities in mineral metabolism may play an important role in cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease (CKD), as hyperphosphataemia, hypercalcaemia, high calcium–phosphorus product and secondary hyperparathyroidism have all been associated with increased mortality in dialysis patients [2,3].

Advanced CKD leads to divalent cation and metabolic derangements as well as decreased production of 1,25-dihydroxyvitamin D3 [1,25(OH)₂D3] (calcitriol) all of which can cause parathyroid gland hyperplasia and development of bone disease [4,5]. One of the major actions of vitamin D is to maintain calcium and phosphate serum concentrations in the normal range and to allow for mineralization of newly synthesized bone [4]. Its main sites of action are the small intestine, bone and kidney [4]. Vitamin D has also been recognized to have numerous non-calcaemic functions, probably associated with the wide distribution of the vitamin D-receptor (VDR), namely in brain, heart, skeletal muscle, smooth muscle cells, pancreas, activated T and B lymphocytes and monocytes [5]. CKD also interferes with the interaction of the VDR with DNA, the nuclear uptake of the calcitriol-receptor complex and the synthesis and expression of the receptor [5].

Patients with renal failure frequently have low serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D3] (the substrate of [1,25(OH)₂D3]) [6–8]. There are several reasons for this [25(OH)D3] deficiency or insufficiency in these patients: they are inactive and have decreased exposure to sunlight, have reduced ingestion of foods that are natural sources of vitamin D, and the endogenous synthesis of vitamin D in the skin is also compromised in uraemic patients [6,7].

Studies on the general population have shown that [25(OH)D3] deficiency is associated with chronic heart

Correspondence and offprint requests to: Patrícia João Matias, Hemodial—Dialysis Unit, Quinta da Mina, lote 3 r/c, 2600-063 Vila Franca de Xira, Portugal. Tel: +35-191-998-2148; Fax: +35-126-327-6674; E-mail: patriciajoamatias@hotmail.com

failure and hypertension [9–11]. Reduced vitamin D levels have also been recently associated with arterial stiffening in dialysis patients [12].

Vascular calcifications are highly prevalent in dialysis patients and have been associated with an increased risk of total mortality and cardiovascular mortality [13]. Recent studies have demonstrated that vascular calcification is an active cellular process, similar to bone formation [14–16]. Vascular smooth muscle cells (VSMCs) can differentiate into osteoblasts due to different stimuli, like hyperphosphataemia and hypercalcaemia [17]. Reduction of calcification inhibitors, such as fetuin-A or matrix-Gla protein, may be another factor associated with the development of calcification [18]. The presence of VDR in VSMCs has been recently described and may explain a possible mechanism of the action of vitamin D in vascular calcifications [5].

Some mechanisms linking vascular calcifications with cardiovascular risk, such as the association between vascular calcifications and arterial stiffness, have also been recognized [19]. The loss of arterial distensibility is associated with increased pulse pressure (PP) [20], left ventricular hypertrophy (LVH), decrease in coronary perfusion during diastole and cardiac failure [21].

The aim of this study was to evaluate the relationship between vitamin D status (accessed by [25(OH)D3] and [1,25(OH)₂D3] serum levels), cardiovascular risk factors [including brain natriuretic peptide (BNP) plasma levels, PP and left ventricular mass index (LVMI)] and the presence of vascular calcifications.

Subjects and methods

Study design

This was an observational, cross-sectional, single-centre study of a cohort of prevalent haemodialysis (HD) patients.

Population

The study included 223 patients, 116 (52%) males and 107 (48%) females, with mean age of 62.7 ± 15.3 years. All the patients were dialyzed with high-flux membranes (helixone-Fresenius®) and ultrapure water (evaluated monthly by a kinetic chromogenic test). The mean HD time was 42.9 ± 39.3 months.

Sixty patients (27%) were diabetics and 71 (32%) hypertensives. Coronary artery disease was diagnosed if the patient had a typical history of angina pectoris or had suffered a myocardial infarction, had a positive stress test or had undergone a percutaneous coronary intervention or coronary bypass surgery. According to these criteria, coronary artery disease was diagnosed in 65 (29%) patients.

One hundred and four (47%) patients were taking active forms of vitamin D: 14% ($n = 15$) oral calcitriol, with a mean dose of 1.1 ± 0.5 (0.25–1.75) $\mu\text{g}/\text{week}$, and 86% ($n = 89$) iv paricalcitol, with a mean dose of 7.1 ± 4.3 (2.5–30) $\mu\text{g}/\text{week}$. None of the patients were receiving any other form of vitamin D, including 'native' or supplementation. One hundred and seventy-four patients (78%) were under therapy with phosphate binders: 14 (8%) were taking cal-

cium carbonate with a mean dose of 1.7 ± 0.9 (1–4) g/day and 160 (92%) were taking sevelamer with a mean dose of 3.9 ± 1.9 (0.8–7.2) g/day.

PP was evaluated in the two mid-week HD sessions in which blood chemistry analysis was obtained, based on blood pressure (BP) measurement before HD. PP was calculated by the formula $\text{PP} = \text{SBP} - \text{DBP}$ (SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure).

Biochemical analysis

Serum [25(OH)D3] and [1,25(OH)₂D3] were measured on two occasions (after summer, in November of 2006 and after winter, in June of 2007). Serum [25(OH)D3] and [1,25(OH)₂D3] were measured with a radioimmunoassay provided by IDS (Boldon, UK). Following an extraction procedure, the assay is carried out with the anti-25-hydroxyvitamin D or the anti-1,25-dihydroxyvitamin D ovine antibody and phase separation is performed with anti-ovine IgG antiserum. The assay measures [25(OH)D3] and 25-hydroxyvitamin D2 or [1,25(OH)₂D3] and 1,25-dihydroxyvitamin D2. Intra-assay and interassay variability are 5% and 8%, respectively. The normal range for [25(OH)D3] is 10–60 ng/mL and for [1,25(OH)₂D3] is 20–46 pg/mL.

Definitions of deficiency (<15 ng/mL), insufficiency (<30 ng/mL) and normal values (>30 ng/mL) for [25(OH)D3] were based on K-DOQI guidelines for pre-dialysis [22], whereas the definitions used for [1,25(OH)₂D3] were based on biochemical normality of the assay (deficiency <20 pg/mL and normal values >20 pg/mL).

Serum calcium (Ca), serum phosphorus (P), $\text{Ca} \times \text{P}$ product, total intact parathyroid hormone (iPTH), bone alkaline phosphatase (bAP), haemoglobin, albumin and C-reactive protein (CRP) were measured simultaneously with [25(OH)D3] and [1,25(OH)₂D3]. Total iPTH was evaluated by immunochemiluminescence using a second-generation assay, and the normal range of values is 10–65 pg/mL.

The levels of BNP were determined in June of 2007, in pre-HD-collected EDTA plasma samples, using the AxSYM BNP Assay (MEIA) on the AxSYM 2 Immunochemical Analyser (Abbott Laboratories, Chicago IL, USA). In a previous study [23], we found no significant difference in BNP-measured levels before or after dialysis.

Ecocardiographic evaluation

Between November of 2006 and June of 2007, each patient underwent an ecocardiographic examination (M mode and 2D), and LVMI was calculated using the Devereux formula [24] and indexed to body surface area. The presence of LVH was defined on the basis of a LVMI >125 g/m² for both men and women [25].

Vascular calcification score

To evaluate vascular calcifications, we used a simple vascular calcification score (SVCS) developed by Adragão *et al.* [21]. This vascular calcification score is based on the analysis of plain radiographic films of pelvis and hand.

Pelvis films were divided into four sections by two imaginary lines: a horizontal line over the upper limit of both femoral heads and a median vertical line over the vertebral column. Hand films were divided for each hand by a horizontal line over the upper limit of the metacarpal bones. Pelvis films evaluated iliac and femoral arteries (ileo-femoral score) and hand films evaluated radial and digital arteries (hand score). Any vascular calcification lining the vessel walls either in an irregular pattern or in a linear pattern was considered. The presence of vascular calcifications in each section was rated as 1 and its absence as 0. The final score was the sum of all sections and ranged from 0 to 8.

Adragão *et al.* [21] found that an SVCS > 3 was associated with an increase in cardiovascular events and mortality.

Statistical analysis

For statistical analysis, the arithmetic media of the two measurements (November 2006 and June 2007) was used. Variables were expressed as frequencies for categorical variables, mean values with SD for normally distributed variables. Comparison between groups was performed using Mann-Whitney *U* and chi-square tests. Spearman correlation was used for univariate analysis and linear regression for multivariate analysis (confidence interval of 95%). Variables entered in multivariate analysis were diabetes, albumin, BNP, PP and vascular calcification score.

Statistical analysis was performed with the SPSS system 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). For all comparisons, a $P < 0.05$ was considered statistically significant. For multiple correlations, Bonferroni adjustment was performed.

Results

The demographic, clinical, biochemical and vascular characteristics are reported in Table 1. Both [25(OH)D3] and [1,25(OH)₂D3] serum levels were low and positively correlated ($r = 0.25$, $P < 0.001$). Serum [25(OH)D3] was below sufficiency values (<30 ng/mL) in almost 80% of our patients (Figure 1), and levels of [1,25(OH)₂D3] were considered insufficient (< 20 pg/mL) in more than 95% of the patients (Figure 2). Comparing serum levels obtained in June of 2007 with those of November of 2006, [25(OH)D3] serum values were higher in November (following summer), but not statistically significant (22.6 ± 16.0 versus 20.8 ± 12.3 ; $P > 0.05$). [1,25(OH)₂D3] serum levels were similar on the two occasions (6.4 ± 7.6 versus 6.4 ± 7.7 ; $P > 0.05$). Patients taking paricalcitol showed significantly lower [1,25(OH)₂D3] levels (4.7 ± 4.6 ; $P < 0.001$), but with the same [25(OH)D3] values. Patients under calcitriol showed similar levels compared with the studied population. A comparison of studied variables according to levels of [25(OH)D3] is shown in Table 2 and according to [1,25(OH)₂D3] levels is shown in Table 3.

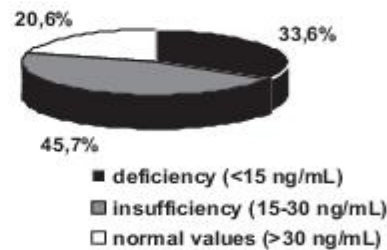
Plasma BNP values were high (574 ± 696 pg/mL), comparing with the general population with no cardiac insufficiency [26]. PP was elevated (68.8 ± 18.3 mmHg), and 127 (57%) patients had ecocardiographic criteria of left ventricular hypertrophy (LVMI > 125 g/m²). Vascular

Table 1. Clinical, biochemical and vascular parameters of the studied population

Variable	Patients (n = 223)
Age (years)	62.7 ± 15.3
Male gender	116 (52%)
HD duration (months)	42.9 ± 39.3
Diabetes	60 (27%)
Hypertension	71 (32%)
Coronary disease	65 (29%)
Active vitamin D therapy	104 (47%)
Calcium carbonate therapy	14 (6%)
Sevelamer therapy	160 (72%)
Calcium (mg/dL)	8.5 ± 0.6 (6.9–10.5)
Phosphorus (mg/dL)	4.6 ± 1.5 (1.7–8.7)
Calcium × phosphorus (mg/dL) ²	48.6 ± 15.5 (16.5–83.2)
IPTH (pg/mL)	277 ± 3332 (3–4461)
bAP (μg/L)	20.3 ± 14.3 (2.2–119.5)
Haemoglobin (g/dL)	12.3 ± 1.3 (8.2–15.4)
C-reactive protein (mg/dL)	0.9 ± 1.6 (0.1–17.4)
Albumin (g/dL)	4.1 ± 0.4 (3.1–5.1)
[25(OH)D3] (ng/mL)	21.6 ± 12.2 (5.6–152.8)
[1,25(OH) ₂ D3] (pg/mL)	5.9 ± 5.7 (0.1–49.1)
BNP (pg/mL)	596 ± 689 (11–3851)
PP (mmHg)	69 ± 18 (33–116)
LVMI (g/m ²)	133 ± 34 (64–224)
SVCS > 0	130 (58%)
SVCS ≥ 3	80 (36%)

bAP, bone alkaline phosphatase; BNP, brain natriuretic peptide; PP, pulse pressure; LVMI, left ventricular mass index; SVCS, simple vascular calcification score.

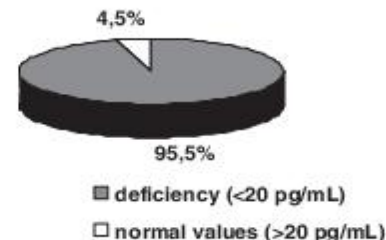
25-hydroxyvitamin D3



Mean value: 21.6 ± 12.2 ng/mL

Fig. 1. Serum 25-hydroxyvitamin D3 distribution.

1,25-dihydroxyvitamin D3



Mean value: 5.9 ± 5.7 pg/mL

Fig. 2. Serum 1,25-dihydroxyvitamin D3 distribution.

Table 2. Comparison of studied variables according to 25-hydroxyvitamin D3 serum levels

[25(OH)D3]	<30 ng/mL (n = 177)	> 30 ng/mL (n = 46)	P
Age (years)	63.8 ± 15.4	58.5 ± 14.7	<0.001
Male gender	85 (48%)	24 (52%)	NS
HD duration (months)	43.9 ± 41.3	39.2 ± 30.6	0.03
Diabetes	65 (37%)	10 (21%)	0.01
Hypertension	60 (34%)	14 (31%)	NS
Coronary disease	57 (32%)	13 (28%)	NS
Active vitamin D therapy	73 (41%)	24 (52%)	NS
Calcium carbonate therapy (g/day)	1.5 ± 0.6	1.7 ± 0.8	NS
Sevelamer therapy (g/day)	3.6 ± 1.8	3.9 ± 1.7	NS
Calcium (mg/dL)	8.6 ± 0.6	8.7 ± 0.7	NS
Phosphorus (mg/dL)	4.5 ± 1.5	4.7 ± 1.6	NS
Calcium × phosphorus (mg/dL) ²	49.3 ± 13.8	51.9 ± 15.1	NS
iPTH (pg/mL)	312 ± 284	337 ± 271	NS
bAP (µg/L)	20.3 ± 18.1	20.2 ± 12.3	NS
Haemoglobin (g/dL)	12.3 ± 1.3	12.6 ± 1.5	NS
C-reactive protein (mg/dL)	1.0 ± 1.8	0.5 ± 0.7	0.002
Albumin (g/dL)	4.1 ± 0.4	4.4 ± 0.2	0.004
[1,25(OH) ₂ D3] (pg/mL)	4.5 ± 5.2	6.0 ± 5.7	0.01

Comparison between means: Mann-Whitney *U*-test; comparison between frequencies: chi-square test.

calcifications were identified in 130 (58%) patients. An SVCS > 3 was observed in 80 (36%) patients. There was no difference in serum calcium, phosphorus, Ca × P product and iPTH between patients with or without vascular calcifications. CRP and albumin were negatively correlated ($r = -0.27$, $P < 0.001$).

Serum levels of [25(OH)D3] were negatively correlated with age ($r = -0.31$, $P < 0.001$), DM ($r = -0.20$, $P = 0.004$), CRP ($r = -0.25$, $P < 0.001$), \log_{10} BNP ($r = -0.22$, $P = 0.002$), PP > 65 mmHg ($r = -0.21$, $P = 0.003$) and SVCS ($r = -0.26$, $P < 0.001$) (Figure 3). [25(OH)D3] levels were positively correlated with albumin ($r = 0.23$, $P = 0.001$) (Table 4). LVMI was not correlated with [25(OH)D3] levels.

Serum levels of [1,25(OH)₂D3] were only negatively correlated with DM ($r = -0.16$, $P = 0.02$) and did not show any correlation with BNP, PP, LVMI or vascular calcifications. Therapy with active vitamin D was negatively correlated with the presence of vascular calcifications ($r = -0.21$, $P = 0.004$).

On multivariate analysis, serum levels of [25(OH)D3] were independently associated with diabetes ($P < 0.001$), lower albumin levels ($P = 0.003$), higher \log_{10} BNP values ($P = 0.005$), PP > 65 mmHg ($P = 0.006$) and a higher SVCS (≥ 3) ($P = 0.002$) (Table 5). Active vitamin D therapy was associated with a lower SVCS (<3) ($P = 0.03$).

Discussion

According to our results, from a large prevalent HD population from a 'sunny country', [25(OH)D3] insufficiency

Table 3. Comparison of studied variables according to 1,25-dihydroxyvitamin D3 serum levels

[1,25(OH) ₂ D3]	<20 pg/mL (n = 213)	> 20 pg/mL (n = 10)	P
Age (years)	62.4 ± 15.6	65.7 ± 12.8	NS
Male gender	109 (52%)	6 (60%)	NS
HD duration (months)	42.5 ± 38.0	47.4 ± 52.3	NS
Diabetes	60 (28%)	1 (10%)	0.03
Hypertension	83 (39%)	4 (40%)	NS
Coronary disease	70 (33%)	3 (30%)	NS
Active vitamin D therapy	109 (51%)	3 (30%)	<0.001
Calcium carbonate therapy (g/day)	1.8 ± 0.9	1.7 ± 1.1	NS
Sevelamer therapy (g/day)	3.9 ± 1.9	3.3 ± 2.1	NS
Calcium (mg/dL)	8.7 ± 0.7	8.8 ± 0.6	NS
Phosphorus (mg/dL)	4.5 ± 0.7	4.0 ± 1.4	NS
Calcium × phosphorus (mg/dL) ²	49.3 ± 14.6	47.8 ± 15.3	NS
iPTH (pg/mL)	261 ± 352	245 ± 121	NS
bAP (µg/L)	17.0 ± 13.5	15.1 ± 9.7	NS
Haemoglobin (g/dL)	12.5 ± 1.3	12.3 ± 1.3	NS
C-reactive protein (mg/dL)	0.8 ± 1.7	0.6 ± 0.7	NS
Albumin (g/dL)	4.2 ± 0.4	4.1 ± 0.2	NS
[25(OH)D3] (pg/mL)	22.6 ± 16.5	22.5 ± 8.9	NS

Comparison between means: Mann-Whitney *U*; comparison between frequencies: chi-square test.

seems much more frequent than suspected and may also contribute to the [1,25(OH)₂D3] deficiency (observed in >95% of the patients). Levels of [25(OH)D3] as expected were higher, but not significantly, after summer because of increased sun exposure. [1,25(OH)₂D3] levels did not show any seasonal variation.

In our study, as already described in other studies, older patients and diabetics showed lower levels of [25(OH)D3]. Elderly patients have reduced sun exposure, due to poor health and immobility, and have reduced ingestion of foods that are natural sources of vitamin D, and dermal synthesis of vitamin D is reduced with increasing age [27]. Diabetes may predispose to an even greater risk of vitamin D deficiency because of bowel motility disturbances, fat malabsorption and an association with coeliac disease [28]. In this study, lower levels of [1,25(OH)₂D3] were also present in diabetics, probably reflecting lower production of the substrate.

Dialysis patients have increased cardiovascular morbidity and mortality [1]. BNP plasma levels have been shown to be a good cardiovascular risk marker in the general population and in patients with renal failure [29,30]. Plasma BNP is synthesized mainly in cardiomyocytes in response to ventricular stretch and pressure overload [31]. Elevated BNP concentrations are seen in patients with cardiac insufficiency and renal failure [30]. Increased BNP levels in these patients are thought to be the result of water retention and ventricular volume increase [29–31], but they may also be a result of concomitant coronary artery disease or left ventricular dysfunction [32]. Recent studies have indicated that the degree of BNP elevation in patients with chronic renal failure may predict left ventricular function and future cardiac events [28,30–32]. We have also previously

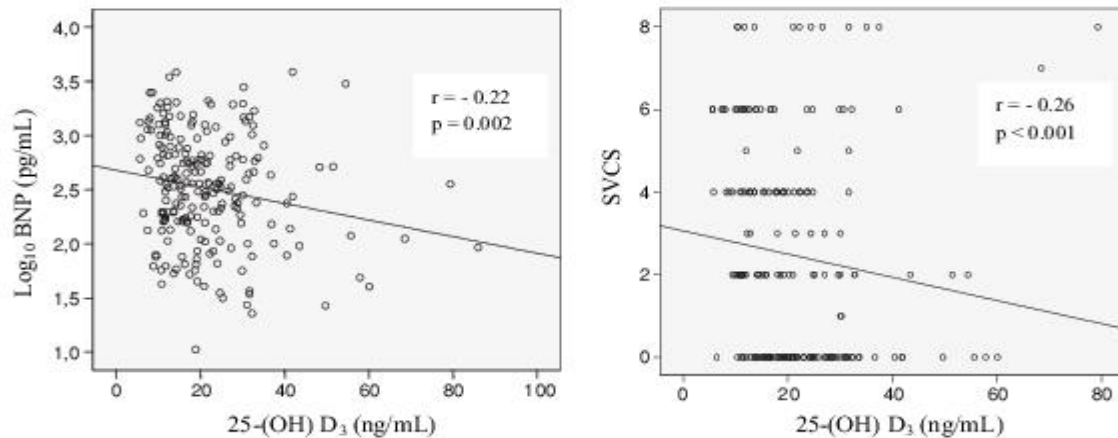


Fig. 3. Correlations between 25-hydroxyvitamin D₃ serum levels and BNP and simple vascular calcification score.

Table 4. Univariate associations between 25-hydroxyvitamin D₃ and other studied parameters (Spearman correlation)

	[25(OH)D ₃]	
	<i>R</i>	<i>P</i>
Age	-0.31	<0.001 ^a
Time on HD	-0.14	0.04
Diabetes	-0.20	0.004 ^a
C-reactive protein	-0.25	<0.001 ^a
Albumin	0.23	0.001 ^a
Log ₁₀ BNP	-0.22	0.002 ^a
PP > 65 mmHg	-0.190.21	0.003 ^a
LVMI	-0.15	0.02
SVCS	-0.26	<0.001 ^a

BNP, brain natriuretic peptide; PP, pulse pressure; LVMI, left ventricular mass index; SVCS, simple vascular calcification score.

^aStatistically significant after Bonferroni adjustment.

found an increase in cardiovascular morbidity and mortality in HD patients with higher BNP plasma levels [23]. In this study, as reported in other studies, mean levels of BNP were high (comparing with the general population), because of renal failure and in some patients simultaneous cardiac disease.

CKD patients have stiffer vessels compared to the general population [13], contributing to reduced arterial compliance. In CKD, there is a similar magnitude of atherosclerotic plaque burden and intimal thickness, but there is a markedly increased medial calcification [33]. This phenomenon is a major determinant of left ventricular pressure overload and of abnormal coronary perfusion [34]. Left ventricular hypertrophy (LVH) is found early in the course of renal failure and progresses with further impairment of renal function [35]. LVMI is an independent predictor of survival in patients with CKD [36]. Our patients presented increased PP and more than 50% showed ecocardiographic criteria of LVH, both strong predictors of increased cardiovascular risk.

CKD patients have increased predisposition to develop vascular calcifications [17–19]. Calcification of the vessel walls may occur in two sites: the intima and the media.

Intimal calcification mainly derives from the inflammation and calcification of the atherosclerotic plaques and they are localized in two functionally relevant arteries, such as the aorta and the coronaries. Medial calcification or Monckeberg's arteriosclerosis occurs in the elastica lamina of large and medium–small size arteries. Both types of calcification are present in patients with CKD, but the complications of these two types of vascular calcification are different. The former is mainly associated with occlusion of the vessels and the latter is associated with vascular stiffness. Both have an adverse impact on cardiovascular mortality in CKD patients [37,38]. The presence of hyperphosphataemia, hypercalcaemia and increased Ca × P product have been considered major pathogenic factors leading to vascular and soft tissue calcification in uraemic patients [17–19]. In this study, we found no correlation between serum calcium, serum phosphorus, Ca × P product and iPTH and vascular calcifications, probably because mean values were low compared with other studies.

The role of vitamin D in vascular calcifications is still controversial. In experimental models, very high doses of some vitamin D metabolites have been associated with an increase in vascular calcifications [39,40]. In contrast, epidemiological observational studies have shown that the currently used doses of different vitamin D metabolites and analogues have been associated with an improvement in vascular function and survival [3,12,41–45]. In our study, patients taking vitamin D (mainly paricalcitol) showed less vascular calcifications, probably because the used doses were not high and the serum levels of calcium, phosphorus, Ca × P product and iPTH were well controlled.

On the other hand, recent studies have shown that serum [25(OH)D₃] levels were negatively correlated with vascular calcifications [37] and both [25(OH)D₃] and [1,25(OH)₂D₃] serum levels were negatively correlated with aortic pulse wave velocity and positively correlated with brachial artery distensibility [12], suggesting a protective role for vitamin D in vascular function.

In other studies, vitamin D has shown to suppress transcription of renin [46]. Vitamin D therapy decreased circulating renin and angiotensin II levels in vitamin D-deficient

Table 5. Multivariate analysis (linear regression)

Dependent variable	Independent variables	β	95% CI	<i>P</i>	<i>R</i> ²
[25(OH)D3]	Diabetes mellitus	-0.44	-0.23 to -0.01	<0.001	0.532
	Albumin	0.41	1.24 to 2.68	0.003	
	Log ₁₀ BNP	-0.37	-0.24 to -0.02	0.005	
	PP > 65 mmHg	-0.36	-0.41 to -0.05	0.006	
	SVCS \geq 3	-0.39	-0.28 to -0.04	0.002	

BNP, brain natriuretic peptide; PP, pulse pressure; SVCS, simple vascular calcification score.

animals [46], and lower circulating vitamin D levels correlated with increased BP and LVMI in humans [47,48]. Furthermore, the 1α -hydroxylase enzyme that converts [25(OH)D3] to [1,25(OH)₂D3] is expressed in a variety of tissues, including human endothelial cells and VSMCs [4,5]. These data suggest a paracrine effect of [25(OH)D3] that is independent of circulating [1,25(OH)₂D3] levels, which challenges the traditional notion that biological activity of vitamin D is primarily dependent on conversion in renal proximal tubule [4].

An observational study by Wolf *et al.* [49] have found that, in incident HD patients, deficient values of vitamin D were associated with early mortality and that treatment with active vitamin D could probably reverse this situation.

Our results demonstrate that high [25(OH)D3] serum levels may have a protective role in cardiovascular disease, since deficient [25(OH)D3] levels were associated with higher BNP plasma values, increased PP (> 65 mmHg) and higher vascular calcification score (\geq 3). These results were in accordance with the study published by London *et al.* [12]. A similar correlation could not be demonstrated for [1,25(OH)₂D3], which can be explained by the fact that the vast majority of our patients showed very low levels of [1,25(OH)₂D3] and were treated mainly with a vitamin D receptor activator (paricalcitol), which does not interfere/is not measured by the [1,25(OH)₂D3] assay. Patients treated with paricalcitol also showed lower [1,25(OH)₂D3] levels, which could be explained by a possible negative feedback mechanism. This effect was not observed in the 14 patients treated with calcitriol, probably due to the low doses that were used.

Several studies have shown that vitamin D has numerous important nonclassic actions, including a protective role in innate immunity [5,9,50]. London *et al.* [12] showed that [25(OH)D3] levels significantly correlated with markers of arteriosclerosis and endothelial dysfunction in dialysis patients. Low vitamin D levels were also associated with decreased pulmonary function test results, increased PP, congestive heart failure and increased carotid intima-media thickness [51,52]. Recent findings indicated that low [25(OH)D3] levels were associated with an increased risk of cancer and autoimmune diseases such as type 1 diabetes and rheumatoid arthritis [9].

In our study, the negative correlation between [25(OH)D3] and CRP and the positive correlation with albumin may only illustrate [25(OH)D3] as another marker of inflammation or represent the already described immunomodulator and anti-inflammatory actions of this hormone.

In this study, we used an SVCS based on plain radiographic films of pelvis and hand. This SVCS evaluated in plain X-ray was previously demonstrated to be associated with coronary artery disease and peripheral artery disease and to be a predictor of cardiovascular mortality and cardiovascular hospitalizations in dialysis patients [21]. This vascular calcification score is an inexpensive and valuable tool that can be used for screening for the presence of vascular calcifications in dialysis patients. Computed tomography scans are more accurate for the quantitative assessment of vascular calcifications but may be inadequate for an initial screening of vascular calcifications because of their greater price and limited availability in some areas [53]. The K/DOQI guidelines also recommend the utilization of plain X-ray for identification of vascular calcifications in dialysis patients [22].

This study shows some limitations due to the fact of being an observational and cross-sectional study. Although it shows a relevant association between [25(OH)D3] insufficiency and cardiovascular risk factors, a large randomized prospective study is needed to clarify the role of [25(OH)D3] on the increased cardiovascular morbidity and mortality observed in uraemic patients. Nevertheless it seems relevant that serum levels of [25(OH)D3] should be evaluated in patients with CKD and insufficiency/deficiency treated. Recent studies show that [25(OH)D3] levels should also be evaluated in high-risk individuals in the general population [54,55].

Conclusions

Deficiency of [25(OH)D3] and [1,25(OH)₂D3] is very prevalent in dialysis patients. Our results suggest that lower levels of [25(OH)D3] are a cardiovascular risk marker in HD patients, since they are independently associated with higher BNP plasma levels, increased PP and with the presence of a higher vascular calcification score. Active vitamin D therapy seems to protect patients from developing vascular calcifications.

Conflict of interest statement. None declared.

References

1. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998; 32: S112-S119

2. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM *et al.* Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2208–2218
3. Kalantar-Zadeh K, Kuwae N, Regidor DL *et al.* Survival predictability of time-varying indicators of bone disease in maintenance hemodialysis patients. *Kidney Int* 2006; 70: 771–780
4. Hendy GN, Hruska KA, Mathew S *et al.* New insights into mineral and skeletal regulation by active forms of vitamin D. *Kidney Int* 2006; 69: 218–223
5. Andress DL. Vitamin D in chronic kidney disease. A systemic role for selective vitamin D receptor activation. *Kidney Int* 2006; 69: 33–43
6. Gonzalez EA, Sachdeva A, Oliver DA *et al.* Vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease. A single center observational study. *Am J Nephrol* 2004; 24: 503–510
7. LaClair RE, Hellman RN, Karp SL *et al.* Prevalence of calcitriol deficiency in CKD: a cross-sectional study across latitudes in the United States. *Am J Kidney Dis* 2005; 45: 1026–1033
8. Ishimura E, Nishizawa Y, Inaba M *et al.* Serum levels of 1,25-dihydroxyvitamin D, 24,25-dihydroxyvitamin D, and 25-hydroxyvitamin D in nondialysed patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 1999; 55: 1019–1027
9. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 362–371
10. Zittermann A, Schleithoff SS, Tenderich G *et al.* Low vitamin D status: a contributing factor in the pathogenesis of congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 105–112
11. Kristal-Boneh E, Froom P, Harari G *et al.* Association of calcitriol and blood pressure in normotensive men. *Hypertension* 1997; 30: 1289–1294
12. London GM, Guérin AP, Verbeke FH *et al.* Mineral metabolism and arterial functions in end-stage renal disease: potential role of 25-hydroxyvitamin D deficiency. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 613–620
13. Blacher J, Guérin AP, Pannier B *et al.* Arterial calcifications, arterial stiffness, and cardiovascular risk in end-stage renal disease. *Hypertension* 2001; 38: 938–942
14. Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR *et al.* Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 1999; 100: 2168–2176
15. Giachelli CM, Jono S, Shioi A *et al.* Vascular calcification and inorganic phosphate. *Am J Kidney Dis* 2001; 38(Suppl 1): S34–S37
16. Moe SM, O'Neill KD, Duan D *et al.* Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins. *Kidney Int* 2002; 61: 638–647
17. Giachelli CM. Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2959–2964
18. Ketteler M, Vermeer C, Wanner C *et al.* Novel insights into uremic vascular calcification: role of matrix Gla protein and alpha-2-Heremans Schmid glycoprotein/fetuin. *Blood Purif* 2002; 20: 473–476
19. Guérin AP, London GM, Marchais SJ *et al.* Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1014–1021
20. Klassen PS, Lowrie EG, Reddan DN *et al.* Association between pulse pressure and mortality in patients undergoing maintenance hemodialysis. *J Am Med Assoc* 2002; 287: 1548–1555
21. Adragão T, Pires A, Lucas C *et al.* A simple vascular calcification score predicts cardiovascular risk in hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 1480–1488
22. National Kidney Foundation. KDOQI Clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2003; 42(Suppl 3): 1–201
23. Matias P, Aires I, Jorge C *et al.* Brain natriuretic peptide is a good prognostic marker in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(Suppl 4): iv447 (Abstract)
24. Devereux RB, Alonso DR, Lutas EM *et al.* Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol* 1986; 57: 450–458
25. Koren MJ, Devereux RB, Casale PN *et al.* Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med* 1991; 114: 345–52
26. McCullough PA, Omland T, Maisel AS. B-type natriuretic peptides: a diagnostic breakthrough for clinicians. *Rev Cardiovasc Med* 2003; 4(2): 72–80
27. Mosekilde L. Vitamin D and the elderly. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 62: 265–281
28. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92: 4–8
29. Racek J, Králová H, Trfil L *et al.* Brain natriuretic peptide and N-terminal proBNP in chronic haemodialysis patients. *Nephron Clin Pract* 2006; 103: c162–c172
30. Zeng C, Wei T, Jin L *et al.* Value of B-type natriuretic peptide in diagnosing left ventricular dysfunction in dialysis-dependent patients. *Intern Med J* 2006; 36: 552–557
31. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 1998; 339: 321–328
32. Nitta K, Kawashima A, Yumura W *et al.* Plasma concentrations of brain natriuretic peptide as an indicator of cardiac ventricular function in patients on hemodialysis. *Am J Nephrol* 1998; 18: 411–415
33. Schwartz U, Buzello M, Ritz E *et al.* Morphology of coronary atherosclerotic lesions in patients with end-stage renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 218–223
34. London GM. Cardiovascular calcifications in uremic patients: clinical impact on cardiovascular function. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: S305–S309
35. Levin A, Singer J, Thompson CR *et al.* Prevalent left ventricular hypertrophy in the predialysis population: identifying opportunities for intervention. *Am J Kidney Dis* 1996; 27: 347–354
36. Zoccali C, Benedetto FA, Mallamaci F *et al.* Left ventricular mass monitoring in the follow-up of dialysis patients: prognostic value of left ventricular hypertrophy progression. *Kidney Int* 2004; 65: 1492–1498
37. Cannata-Andía JB, Rodríguez-García M, Carrillo-López N *et al.* Vascular calcifications: pathogenesis, management, and impact on clinical outcomes. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: S267–S273
38. Ketteler M, Gross ML, Ritz E. Calcification and cardiovascular problems in renal failure. *Kidney Int* 2005; 94: S120–S127
39. Bas A, Lopez I, Perez J *et al.* Reversibility of calcitriol-induced medial artery calcification in rats with intact renal function. *J Bone Miner Res* 2006; 21: 484–490
40. Henley C, Colloton M, Cattley RC *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D3 but not cinacalcet HCl (Sensipar/Mimpara) treatment mediates aortic calcification in a rat model of secondary hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20: 1370–1377
41. Teng M, Wolf M, Ofsthun MN *et al.* Activated injectable vitamin D and hemodialysis survival: a historical cohort study. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1115–1125
42. Naves Diaz M, Guinsburg A, Marelli C *et al.* Oral active vitamin D and hemodialysis (HD) survival in a large cohort from Latin America. The CORES study. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 314A
43. Tentori F, Hunt WC, Stidley CA *et al.* Mortality risk among hemodialysis patients receiving different vitamin D analogs. *Kidney Int* 2006; 70: 1858–1865
44. Cardus A, Panizo S, Parisi E *et al.* Differential effects of vitamin D analogs on vascular calcification. *J Bone Miner Res* 2007; 22: 860–866
45. Wu-Wong JR, Noonan W, Ma J *et al.* Role of phosphorus and vitamin D analogs in the pathogenesis of vascular calcification. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318: 90–98
46. Li YC, Qiao G, Uskokovic M *et al.* Vitamin D: a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 89: 387–392
47. Lind L, Hanni A, Lithell H *et al.* Vitamin D is related to blood pressure and other cardiovascular risk factors in middle-age men. *Am J Hypertens* 1995; 8: 894–901
48. Adragão T, Ferreira A, Frazão J *et al.* 25-hydroxyvitamin D deficiency: a new cardiovascular risk factor in hemodialysis patients? *Nephrol Dial Transplant Plus* 2008; 1(Suppl 2): ii337 (Abstract)

49. Wolf M, Shah A, Gutierrez O *et al.* Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients. *Kidney Int* 2007; 72: 1004–1013
50. Jones G. Expanding role for vitamin D in chronic kidney disease: importance of blood 25-OH-D levels and extra-renal 1 α -hydroxylase in the classical and non-classical actions of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Semin Dial* 2007; 20: 316–324
51. Targher G, Bertolini L, Padovani R *et al.* Serum 25-hydroxyvitamin D₃ concentrations and carotid artery intima-media thickness among type 2 diabetic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 65: 593–597
52. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F8–F28
53. Moe S, Drueke T, Cunningham J *et al.* Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2006; 69: 1945–1953
54. Bischoff-Ferrari HA, Willet WC, Wong JB *et al.* Fracture prevention with vitamin D supplementation: a meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 2005; 293: 2257–2264
55. Heaney RP. The vitamin D requirement in health and disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97: 13–19

Received for publication: 17.4.08

Accepted in revised form: 13.8.08

6.5 Deficiência em 25-hidroxivitamina D e mortalidade

Numa população americana de doentes incidentes em hemodiálise, Miles Wolf e colaboradores encontraram níveis de 25-hidroxivitamina D insuficientes (<30 ng/mL) em 78% dos casos, sendo a deficiência severa em 18% dos doentes (<10 ng/mL). Estes autores descreveram um significativo aumento da mortalidade precoce, nos doentes incidentes em hemodiálise, com deficiência em 25-hidroxivitamina D (103).

Níveis baixos de 25-hidroxivitamina D e de 1,25 dihidroxivitamina D correlacionaram-se com a mortalidade global e a mortalidade cardiovascular em 3258 doentes sujeitos a realização de coronariografia eletiva (104). Esta correlação inversa foi mais significativa, sob o ponto de vista estatístico, para a 25-hidroxivitamina D que para 1,25 dihidroxivitamina D.

Ravani e colaboradores também demonstraram que os níveis plasmáticos de 25-hidroxivitamina D são um índice de predição inverso da progressão da insuficiência renal e da mortalidade, em doentes com IRC em estádios 2 a 5 (105).

Numa população de 3011 doentes norte americanos com IRC (mas não em diálise), integrados no estudo “Third National Health and Nutrition Examination Survey” e acompanhados ao longo de 9 anos, níveis séricos de 25-hidroxivitamina D inferiores a 15 ng/mL associaram-se a um risco significativamente aumentado de mortalidade global e mortalidade cardiovascular (106).

Mais recentemente, em 444 doentes com um débito do filtrado glomerular inferior a 60 ml/min (412 com IRC estágio 3, 23 em estágio 4 e 9 em estágio 5) foi igualmente possível evidenciar uma associação entre deficiência em 25-hidroxivitamina D e aumento do risco de mortalidade global e cardiovascular (107).

O risco de mortalidade cardiovascular no grupo de doentes com acentuada deficiência nesta vitamina foi significativamente mais elevado, que o observado nos restantes doentes, quer antes do ajustamento (6,07 vezes) quer após o ajustamento para múltiplos fatores (5,61 vezes).

Numa meta-análise mais recente, foram seleccionados 10 estudos prospetivos, referentes a 6853 doentes. Nesta avaliação, que incluiu doentes com diferentes graus de IRC do estágio 2 ao 5D, níveis mais elevados de 25-hidroxitamina D associaram-se a um significativo aumento da sobrevivência, secundário a uma redução muito significativa da mortalidade global (108).

Simultaneamente, Jean e colaboradores, avaliaram a sobrevivência de 648 doentes franceses hemodialisados, integrados no estudo ARNOS (109). Também nesta análise, níveis séricos mais elevados de 25-hidroxitamina D (superiores a 18 ng/mL) associaram-se a maior sobrevivência (0,73: 0,5-0,96; $p = 0,02$) dos doentes. Nesta análise, a terapêutica com alfacalcidol, apenas foi estatisticamente significativa na melhoria da sobrevivência, na análise univariada e quando utilizada em doses baixas.

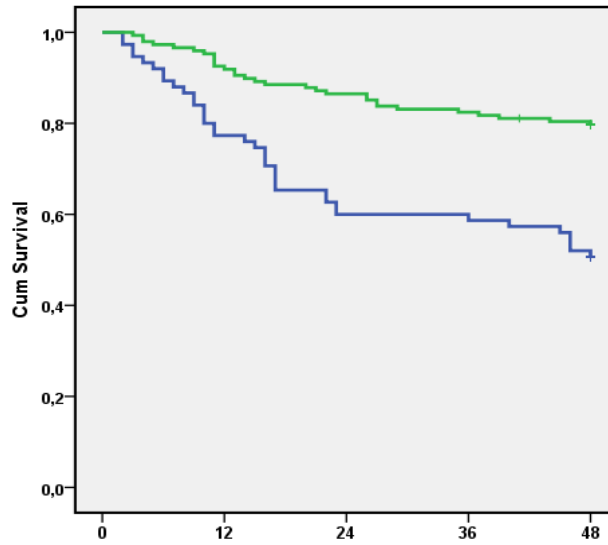
Na nossa experiência, os níveis séricos basais de 25-hidroxitamina D parecem ser um excelente marcador da morbidade (refletida nos internamentos hospitalares) e de mortalidade global e cardiovascular nos hemodialisados.

Acabámos de analisar os resultados a longo prazo (4 anos), obtidos a partir do estudo prospetivo de 223 hemodialisados, acima referido (26).

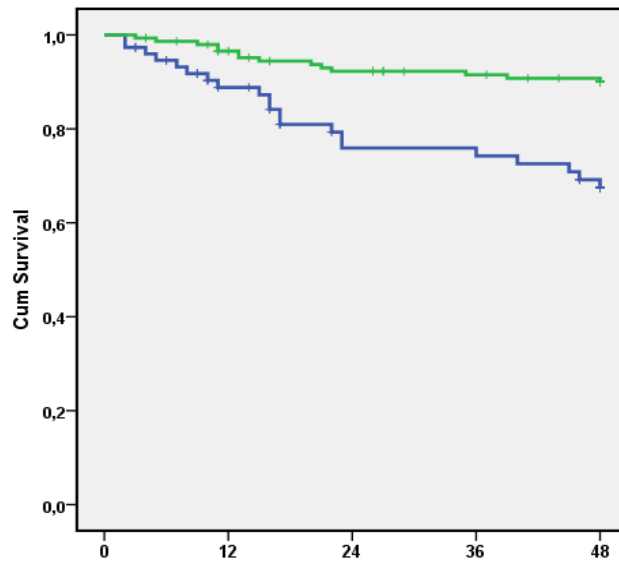
Todos os doentes foram submetidos a suplementação com colecalciferol, administrado durante a sessão de hemodiálise (para garantir a adesão à terapêutica) em doses dependentes dos níveis séricos de calcidiol basal, como descrito por nós anteriormente (26).

Agora, com um tempo de acompanhamento médio superior a 3 anos e meio ($42,9 \pm 39,3$ meses), verifica-se que, ao longo deste período, 44% dos doentes foram hospitalizados pelo menos uma vez, e 29% dos doentes faleceram (predominantemente de causa cardiovascular).

Os níveis séricos basais de 25-hidroxitamina D eram significativamente menores nos doentes que faleceram de qualquer causa ($16,6 \pm 8,2$ vs. $23,7 \pm 13,1$ ng/mL, $p < 0,001$) e também nos que faleceram de causa cardiovascular ($16,4 \pm 8,7$ vs. $22,6 \pm 12,6$ ng/mL, $p = 0,006$).



Mortalidade global, ao longo de 48 meses, de doentes com níveis basais de 25-(OH)-vitamina D3 basal, superior a 15 ng/dl (linha verde) ou inferior a 15 µg/dL (linha azul)



Mortalidade cardiovascular, ao longo de 48 meses, de doentes com níveis basais de 25-(OH)-vitamina D3 basal, superior a 15 ng/dl (linha verde) ou inferior a 15 µg/dl (linha azul)

Os níveis séricos basais de 25-hidroxivitamina D eram também significativamente menores nos doentes que necessitaram de hospitalização durante este estudo prospectivo ($18,5 \pm 9,3$ vs. $23,9 \pm 11,7$ ng/mL, $p=0,001$).

Pelo contrário, e à semelhança do que já tinha sido encontrado na análise interina ao fim de 12 meses (bem como descrito por outros autores), os níveis séricos de 1,25-hidroxivitamina D eram semelhantes em todos os grupos.

Na análise multivariada, níveis séricos basais mais baixos de 25-hidroxivitamina D foram um marcador de predição de hospitalizações ($p=0,01$), de morte de qualquer causa ($p=0,001$), ou de morte de causa cardiovascular.

Os doentes com níveis séricos basais de deficiência em 25-hidroxivitamina D (<15 ng/mL) apresentaram uma sobrevivência aos 48 meses, significativamente menor.

Em conclusão, na nossa experiência, níveis séricos basais de deficiência em 25-hidroxivitamina D parecem ser um excelente marcador da morbidade (hospitalizações) e da mortalidade global e cardiovascular.

6.6 Efeitos da suplementação com colecalciferol no doente urémico (manuscrito 20)

Tendo em conta os aparentes efeitos protetores da 25-hidroxivitamina D na disfunção do sistema cardiovascular e o fato da patologia deste foro ser a principal responsável pela mortalidade nos doentes com IRC (em fase pré-dialítica, em diálise e após transplantação), decidimos investigar as potencialidades, as indicações e os eventuais efeitos acessórios associados à suplementação com esta vitamina.

Como discutimos nos capítulos 6.4. e 6.5., níveis circulantes de insuficiência / deficiência em 25-hidroxivitamina D têm-se associado a um risco aumentado de patologia cardiovascular e de mortalidade (global e de causa cardiovascular).

Mas, estas associações limitam-se a colocar hipóteses e a abrir janelas de investigação, não nos permitindo (na ausência de resultados robustos originados por ensaios clínicos controlados e aleatorizados) estabelecer uma relação de causalidade entre a deficiência em calcidiol e o aumento do risco de morbidade/mortalidade.

Numa revisão recente, foram analisados os efeitos da suplementação com ergocalciferol ou com colecalciferol em indivíduos saudáveis. Nesta análise foram integrados 13 estudos observacionais e 18 ensaios clínicos aleatorizados.

Apesar do risco de desenvolvimento de diabetes e de HTA se ter associado a níveis mais baixos de 25-hidroxivitamina D, os resultados obtidos com a suplementação foram contraditórios e pouco esclarecedores. Em oito dos ensaios a suplementação com vitamina D nativa não se acompanhou de modificação na incidência de diabetes. No que respeita à HTA, a maioria dos estudos observacionais e dos ensaios clínicos integrados nesta revisão não mostrou qualquer efeito significativo, associado à suplementação com vitamina D nativa (108).

Importa, no entanto, sublinhar que, na grande maioria destes ensaios clínicos, a morbidade e mortalidade cardiovascular não constituíram objetivos primários nem secundários dos estudos e que muitos dados foram obtidos em análises secundárias posteriores.

No entanto, tendo em conta que a morbidade e a mortalidade (global e cardiovascular) é significativamente mais elevada nos doentes com IRC, admite-se que os eventuais efeitos protetores da suplementação com vitamina D nativa sejam mais evidentes nesta população (109).

Tomando como referência apenas doentes com IRC, foi recentemente publicada uma meta-análise dos artigos referentes a suplementação com vitamina D nativa, na qual foram incluídos os nossos resultados (27).

Nesta revisão foram incluídos 22 manuscritos, correspondentes a 17 estudos observacionais e 5 ensaios clínicos aleatorizados (27). Quer nos estudos observacionais quer nos ensaios clínicos, foi descrita uma evolução favorável (no

sentido da normalização) dos níveis séricos de 25-hidroxivitamina D e uma redução dos níveis séricos de PTH intacta.

Os níveis de 1,25- hidroxivitamina D apenas aumentaram significativamente nos estudos observacionais, não se tendo observado a mesma diferença nos ensaios controlados e aleatorizados.

A suplementação com vitamina D nativa foi bem tolerada e raramente se acompanhou de hipercalcemia ou hiperfosfatemia.

Infelizmente, mesmo nos cinco ensaios clínicos incluídos nesta revisão foram avaliados apenas variações de marcadores laboratoriais, mas não foram analisados quaisquer resultados clínicos relevantes, como por exemplo: internamentos hospitalares, morbidade cardiovascular, mortalidade global e de causa cardiovascular, etc. (27).

Noutra meta-análise recente, que incluiu estudos observacionais e ensaios clínicos aleatorizados de suplementação com vitamina D, Wang e colaboradores identificaram uma significativa redução da mortalidade cardiovascular, associada à suplementação com vitamina D, em 5 estudos prospetivos em hemodialisados e num estudo efetuado na população em geral.

No entanto, em 8 dos ensaios aleatorizados analisados, apesar de se observar a mesma tendência favorável à suplementação com vitamina D, não foi atingido um significado estatístico (110).

Em nossa opinião esta meta-análise é de difícil valorização, porque associou na mesma análise estudos em que foram utilizadas formas ativas de vitamina D e outros em que os doentes foram medicados com vitamina D nativa, para além de misturar investigações feitas em doentes com diferentes graus de IRC e doentes em diálise.

Reduções semelhantes nos níveis de PTH intacta foram descritas nos doentes com IRC de diferentes graus e em doentes hemodialisados, tratados com vitamina D nativa, em diversos ensaios clínicos aleatorizados, que foram recentemente alvo de duas meta-análises por Palmer e colaboradores (111) (112).

Da análise destas séries também não é possível concluir se os efeitos da suplementação com vitamina D nativa são aditivos aos efeitos da suplementação com vitamina D ativa.

De qualquer modo, num ensaio clínico realizado pelo grupo de Sharon Moe, a redução dos níveis séricos de PTH intacta em doentes com IRC estágio 3 e 4, foi equivalente nos doentes tratados com vitamina D nativa (colecalfiferol em 22 doentes) e nos doentes tratados com vitamina D ativa (doxercalfiferol em 25 doentes) (113).

Na nossa investigação, realizámos um estudo prospetivo com duração de um ano, em 158 doentes hemodialisados, no qual procedemos à suplementação com colecalfiferol oral durante 6 meses, após um período semestral em que foram obtidos 2 níveis séricos de 25-hidroxivitamina D (um após o Inverno e outro após o Verão). A média aritmética destes 2 valores basais (que não foi significativamente diferente, apesar de, como esperado, ser tendencialmente mais elevada após o Verão) foi comparada com os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D após suplementação com colecalfiferol (26).

Foram excluídos do estudo doentes previamente medicados com colecalfiferol, com calcitriol, com calcimiméticos ou sujeitos a paratiroidectomia. Nenhum doente estava medicado com captadores de fósforo de base cálcica. Todos os doentes fizeram hemodiafiltração em pré-diluição, utilizando membranas de diálise de polissulfona de alta permeabilidade, antes e durante o ano de avaliação do estudo.

Face à ausência de recomendações específicas acerca das doses de suplementação com vitamina D a utilizar nos doentes em hemodiálise, resolvemos transpor para esta população as propostas dos KDOQI para as fases pré-diálise da IRC. Nestas circunstâncias, prescrevemos doses de colecalfiferol de 50000 UI/semana aos doentes com níveis de 25-hidroxivitamina D de deficiência (<15 ng/mL), de 10000 UI/semana aos doentes com níveis insuficientes de 25-hidroxivitamina D (entre 15 e 30 ng/mL) e 2700 UI/semana a todos os outros (terapêutica de manutenção). Esta medicação foi administrada na sala de diálise, pela enfermeira de apoio, assegurando a adesão de todos os doentes.

No início e no final do estudo foram ainda efetuados ecocardiogramas (pelo mesmo observador, em todos os doentes e sempre a meio da semana) para avaliação do IMVE-índice de massa do ventrículo esquerdo, e foram determinados os níveis plasmáticos de BNP-“brain natriuretic peptide”.

Na avaliação basal, os níveis de 25-hidroxivitamina D eram insuficientes (<30 ng/mL) em cerca de 80% dos doentes e os níveis séricos de 1,25-hidroxivitamina D eram insuficientes (<20 ng/mL) em mais de 95% dos casos.

Após a suplementação com colecalciferol nas doses acima descritas, observou-se um significativo aumento dos níveis séricos de 25-hidroxivitamina D, de $22,3 \pm 12$ para $42 \pm 12,1$ ng/mL ($P < 0,001$), passando os doentes com níveis circulantes normais de 25-hidroxivitamina D (>30 ng/mL) de 20% para 86%.

A maioria dos doentes que não atingiu o nível de suficiência em 25-hidroxivitamina D eram diabéticos ($P < 0,001$).

Com a suplementação com colecalciferol, assistiu-se igualmente a um significativo aumento dos níveis séricos de 1,25-hidroxivitamina D (de 4,6 para 5,9 pg/mL; $P = 0,001$).

Pelo contrário, os níveis séricos de cálcio, fósforo e de PTH intacta reduziram-se significativamente com a suplementação com colecalciferol.

De qualquer modo, é pouco provável que esta terapêutica tenha contribuído para uma redução significativa da remodelação óssea e, conseqüentemente, para um risco aumentado de doença óssea adinâmica, tendo em conta que apenas 7% dos doentes apresentavam um nível de PTH intacta inferior a 150 pg/mL no final do estudo. De qualquer modo, só através da realização de biopsias ósseas e avaliação do osso metabólico poderemos comprovar esta afirmação.

Um dos achados mais relevantes da nossa investigação, com conseqüências clínicas e económicas, foi a redução significativa do número de doentes tratados com vitamina D ativa (que no presente estudo era apenas o paricalcitol), bem como das doses médias utilizadas ($P < 0,001$).

Os doentes medicados com paricalcitol apresentaram uma redução dos níveis séricos de 1,25-hidroxivitamina D após suplementação, apesar dos níveis de 25-hidroxivitamina D se terem elevado significativamente e de forma semelhante à que foi observada nos doentes a quem não foi administrado paricalcitol.

Este achado, aparentemente estranho, já tinha por nós sido descrito num estudo observacional acima discutido (25) e poderá ser ilustrativo da especificidade das diferentes vitaminas D ativas e eventualmente do papel de diferentes coreceptores celulares da vitamina D.

O paricalcitol, na sua ação sobre as células que expressam o recetor da vitamina D, poderá inibir a síntese e libertação de 1,25-hidroxivitamina D e/ou poderá ativar a 24-hidroxilase.

Visto que a 24 hidroxilase tem uma afinidade 10 vezes superior para a 1,25-hidroxivitamina D do que para a 25-hidroxivitamina D, qualquer destas 2 hipóteses poderá justificar os achados acima descritos.

Outros resultados relevantes deste nosso estudo prospetivo de suplementação de hemodialisados com colecalciferol (e que vieram confirmar o que tínhamos descrito anteriormente, numa análise de corte transversal (25)) foi a redução das doses de estimulador da eritropoiese (mantendo-se os níveis de hemoglobina e de ferritina sem variação significativa) e a diminuição da proteína C reactiva de alta sensibilidade, acompanhada de significativo aumento da albuminemia.

Estes 2 últimos marcadores ilustram, muito provavelmente, a redução da ativação da cascata inflamatória, aspecto de primordial importância nos hemodialisados (e que pode contribuir para a redução das doses de estimulador da eritropoiese).

Finalmente, a suplementação com colecalciferol, nesta população que apresentava níveis tão deficientes em 25-hidroxivitamina D, acompanhou-se de significativa redução dos níveis plasmáticos de “BNP-brain natriuretic peptide” (P=0,008) e do IMVE- índice de massa do ventrículo esquerdo (P=0,01).

Observou-se uma correlação negativa significativa entre a percentagem de modificação dos níveis de 25-hidroxivitamina D e os níveis de BNP ($r=-0.21;P=0.009$) bem como entre a percentagem de modificação dos níveis de 25-hidroxivitamina D e a modificação no IMVE ($r=-0,24;P=0,003$).

Estes resultados, se confirmados em ensaios clínicos controlados, aleatorizados, são particularmente relevantes para uma população de doentes que apresenta uma elevadíssima taxa de mortalidade de causa cardiovascular.

Em resumo, podemos dizer que a suplementação com colecalciferol em doentes estáveis em programa regular de hemodiálise permitiu a correção (na grande maioria dos casos) da insuficiência em 25-hidroxivitamina D.

Esta suplementação foi muito bem tolerada, sem efeitos adversos documentados (nomeadamente hipercalcemias superiores a 10.5 mg/dL, de acordo com o definido no protocolo do estudo), não havendo nenhum doente que tivesse atingido os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D, habitualmente considerados tóxicos (>100 ng/mL).

A suplementação com colecalciferol constitui uma forma, segura, fácil de efetuar, com boa adesão por parte dos doentes e com um elevado rácio eficácia/custo.

No entanto, ainda não sabemos se esta suplementação se associa a uma redução significativa de marcadores clínicos relevantes, nomeadamente da diminuição da morbilidade e da mortalidade (global e cardiovascular).

Para o demonstrar, são necessários ensaios prospetivos, aleatorizados, de longa duração e com grandes populações.

Atualmente coordenamos dois destes ensaios, que esperamos nos ajudem a obter respostas esclarecedoras às questões que foram levantadas pelos diversos estudos acima discutidos.

Um deles consiste num estudo prospetivo, aleatorizado, duplamente ocultado, em cerca de 200 doentes incidentes em hemodiálise, cujo objetivo primário é avaliar, ao fim de 12 meses, os efeitos de doses mais elevadas de

suplementação com colecalciferol (20000 UI/semana) na morbidade e mortalidade, geral e cardiovascular, desta população.

Cholecalciferol Supplementation in Hemodialysis Patients: Effects on Mineral Metabolism, Inflammation, and Cardiac Dimension Parameters

Patrícia João Matias,^{*††} Cristina Jorge,^{*††} Carina Ferreira,^{*††} Marília Borges,[§] Inês Aires,^{*††} Tiago Amaral,^{*††} Célia Gil,^{*††} José Cortez,^{§||} and Aníbal Ferreira^{*††||}

^{*}Hemodial-Dialysis Unit, Vila Franca de Xira, Portugal; [†]Dialverca-Dialysis Unit, Forte da Casa, Portugal; [‡]Núcleo de Investigação na Área Nefrológica, Lisboa, Portugal; [§]Laboratório Dr. Fernando Teixeira, Lisboa, Portugal; and ^{||}Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal

Background and objectives: Vitamin D deficiency is highly prevalent in chronic kidney disease. The aim of this study was to evaluate the effects of oral cholecalciferol supplementation on mineral metabolism, inflammation, and cardiac dimension parameters in long-term hemodialysis (HD) patients.

Design, setting, participants, & measurements: This 1-year prospective study included 158 HD patients. Serum levels of 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D], 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25(OH)₂D], intact parathyroid hormone, and plasma brain natriuretic peptide as well as circulating bone metabolism and inflammation parameters were measured before and after supplementation. Baseline 25(OH)D and 1,25(OH)₂D levels were measured twice (end of winter and of summer, respectively). Therapy with paricalcitol, sevelamer, and darbepoietin was evaluated.

Results: There was an increase in serum 25(OH)D and 1,25(OH)₂D levels after supplementation. Conversely, serum calcium, phosphorus, and intact parathyroid hormone were decreased. There was a reduction in the dosage and in the number of patients who were treated with paricalcitol and sevelamer. Darbepoietin use was also reduced, with no modification of hemoglobin values. Serum albumin increased and C-reactive protein decreased during the study. Brain natriuretic peptide levels and left ventricular mass index were significantly reduced at the end of the supplementation.

Conclusions: Oral cholecalciferol supplementation in HD patients seems to be an easy and cost-effective therapeutic measure. It allows reduction of vitamin D deficiency, better control of mineral metabolism with less use of active vitamin D, attenuation of inflammation, reduced dosing of erythropoiesis-stimulating agents, and possibly improvement of cardiac dysfunction.

Clin J Am Soc Nephrol 5: 905–911, 2010. doi: 10.2215/CJN.06510909

Patients with chronic kidney disease (CKD) frequently have low serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] or calcidiol levels, which is the substrate of 1,25-dihydroxyvitamin D [1,25(OH)₂D] or calcitriol (1–3). With CKD progression, this tendency to vitamin D substrate insufficiency, coupled with the demonstrated loss of the renal 1 α -hydroxylase activity, leads to progressive calcitriol deficiency (4,5).

Levels of 25(OH)D have been shown to be the best indicator of vitamin D status (6). In some studies (7,8), 25(OH)D showed inverse correlations with age, female gender, diabetes, and intact parathyroid hormone (iPTH) level. Calcidiol concentration also depends on the season, with higher serum levels after summer time (8).

The importance of measuring 25(OH)D levels is also supported by the newly emerging concept that an extrarenal 1 α -

hydroxylase is expressed in many sites outside the kidney. The extrarenal pool of 1 α -hydroxylase (unlike its renal pool) seems to remain intact in kidney disease. This locally produced 1,25(OH)₂D seems to have “autocrine or paracrine” effects and to promote additional roles for vitamin D, beyond its classical functions in mineral metabolism. Indeed, studies have demonstrated that 1,25(OH)₂D acts as a cell-differentiating factor and antiproliferative agent on a variety of tissues (9–11). By influencing gene expression in multiple tissues, including the immune system, skin, muscle, pancreas, kidney, and brain, it is believed that vitamin D is involved in the pathogenesis of psoriasis, certain types of cancer, multiple sclerosis, diabetes, and BP regulation (9,12). Deficient levels of 25(OH)D have also been associated with cardiovascular risk factors in patients with and without CKD (12–15).

The evaluation of calcidiol serum levels in patients with stage 5D CKD is suggested by the Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) recommendations, and the proposed strategy for correction of 25(OH)D deficiency/insufficiency is similar to that used in the general population (16). The aim of this study was to evaluate the effects of oral cholecalciferol supple-

Received September 14, 2009. Accepted February 1, 2010.

Published online ahead of print. Publication date available at www.cjasn.org.

Correspondence: Dr. Patrícia João Matias, Hemodial-Dialysis Unit, Quinta da Mina, Lote 3 r/c, 2600–063 Vila Franca de Xira, Portugal. Phone: +351919982148; Fax: +351263276674; E-mail: patriciajoaomatias@gmail.com

Copyright © 2010 by the American Society of Nephrology

ISSN: 1555-9041/505-0905

mentation in mineral metabolism, inflammation markers, and cardiac dysfunction in patients with stage 5D CKD.

Materials and Methods

Study Design

This was a 1-year follow-up, prospective study of a cohort of prevalent hemodialysis (HD) patients from a single center (two dialysis units sharing the medical team). Serum 25(OH)D and 1,25(OH)₂D were measured on two occasions with a 6-month interval (end of winter and of summer, respectively) and at the end of the study, after 6 months of cholecalciferol supplementation.

Population

All patients were included in the study, except for those who were taking cinacalcet, oral calcitriol, or calcium (Ca) carbonate and those who had undergone parathyroidectomy. Patients who were lost to follow-up were also excluded from the analysis (25 patients died, 20 were transferred and six received a transplant).

The study included 158 patients: 74 (47%) men and 84 (53%) women with mean age of 62.8 ± 14.8 years. All patients underwent dialysis with high-flux membranes (helixone-Fresenius) and ultrapure water (evaluated monthly by kinetic chromogenic test). The dialysate Ca concentration was 1.5 mmol/L for all patients during the study. Mean HD vintage was 44.3 ± 32.4 months.

Thirty-nine (25%) patients had diabetes, and 54 (34%) had hypertension. Coronary artery disease was diagnosed when the patient had a typical history of angina pectoris or had sustained a myocardial infarction, had a positive stress test, or had undergone a percutaneous coronary intervention or coronary bypass surgery. According to these criteria, coronary artery disease was diagnosed in 49 (31%) patients.

At baseline, 70 (44%) patients were taking paricalcitol (the only active vitamin D used during the study), at a mean dosage of 7.2 ± 4.5 $\mu\text{g}/\text{wk}$ (range 2.5 to 30.0 $\mu\text{g}/\text{wk}$). A total of 145 (92%) patients were on darbepoietin therapy, with a mean dosage of 0.042 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per wk per g/dl. The target for ferritin was between 200 and 800 ng/ml for all patients, and, when needed, only intravenous iron saccharate was used.

Systolic (SBP) and diastolic BP (DBP) were measured in all HD sessions in the month before the beginning of supplementation and in the last month of cholecalciferol supplementation. Pulse pressure (PP) was also calculated (on the basis of BP measurements before HD) by the formula $\text{PP} = \text{SBP} - \text{DBP}$. Antihypertensive medication, including angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEIs) and angiotensin II receptor blockers (ARBs), and therapy with statins were evaluated at the beginning and at the end of the study.

Oral cholecalciferol (Vigantol) was prescribed once or thrice weekly, after each HD session, ensuring 100% adhesion. Supplementation was started for all patients at the same time and was maintained for 6 months. It was based on baseline calcidiol serum levels: 50,000 IU (2.5 ml, or 75 drops) once a week for patients with 25(OH)D levels <15 ng/ml, 10,000 IU (0.5 ml, or 15 drops) once a week when 25(OH)D was between 16 and 30 ng/ml, and 2700 IU (4 drops) three times per week when levels were >30 ng/ml.

Biochemical Analysis

Serum 25(OH)D and 1,25(OH)₂D levels were measured with a RIA provided by IDS (Baldon, UK). After an extraction procedure, the assay is carried out with anti-25(OH)D or anti-1,25(OH)₂D ovine antibody, and phase separation is performed with anti-ovine IgG antiserum. The assay measures 25(OH)D₂ and 25(OH)D₃ or 1,25(OH)₂D₂ and 1,25(OH)₂D₃. Intra-assay and interassay variability are 5 and 8%, respectively. The normal range for 25(OH)D is 10 to 60 ng/ml and for

1,25(OH)₂D is 20 to 46 pg/ml, as indicated by the manufacturer. The inferior detection limit is 1.6 ng/ml and 2.5 pg/ml, respectively.

Serum Ca, serum phosphorus (P), Ca-P product, total intact parathyroid hormone (iPTH), bone alkaline phosphatase, hemoglobin, ferritin, albumin, and C-reactive protein (CRP) were measured before the beginning of supplementation and at the end of the study. Ca was corrected for hypoalbuminemia by addition of 0.8 mg/dl to the Ca concentration for each 1-g/dl decrease in albumin concentration from 4.0 g/dl (17). Total iPTH was evaluated by immunochemiluminescence using a second-generation assay (Immulate 2000; Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA) and normal range of values is 10 to 65 pg/ml. Albumin was measured using a colorimetric assay and CRP was evaluated by an immunoturbidimetric assay.

The levels of brain natriuretic peptide (BNP) were determined before the beginning of supplementation and at the end of the study in EDTA plasma samples that were collected before HD, using the AxSYM BNP Assay (MEIA) on the AxSYM 2 Immunochemical Analyser (Abbott Laboratories, Chicago, IL). In a previous study (18), we found no significant difference on BNP measured levels before or after dialysis. All blood samples were collected before dialysis in midweek sessions.

Echocardiography Evaluation

At the beginning and at the end of the study, each patient underwent an echocardiography examination, and left ventricular mass index (LVMI) was calculated using the Devereux formula (19) and indexed to body surface area. This examination was performed on a midweek nondialysis day and in the same cardiologic center.

Statistical Analysis

For statistical analysis, the arithmetic mean of the two measurements of 25(OH)D and 1,25(OH)₂D at baseline (end of winter and of summer, respectively) was used. Demographic and laboratory data were compared at baseline and after 6 months of cholecalciferol supplementation. Variables were expressed as frequencies for categorical variables, mean values with SD for normally distributed variables, and median (interquartile ranges) values for non-normally distributed variables. Comparison between two groups was performed using paired Wilcoxon test. Spearman correlation was used for univariate analysis.

Statistical analysis was performed with SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

At baseline, both 25(OH)D and 1,25(OH)₂D serum levels were low and positively correlated ($r = 0.25$, $P < 0.001$). Serum 25(OH)D was below sufficiency values (<30 ng/ml) in almost 80% of our patients, and levels of 1,25(OH)₂D were considered insufficient (<20 pg/ml) in >95% of patients. Serum levels of 25(OH)D were higher after summer compared with after winter but were not statistically significant (22.6 ± 16.0 versus 20.8 ± 12.3 ng/ml; $P > 0.05$). Calcitriol serum levels were similar on both occasions (4.7 versus 4.6 pg/ml; $P > 0.05$). Older patients showed lower levels of 25(OH)D ($r = -0.31$, $P < 0.001$). Patients with diabetes presented lower concentrations of 25(OH)D (24.2 ± 12.5 versus 18.5 ± 9.7 ng/ml; $P < 0.001$) and 1,25(OH)₂D (4.4 versus 4.9 pg/ml; $P = 0.02$) than patients without diabetes.

Postwinter and postsummer baseline measurements were compared with the values that were obtained after 6 months of oral cholecalciferol supplementation. There was a significant increase in 25(OH)D (22.3 ± 12.0 versus 42.0 ± 12.1 ng/ml; $P <$

0.001) and 1,25(OH)₂D (4.6 versus 5.9 pg/ml; *P* = 0.001) levels (Figure 1). In 136 (86%) patients, 25(OH)D levels became normal (>30 ng/ml) at the end of the study, in comparison with only 32 (20%) at baseline (Figure 2). Most of the patients whose 25(OH)D levels did not increase had diabetes (*P* < 0.001). None of the patients achieved a toxic level of 25(OH)D: >100 ng/ml (20).

Clinical and biochemical parameters at the beginning and at the end of supplementation are reported in Table 1. Serum Ca (*P* = 0.014) and P (*P* = 0.011) showed a significant reduction with supplementation. This was independent of paricalcitol therapy, because patients who were not administered active vitamin D during the studied period also presented this reduction. Levels of iPTH (*P* = 0.01) showed a significant decrease with supplementation. There were no episodes of hypercalcemia >10.5 mg/dl during the study. Only 11 (7%) patients of those who had iPTH levels between 150 and 300 pg/ml at the beginning of the study showed values <150 pg/ml after supplementation.

In association with the cholecalciferol supplementation, a significant reduction in the number of treated patients as well as in active vitamin D dosage was observed (*P* < 0.001). Patients who were taking paricalcitol during the study showed significantly lower 1,25(OH)₂D levels (3.9 versus 6.8 pg/ml; *P* < 0.001) despite a same increase in 25(OH)D values (Figure 3). There was also a significant decrease in patients who were treated with sevelamer after supplementation (*P* < 0.001).

Darbepoietin use also decreased (*P* = 0.013), with no modification of hemoglobin and ferritin values. Serum albumin increased (*P* < 0.001) and CRP decreased (*P* = 0.004) with supplementation.

Mean SBP, DBP, PP, and interdialytic weight gain in the last month before supplementation and in the last month of supplementation were similar. The percentage of patients who were on antihypertensive therapy, namely ACEIs and ARBs, and treated with statins was not different at the beginning and at the end of the study.

Although BNP plasma levels were high compared with the general population with no cardiac disease, they showed a significant reduction during the study (*P* = 0.008). LVMI also

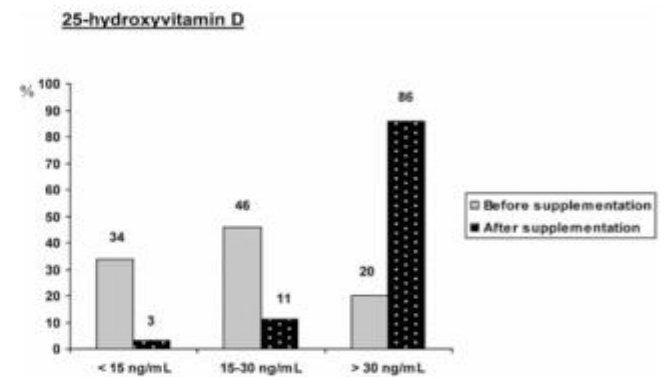


Figure 2. Serum 25(OH)D distribution before and after supplementation.

had a significant decrease after supplementation (*P* = 0.01). There was a significant negative correlation between the percentage of change in 25(OH)D and the percentage of change in BNP levels (*r* = -0.21, *P* = 0.009) and LVMI (*r* = -0.24, *P* = 0.003; Figure 4). The percentage of change in BNP was also positively correlated with the percentage of change in LVMI (*r* = 0.19, *P* = 0.02).

Discussion

Our study confirms the high incidence of vitamin D deficiency or insufficiency in HD patients and the apparently safety and efficacy of oral supplementation with native vitamin D. Patients with stage 5 CKD lack the capacity of the kidney to perform 1 α -hydroxylation, thereby making it impossible to produce the necessary amount of 1,25(OH)₂D. Studies have also described the presence of a phosphaturic bone protein fibroblast growth factor 23 that is elevated in patients with CKD and may amplify the inhibition of renal 1 α -hydroxylase (11,21); however, extrarenal production of 1,25(OH)₂D in anephric patients has been reported (22). Also, it was recently described that calcitriol levels in HD patients increased after 6 months of supplementation with 25(OH)D (23).

The expression of 1 α -hydroxylase was also reported in other organs, such as the parathyroids, pancreas, adrenal medulla, endothelium, smooth vascular cells, skin, and cerebellum (11,24). This may indicate an autocrine/paracrine function of this enzyme in the control of cell proliferation and differentiation (25).

In our study, as already described in other studies, older patients and patients with diabetes showed lower levels of 25(OH)D. Elderly patients have reduced sun exposure as a result of poor health and immobility and have reduced ingestion of natural sources of vitamin D, and dermal synthesis of vitamin D is reduced with increasing age (26,27). In this study, lower levels of 1,25(OH)₂D were also present in patients with diabetes, probably reflecting lower production of the substrate. It is interesting that, as we found previously (15), patients who were receiving paricalcitol therapy showed lower levels of 1,25(OH)₂D. The exact reason for this is not completely known, but vitamin D₂ activates the catabolism of 1,25(OH)₂D through

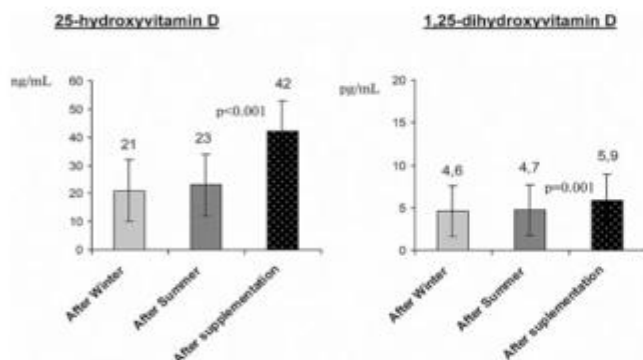


Figure 1. 25(OH)D and 1,25(OH)₂D serum values after winter, after summer, and after cholecalciferol supplementation.

Table 1. Clinical, biochemical, and echocardiographic parameters before and after supplementation

Parameter	Before Supplementation	After Supplementation	P
25(OH)D (ng/ml; mean \pm SD)	22.3 \pm 12.0	42.0 \pm 12.1	<0.001
1,25(OH) ₂ D (pg/ml)	4.6	5.9	0.001
Ca (mg/dl; mean \pm SD)	8.6 \pm 0.8	8.4 \pm 0.7	0.014
P (mg/dl; mean \pm SD)	4.7 \pm 1.3	4.5 \pm 1.3	0.011
iPTH (pg/ml)	233	208	<0.001
bAP (μ g/L)	18.6	18.0	NS
Hemoglobin (g/dl; mean \pm SD)	12.1 \pm 1.2	11.9 \pm 1.4	NS
Ferritin (mg/dl; mean \pm SD)	438 \pm 182	431 \pm 196	NS
Albumin (g/dl; mean \pm SD)	3.9 \pm 0.5	4.2 \pm 0.4	<0.001
CRP (mg/dl)	0.4	0.2	0.004
BNP (pg/ml)	338	296	0.008
eKt/V (mean \pm SD)	1.4 \pm 0.2	1.4 \pm 0.3	NS
nPCR (g/kg per d; mean \pm SD)	1.24 \pm 0.50	1.23 \pm 0.60	NS
Paricalcitol (%)	44	33	<0.001
Paricalcitol dosage (μ g/wk; mean \pm SD)	7.2 \pm 4.5	6.0 \pm 4.1	<0.001
Sevelamer (%)	66	48	<0.001
Sevelamer dosage (mg/d; mean \pm SD)	3738 \pm 1761	3284 \pm 1391	
Darbepoietin (%)	91	89	NS
Darbepoietin dosage (μ g/kg per wk per g/dl)	0.042	0.033	0.013
Antihypertensive therapy (%)	71	69	NS
ACEIs (%)	43	44	NS
ARBs (%)	9	7	NS
Statins (%)	18	19	NS
SBP (mmHg; mean \pm SD)	132 \pm 21	129 \pm 23	NS
DBP (mmHg; mean \pm SD)	64 \pm 16	63 \pm 15	NS
PP (mmHg; mean \pm SD)	69 \pm 15	68 \pm 17	NS
Interdialytic weight gain (ml; mean \pm SD)	1647 \pm 968	1662 \pm 897	NS
Dry weight (kg; mean \pm SD)	66.3 \pm 13.1	65.7 \pm 12.8	NS
LVMI (g/m ² ; mean \pm SD)	134 \pm 31	121 \pm 32	0.01

bAP, bone alkaline phosphatase; nPCR, normalized protein catabolic rate.

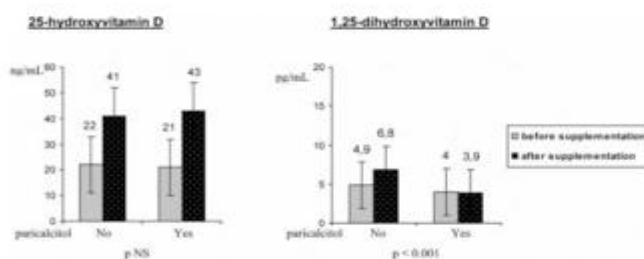


Figure 3. 25(OH)D and 1,25(OH)₂D serum levels before and after supplementation in patients without and with paricalcitol therapy.

the activation of 24-hydroxylase (28). Although this enzyme acts in 25(OH)D and 1,25(OH)₂D, it has a 10-fold higher affinity for the latter molecule (29). Another hypothesis is that because paricalcitol acts *in vivo* as an active vitamin D, the target cell might downregulate the production of 1,25(OH)₂D.

An *in vitro* study also reported that 25(OH)D may directly activate the vitamin D receptor in the parathyroid gland, inde-

pendent of 1,25(OH)₂D, contributing to the control of secondary hyperparathyroidism (30). Our study shows a decrease in Ca and P and an improvement in hyperparathyroidism control after cholecalciferol supplementation. This reduction in serum Ca and P was more significant than the reduction seen in iPTH and was independent of paricalcitol therapy, because patients who never used this medication also showed this reduction. The observed increase in serum albumin may also have contributed to the decrease in Ca levels. The active vitamin D therapeutic dosage was also significantly reduced and might contribute to a less calcemic and phosphoremic action seen at the end of the study. Conversely, lower Ca and P are potent stimulus of 1 α -hydroxylase (11,24,25), and that could explain some of the increase in 1,25(OH)₂D levels.

The role of vitamin D metabolism has also been involved in the improvement of erythropoiesis by a direct effect on erythroid precursor proliferation (31) and/or, marginally, by controlling secondary hyperparathyroidism (32). In our study, the dosage of the erythroid-stimulating agent was reduced, with no modification of hemoglobin values.

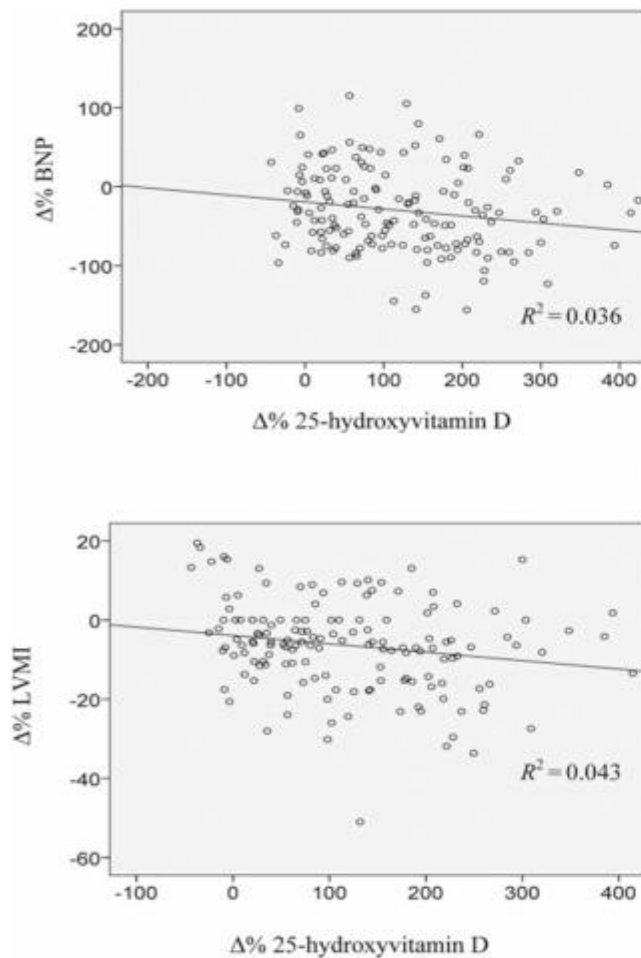


Figure 4. Correlations between the percentage of change in 25(OH)D and the percentage of change in BNP and LVMI with cholecalciferol supplementation.

Several studies have shown that vitamin D has numerous important nonclassic actions, including a protective role in innate immunity (33), antiatherosclerotic effects, and normalization of inflammatory reactions (10,11,14). Low vitamin D levels were also associated with decreased pulmonary function test results, increased PP, congestive heart failure, and increased carotid intima-media thickness (25,34). Our study, like others (35,36), indicates a reduction in the inflammatory parameters, with an increase in albumin and a reduction in CRP. This could reflect 25(OH)D as another marker of inflammation or represent the already described immunomodulator and anti-inflammatory actions of this hormone.

Dialysis patients have increased cardiovascular morbidity and mortality (37). BNP plasma levels have been shown to be a good cardiovascular risk marker in the general population as well as in patients with CKD (38,39). Plasma BNP is synthesized mainly in cardiomyocytes in response to ventricular stretch and pressure overload (40), but it may also result from concomitant coronary artery disease or left ventricular dysfunction (41).

Studies have indicated that the degree of BNP elevation in patients with CKD may predict left ventricular function and future cardiac events (40–42). In a previous study (18), we also found an increase in cardiovascular morbidity and mortality in HD patients with higher BNP plasma levels. In this study, as reported in other studies, mean BNP plasma levels were high (compared with the general population) as a result of renal failure and in some patients simultaneous cardiac disease, but its levels were significantly decreased after cholecalciferol supplementation.

Vitamin D is also important in the regulation of BP through inhibition of the renin-angiotensin pathway (42), and lower circulating vitamin D levels correlated with increased BP and LVMI (15,43). Our study has shown that the correction of vitamin D deficiency with vitamin D precursors, namely cholecalciferol, can decrease LVMI. This reduction in BNP plasma levels and LVMI with supplementation was independent of PP and of the use of antihypertensive therapy, namely ACEIs and ARBs, and statins.

The main limitation of this study is the absence of a control group. Because the general care and therapeutic approach to these patients did not change during the study, the results were assumed to be due to cholecalciferol supplementation. Other limitations are the short duration of cholecalciferol supplementation, the small number of patients studied, and some drawbacks of echocardiography in evaluating LVMI.

Conclusions

Cholecalciferol supplementation corrected vitamin D deficiency without evident toxicity. It increased mineral metabolism control with less use of active vitamin D, decreased inflammatory parameters with reduction of erythropoiesis-stimulating agent consumption, and improved cardiac dysfunction (reflected by lower BNP levels and decreased LVMI). These effects may be related to the direct action of 25(OH)D on target cells and/or to persistent renal or extrarenal 1α -hydroxylation.

This supplementation was simple, apparently safe, and cost-effective. More important, it seems to be a treatment that positively affects surrogate markers and may potentially improve clinical outcomes. On the basis of this study, we propose cholecalciferol supplementation for patients with stage 5D CKD, although the effects on morbidity and mortality still need to be confirmed in randomized, controlled, and longer follow-up studies.

Disclosures

None.

References

- Gonzalez EA, Sachdeva A, Oliver DA, Martin KJ: Vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease: A single center observational study. *Am J Nephrol* 24: 503–510, 2004
- LaClair RE, Hellman RN, Karp SL, Kraus M, Ofner S, Li Q, Graves KL, Moe SM: Prevalence of calcidiol deficiency in

- CKD: A cross-sectional study across latitudes in the United States. *Am J Kidney Dis* 45: 1026-1033, 2005
3. Ishimura E, Nishizawa Y, Inaba M, Matsumoto N, Emoto M, Kawagishi T, Shoji S, Okuno S, Kim M, Miki T, Morii H: Serum levels of 1,25-dihydroxyvitamin D, 24,25-dihydroxyvitamin D, and 25-hydroxyvitamin D in nondialysed patients with chronic renal failure. *Kidney Int* 55: 1019-1027, 1999
 4. Goodman WG, Coburn JW: The use of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in early renal failure. *Annu Rev Med* 43: 227-237, 1992
 5. Schroeder NJ, Cunningham J: What's new in vitamin D for the nephrologist? *Nephrol Dial Transplant* 15: 460-466, 2000
 6. Slatopolsky E, Weerts C, Thielan J, Horst R, Harter H, Martin KJ: Marked suppression of secondary hyperparathyroidism by intravenous administration of 1,25-dihydroxy-cholecalciferol in uremic patients. *J Clin Invest* 74: 2136-2143, 1984
 7. Gomez-Alonso C, Naves-Diaz ML, Fernandez-Martin JL, Diaz-Lopez JB, Fernandez-Coto MT, Cannata-Andia JB: Vitamin D status and secondary hyperparathyroidism: The importance of 25-hydroxyvitamin D cut-off levels. *Kidney Int Suppl* S44-S48, 2003
 8. Lagunova Z, Porojnicu AC, Lindberg F, Hexeberg S, Moan J: The dependency of vitamin D status on body mass index, gender, age and season. *Anticancer Res* 29: 3713-3720, 2009
 9. Holick MF: Vitamin D: Importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 79: 362-371, 2004
 10. Andress DL: Vitamin D in chronic kidney disease: A systemic role for selective vitamin D receptor activation. *Kidney Int* 69: 33-43, 2006
 11. Jones G: Expanding role for vitamin D in chronic kidney disease: Importance of blood 25-OH-D levels and extrarenal 1 α -hydroxylase in the classical and non-classical actions of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Semin Dial* 20: 316-324, 2007
 12. Kristal-Boneh E, Fromm P, Harari G, Ribak J: Association of calcitriol and blood pressure in normotensive men. *Hypertension* 30: 1289-1294, 1997
 13. Zittermann A, Schleithoff SS, Tenderich G, Berthold HK, Korfer R, Stehle P: Low vitamin D status: A contributing factor in the pathogenesis of congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 41: 105-112, 2003
 14. London GM, Guérin AP, Verbeke FH, Pannier B, Boutouyrie P, Marchais SJ, Métivier F: Mineral metabolism and arterial functions in end-stage renal disease: Potential role of 25-hydroxyvitamin D deficiency. *J Am Soc Nephrol* 18: 613-620, 2007
 15. Matias PJ, Ferreira C, Jorge C, Borges M, Aires I, Amaral T, Gil C, Cortez J, Ferreira A: 25-Hydroxyvitamin D₃, arterial calcifications and cardiovascular risk markers in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 24: 611-618, 2009
 16. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group: KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl* S1-S130, 2009
 17. Bushinsky DA, Monk RD: Electrolyte quintet: Calcium. *Lancet* 352: 306-311, 1998
 18. Matias P, Jorge C, Aires I, Lage H, Gil C, Gomes F, Arranhado E, Ferreira A: Brain natriuretic peptide levels predict morbidity and mortality in haemodialysis patients. *Port J Nephrol Hypertens* 23: 249-255, 2009
 19. Devereux RB, Alonzo DR, Lutas EM, Gottlieb GJ, Campo E, Sachs I, Reichel N: Echocardiographic assessment of left ventricular hypertrophy: Comparison to necropsy findings. *Am J Cardiol* 57: 450-458, 1986
 20. Hollis BW: Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: Implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J Nutr* 135: 317-322, 2005
 21. Sato T: Renal bioactivation of vitamin D and its key modulators. *Clin Calcium* 17: 686-690, 2007
 22. Lambert PW, Stern PH, Avioli RC, Brackett NC, Turner RT, Greene A, Fu IY, Bell NH: Evidence for extrarenal production of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D in man. *J Clin Invest* 69: 722-725, 1982
 23. Jean G, Terrat JC, Vanel T, Hurot JM, Lorriaux C, Mayor B, Chazot C: Evidence for persistent vitamin d 1-alpha-hydroxylation in hemodialysis patients: Evolution of serum 1,25-dihydroxycholecalciferol after 6 months of 25-hydroxycholecalciferol treatment. *Nephron Clin Pract* 110: c58-c65, 2008
 24. Dusso AS, Finch J, Brown A, Ritter C, Delmez J, Schreiner G, Slatopolsky E: Extrarenal production of calcitriol in normal and uremic humans. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 157-164, 1991
 25. Hewison M, Zehnder D, Bland R, Stewart PM: 1 α -Hydroxylase and the action of vitamin D. *J Mol Endocrinol* 25: 141-148, 2000
 26. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E: Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F8-F28, 2005
 27. Mosekilde L: Vitamin D and the elderly. *Clin Endocrinol (Oxf)* 62: 265-281, 2005
 28. Lips P: Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 92: 4-8, 2006
 29. Jones G, Vrietzen D, Lohnes D, Palda V, Edwards NS: Side-chain hydroxylation of vitamin D₃ and its physiological implications. *Steroids* 49: 29-53, 1987
 30. Makin G, Lohnes D, Byford V, Ray R, Jones G: Target cell metabolism of 1,25-(OH)₂D₃ to calcitric acid: Evidence for a pathway in kidney and bone involving 24-oxidation. *Biochem J* 262: 173-180, 1989
 31. Ritter CS, Armbricht HJ, Slatopolsky E, Brown AJ: 25-Hydroxyvitamin D₃ suppresses PTH synthesis and secretion by bovine parathyroid cells. *Kidney Int* 70: 654-659, 2006
 32. Aucella F, Scalzulli RP, Gatta G, Vigilante M, Carella AM, Stallone C: Calcitriol increases burst-forming unit-erythroid proliferation in chronic renal failure: A synergistic effect with r-HuEpo. *Nephron Clin Pract* 95: c121-c127, 2003
 33. Mathieu C, Jafari M: Immunomodulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: Therapeutic implications in hemodialysis and renal transplantation. *Clin Nephrol* 66: 275-283, 2006
 34. Seibert E, Levin NW, Kuhlmann MK: Immunomodulating effects of vitamin D analogs in hemodialysis patients. *Hemodial Int* 9[Suppl 1]: S25-S29, 2005
 35. Targher G, Bertolini L, Padovani R, Zenari L, Scala L, Cigolini M, Arcaro G: Serum 25-hydroxyvitamin D₃ concentrations and carotid artery intima-media thickness among type 2 diabetic patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 65: 593-597, 2006

36. Jean G, Terrat JC, Vanel T, Hurot JM, Lorriaux C, Mayor B, Chazot C: Daily oral 25-hydroxycholecalciferol supplementation for vitamin d deficiency in haemodialysis patients: Effects on mineral metabolism and bone markers. *Nephrol Dial Transplant* 23: 3670–3676, 2008
37. Saab G, Young DO, Gincherman Y, Giles K, Norwood K, Coyne DW: Prevalence of vitamin D deficiency and the safety and effectiveness of monthly ergocalciferol in hemodialysis patients. *Nephron Clin Pract* 105: c132–c138, 2007
38. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ: Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 32[Suppl 3]: S112–S119, 1998
39. Racek J, Králová H, Trefil L, Rajdl D, Eiselt J: Brain natriuretic peptide and N-terminal proBNP in chronic haemodialysis patients. *Nephron Clin Pract* 103: c162–c172, 2006
40. Zeng C, Wei T, Jin L, Wang L: Value of B-type natriuretic peptide in diagnosing left ventricular dysfunction in dialysis-dependent patients. *Intern Med J* 36: 552–557, 2006
41. Levin ER, Gardner DG, Samson WK: Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 339: 321–328, 1998
42. Nitta K, Kawashima A, Yumura W, Naruse M, Oba T, Kabaya T, Nihei H: Plasma concentration of brain natriuretic peptide as an indicator of cardiac ventricular function in patients on hemodialysis. *Am J Nephrol* 18: 411–415, 1998
43. Li YC, Qiao G, Uskokovic M, Xiang W, Zheng W, Kong J: Vitamin D: A negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system and blood pressure. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89: 387–392, 2004
44. Lind L, Hanni A, Lithell H, Hvarfner A, Sorensen OH, Ljunghall S: Vitamin D is related to blood pressure and other cardiovascular risk factors in middle-age men. *Am J Hypertens* 8: 894–901, 1995

6.7 Bibliografia capítulo 6

1. *Vitamin D*. **Dusso,A.S.; Brown A.J.;Slatopolsky E.;** 2005, Am J Physiol Renal Physiol, Vol. 289, pp. F8-F28.
2. *Vitamin D and the kidney*. **Holick, M.F.** 1983, Kidney Int, Vol. 23, pp. 699-674.
3. *Vitamin D receptor-independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism*. **Shimada, T; Yamazaki, Y; Takahashi, M; et,al.;** 5, 2005, Am J OF Physiol Renal Physiol 289, Vol. 289, pp. F1088-F1095.
4. *Fibroblast Growth Factor 23 and disordered vitamin Dmetabolism in chronic kidney disease: updating the "trade-off" hypothesis*. **Gutiérrez,O.M.;** 2010, Clin J Am Soc Nephrol, Vol. 5, pp. 1710-1716.
5. *Reciprocal control of 1,25-Dihydroxyvitamin D and FGF23 formation involving the FGF23/Klotho system*. **Prié,D.; Friedlander,G.;** 2010, Clin J Am Soc Nephrol, Vol. 5, pp. 1717-1722. Aborda as relações entre o FGF 23 a Klotho e a vitamina D activa e inactiva. Boa revisão destas alíneas.
6. *Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease*. **Isakova,T.; Wahl,P.; Vargas,G.S.; et,al.** 2011, Kidney Int.
7. *Vitamin D: Importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease and osteoporosis*. **Holick, M F.** 2004, Am J Clin Nutric, Vol. 79, pp. 362-371.
8. *Ressurrection of vitamin D deficiency and rickets*. **Holick M F;** 2006, J Clin Invest, Vol. 116, pp. 2062-2072.
9. *New vitamin D analogs and changing therapeutic paradigms*. **Cunningham,J.; Zehnder,D.** 2011, Kidney Int, Vol. 79, pp. 702-707.
10. *Evidence for extrarenal production of 1-alpha, 25-dihydroxyvitamin D in man*. **Lambert,P.W.; Stern,P.H.; Avioli,R.C.; et,al.** 1982, J Clin Invest, Vol. 69, pp. 722-725.
11. *Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3*. **Penna, G.;** **Roncari, A., Armuchastegui, S.; et,al.** 106, 2005, Blood, pp. 340-3497.
12. *Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response*. **Liu,P.T.; Stenger,S.; Li,H.; et,al.** 311, 2006, Science, pp. 1770-1773.
13. *Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system*. **Li, Y.C.;** 88, 2003, J Cell Biochem, pp. 327-331.

14. *Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction.* **Chiu, K.C.; Chu, A.; Go, V.L.W.; Saad, M.F.** 79, 2004, Am J Clin Nutr, pp. 820-825.
15. *Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease.* **Ziternann, A.,** . 92, 2006, Prog Biophys Mol Biol , pp. 39-48.
16. *Vitamin D and prevention of colorectal cancer.* **Gorham, E.D.; Garland, C.F.; Garland, F.C.; et.al.** 97, 2005, J Steroid Biochem Mol Biol, pp. 17-194.
17. *Fighting infections with vitamin D.* **Zasloff, M.;** 12, 2006, Nature Medicine, pp. 388-390.
18. *Extra-renal production of calcitriol in chronic renal failure.* **Dusso, A.; Lopez-Hilker, S.; Rapp, N.; Slatopolsky, E.** 1998, Kidney Int, Vol. 34, pp. 368-375.
19. Dec 24 de 2007, Time Magazine, US Edition, Vol. 26, p. 170.
20. *Expanding role for vitamin D in chronic kidney disease: importance of blood 25-OH-D levels and extra-renal 1-alpha-hydroxylase in the classical and non-classical actions of 1-alpha, 25-dihydroxyvitamin D3.* **Jones, G.;** 20, 2007, Semin Dial, pp. 316-324.
21. *Extra-renal 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in human health and disease.* **Hewison, M.; Burke, F.; Evans, K.N.; et.al.** 20, 2007, J Steroid Biochem Mol Biol , pp. 316-324.
22. *Serum 25 (OH)-vitamin D and bone metabolism in patients in maintenance hemodialysis.* **Mucsi, I.; Almasi, C.; Deak, G.; et.al.** 2005, Clin Nephrol, Vol. 64, pp. 288-294.
23. *Prevalence of 25(OH) vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease stage 5 patients on hemodialysis.* **Del Valle, E.; Negri, A.L.; Aguirre, C.; Fradinger, E.; Zanchetta, J.R.** 2007, Hemodial Int, Vol. 11, pp. 315-321.
24. *Vitamin D status of chronic kidney disease patients living in a sunny country.* **Cuppari, L.; Carvalho, A.B.; Draibe, S.A.** 5, 2008, J Ren Nutr, Vol. 18, pp. 408-414.
25. *25-hydroxyvitamin D3, arterial calcifications and cardiovascular risk markers in haemodialysis patients.* **Matias, P.J.; Ferreira, C.; Jorge, C.; Borges, M.; Aires, I.; Amaral, T.; Gil, C.; Cortez, J.; Ferreira, A.** 24, 2009, Nephrol Dial Transplant, pp. 611-618.
26. *Cholecalciferol supplementation in hemodialysis patients: effects on mineral metabolism, inflammation, and cardiac dimension parameters.* **Matias, P.J.; Jorge, C.; Ferreira, C.; Borges, M.; Aires, I.; Amaral, T.; Gil, C.; Cortez, J.; Ferreira, A.** 5, 2010, Clin J Am Soc Nephrol, pp. 905-911.
27. *Vitamin D supplementation in chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies and randomized controlled trials.* **Kandula, P.;**

Dobre,M.; Shold,J.D.; Schreiber Jr,M.J.; Mehrotra,R.; Navaneethan,S.D. s.l. : Clin J Am Soc Nephrol, 2011, Vol. 6, pp. 50-62.

28. *Overview of general physiologic features and functions of vitamin D.*

DeLuca,H.F.; 2004, Am J Clin Nutr, Vol. 80, pp. (S)1689-(S)1696.

29. *Vitamin D deficiency.* **Holick,M.F.;** 2007, N Engl J Med, Vol. 357, pp. 266-281.

30. *KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention and treatment of chronic kidney disease - mineral and bone disorder (CKD-MBD).* Suppl 113, 2009, Kidney Int, Vol. 76, pp. S1-S130.

31. *Improved radioimmunoassay for vitamin D and its use in assessing vitamin D state.* **Hollis,B.W.; Napoli,J.L.;** 1985, Clin Chem, Vol. 31, pp. 1815-1819.

32. *The determination of circulating 25-hydroxyvitamin D: no easy task.* **Hollis,B.W.;** 2004, J Clin Endocrinol Metab, Vol. 89, pp. 3149-3151.

33. *Analytical and clinical validation of the 25-OH vitamin D assay for the LIAISON automated analyze.* **Ersfeld,D.L.; Rao,D.S.; Body,J.J.; et,al.** 2004, Clin Biochem, Vol. 37, pp. 867-874.

34. *Blood biomarkers of vitamin D status.* **Zerwekh,J.E.** 2008, Am J Clin Nutr, Vol. 87, pp. 1087S-1091S.

35. *Vitamin D deficiency: a neglected aspect of disturbed calcium metabolism in renal failure.* **Cannata-Andía,J.; Alonso,C.G.** 2002, Nephrol Dial Transplant, Vol. 17, pp. 1875-1878.

36. *Estimates of optimal vitamin D status.* **Dawson-Hughes,B.; Heaney,R.P.; Holick,M.F.; Lips,P.; Meunier,P.J.; Vieth,R.** 2005, Osteoporos Int, Vol. 16, pp. 713-716.

37. *The dependency of vitamin D status on body mass index, gender, age and season.* **Lagunova,Z.; Porojnicu,A.C.; Lindberg,F.; Hexeberg,S.; Moan,J.** 9, 2009, Anticancer Res, Vol. 29, pp. 3713-3720.

38. *Solar Radiation, Vitamin D and Cancer Incidence and Mortality in Norway .* **Dahlback,A.; Lagunova,Z.; Cicarma,E; Porojnicu,A.C.** 9, 2009, Anticancer Res, Vol. 29, pp. 3501-3509.

39. *Vitamin D status and secondary hyperparathyroidism: the importance of 25-hydroxyvitamin D cut-off levels.* **Gomez-Alonso,C.; Naves-Diaz,M.L.; Fernandez-Martin,J.L.; et,al.** 2003, Kidney Int, Vol. 85, pp. S44-S48.

40. *Phosphate and FGF-23.* **Jüppner,H.;** Suppl 121, 2011, Kidney Int, Vol. 79, pp. S24-S27.

41. *Fibroblast growth factor-23 is regulated by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D.* **Collins,M.T.; Lindsay,J.R.; Jain,A.; Kelly,M.H.; Cutler,C.M.; Weinstein,L.S.; Liu,J.; Fedarko,N.S.; Winer,K.K.** 2005, *J Bone Miner Res*, Vol. 20, pp. 1944-1950.
42. *Side-chain hydroxylation of vitamin D3 and its physiological implications .* **Jones,G.; Vriezen,D.; Lohnes,D.; Palda,V; Edwards,N.S.** 1987, *Steroids*, Vol. 29, pp. 49-53.
43. *Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease.* **Gutierrez,O.; Isakova,T.; Rhee,E.; et,al. .** 2005, *J Am Soc Nephrol*, Vol. 16, pp. 2205-2215.
44. *Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D.* **Liu,S.; Tang,W.; Zhou,J.; et,al.** 2006, *J Am Soc Nephrol*, Vol. 17, pp. 1305-1315.
45. *Phosphate and klotho.* **Kuro-o,M.;** Suppl 121, 2011, *Kidney Int*, Vol. 79, pp. S20-S23.
46. *Overview of the FGF23 - Klotho axis.* **Kuro-o,M.;** 2010, *Pediatr Nephrol*, Vol. 25, pp. 583-590.
47. *The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats.* **Ben-Dov,I.Z.; Galitzer,H.; Lavi-Moshayoff,V.; et,al.** 2007, *J Clin Invest*, Vol. 117, pp. 4003-4008.
48. *Severely reduced production of klotho in human chronic renal failure kidney.* **Koh,N.; Fujimori,T.; Nishiguchi,S; et,al.** 2001, *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 280, pp. 1015-1020.
49. *Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands.* **Nagpal,S.; Na,S.; Rathnachalam,R.** 5, 2005, *Endocr Rev*, Vol. 26, pp. 662-687.
50. *1 α -Hydroxylase and the action of vitamin D.* **Hewison,M.; Zehnder,D.; Bland,R.; Stewart,P.M.** 2000, *J Mol Endocrinol*, Vol. 25, pp. 141-148.
51. *Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application.* **Holick,M.F.** [ed.] 78. 2009, *Ann Epidemiol*, Vol. 19, p. 73.
52. *25-hydroxyvitamin D levels and bone histomorphometry in hemodialysis renal osteodystrophy.* **Coen,G; Mantella,D.; Manni,M.; Balducci,A.; Nofroni,I.; Sardella,D.; Ballanti,P.; Bonucci,E.** 68 : s.n., 2005, *Kidney Int*, pp. 1840-1849.
53. *Renal function and 25-hydroxyvitamin D concentrations predict parathyroid hormone levels in renal transplant patients.* **Boudville,N.C.; Hodsman,A.B.** 2006, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 21, pp. 2621-2624.
54. *Paricalcitol reduces albuminuria and inflammation in chronic kidney disease - A randomized double-blind pilot trial .* **Alborzi,P.; Patel,N.A.; Peterson,C.; et,al. 2,** 2008, *Hypertension*, Vol. 52, pp. 249-255.

55. *Oral paricalcitol in the treatment of patients with CKD and proteinuria: a randomized trial.* **Fishbane,S.; Chitineni,H.; Packman,M.; Dutka,P.; Ali,N.; Durie,N.** 4, 2009, Am J Kidney Dis, Vol. 54, pp. 647-652.
56. *Selective vitamin D receptor activation with paricalcitol for reduction of albuminuria in patients with type 2 diabetes (VITAL study): a randomised controlled trial.* **de Zeeuw,D.; Agarwal,R.; Amdahl,M; et,al.** 2010, Lancet, Vol. 376, pp. 1543-1551.
57. *Fighting infections with vitamin D.* **Zasloff,M.;** 2006, Nature Medicine, Vol. 12, pp. 388-390.
58. *Cutting edge: vitamin D-mediated human antimicrobial activity against Mycobacterium tuberculosis is dependent on the induction of cathelicidin.* **Liu,P.T.; Stenger,S.; Tang,D.H.; et,al.** 2007, J Immunol, Vol. 179, pp. 2060-2063.
59. *Vitamin D and the elderly.* **Mosekilde,L.** 2005, Clin Endocrinol (Oxf), Vol. 62, pp. 265-281.
60. *1,25-dihydroxyvitamin D3 corrects insulin and lipid abnormalities in uremia.* **Mak,R.H.** 1998, Kidney Int, Vol. 53, pp. 1353-1357.
61. *Calcium plus vitamin D and the risk of colorectal cancer.* 2006, N Engl J Med, Vol. 354, pp. 2287-2288.
62. *Plasma vitamin D metabolites and risk of colorectal cancer in women.* **Feskanich,D; Ma,J.; Fuchs,C.S.; et,al.** 2004, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, Vol. 13, pp. 1502-1508.
63. *1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits angiogenesis in vitro and in vivo.* **Mantell,D.J.; Owens,P.E.; Bundred,N.J.; Mawer,E.B.; Canfield,A.E.** 2000, Cir Res, Vol. 87, pp. 214-220.
64. *High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health.* **Holick,M.F.** 2006, Mayo Clin Proc, Vol. 81, pp. 353-373.
65. *Redefining vitamin D insufficiency.* **Malabanan,A.; Veronikis,I.E.; Holick,M.F.** 1998, Lancet, Vol. 351, pp. 805-806.
66. *Hypovitaminosis D in medical inpatients.* **Thomas,K.K.; Lloyd-Jones,D.M.; Thadhani,R.I.; et,al.** 1998, N Engl J Med, Vol. 338, pp. 777-783.
67. *Prevalence of vitamin D inadequacy among postmenopausal North American women receiving osteoporosis therapy.* **Holick,M.F.; Siris,M.F.; Binkley,N.; et,al.** 2005, J Clin Endocrinol Metab, Vol. 90, pp. 3215-3224.
68. *Vitamin D status and cancer: new insights.* **Schwartz,G.G.;Skinner,H.G.;** 2007, Curr Opin Clin Nutr Metab Care , Vol. 10, pp. 6-11.

69. *The role of vitamin D in cancer prevention.* **Garland,C.F.; Garland,F.C.; Gorham,E.D.; et,al.** 2006, Am J Public Health, Vol. 96, pp. 252-261.
70. *Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men.* **Giovannucci,E.; Liu,Y.; Rimm,E.B.; et,al.** 2006, J Natl Cancer Inst, Vol. 98, pp. 451-459.
71. *Calcium plus vitamin D and the risk of colorectal cancer.* **Holick,M.F.** 2006, N Eng J Med, Vol. 354, pp. 2287-2288.
72. *Prevalence of calcidol deficiency in CKD: A cross-sectional study across latitudes in the United States.* **LaClair,R.E.; Helman,R.N.; Karp,S.L.; et,al.** 2005, Am J Kidney Dis, Vol. 45, pp. 1026-1033.
73. *Vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease. A single center observational study.* **Gonzalez,E.A.; Sachdeva,A.; Oliver,D.A.; et,al.** [ed.] 510. 2004, Am J Nephrol, Vol. 24, p. 503.
74. *Impaired vitamin D metabolism and response in spontaneously diabetic GK rats.* **Ishimura,E.; Nishizawa,Y.; Koyama,H.** 1995, Miner Electrolyte Metab, Vol. 21, pp. 205-210.
75. *Calcium and vitamin D homeostasis in patients with heavy proteinuria.* **Saha,H.** 1994, Clin Nephrol, Vol. 41, pp. 290-296.
76. *Serum levels of 1,25-dihydroxyvitamin D, 24,25-dihydroxyvitamin D, and 25-hydroxyvitamin D in nondialysed patients with chronic renal failure.* **Ishimura,E.; Nishizawa,Y.; Inaba,M.** 1999, Kidney Int, Vol. 55, pp. 1019-1027.
77. *Reduced hepatic synthesis of calcidiol in uremia.* **Michaud,J.; Naud,J.; Ouimet,D.; et,al.;** . 2010, J Am Soc Nephrol, Vol. 21, pp. 1488-1497.
78. *Hypovitaminosis D Is Associated with Systemic Inflammation and Concentric Myocardial Geometric Pattern in Hemodialysis Patients with Low iPTH Levels.* **Bucharles,S; Barberato,S.H.; Stinghen,A.E.; et,al.** 4, 2011, Nephron Clin Pract, Vol. 118, pp. 384-391.
79. *25-hydroxyvitamin D deficiency and inflammation and their association with hemoglobin levels in chronic kidney disease.* **Kendrick,J.; Targher,G; Smits,G.; Chonchol,M.** 2009, Am J Nephrol, Vol. 30, pp. 64-72.
80. *Circulation calcitriol concentrations and total mortality.* **Zittermann,W.; Schleithoff,S.S.; Frisch,S.; et,al.** 2009, Clin Chem, Vol. 55, pp. 1163-1170.
81. *Ultraviolet light may contribute to geographic and racial blood pressure differences.* **Rostand,S.G.;** 1997, Hypertension, Vol. 30, pp. 150-156.
82. *Ultraviolet B and blood pressure.* **Krause,R.; Bühring,M.; Hopfenmüller,W.; Holick,M.F.; Sharma,A.M.** 1998, Lancet, Vol. 352, pp. 709-710.

83. *1,25-dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system.* **Li,Y.C.; Kong,J.; Wei,M.; Chen,Z.F.; Liu,S.Q.; Cao,L.P.** 2002, *J Clin Invest*, Vol. 110, pp. 229-238.
84. *Myocardial infarction is inversely associated with plasma 25-hydroxyvitamin D3 levels: a community-based study.* **Scragg,R.; Jackson,R.; Holdaway,I.M.** 1990, *Int J Epidemiol*, Vol. 19, pp. 559-563.
85. *Vitamin D deficiency and myocardial diseases.* **Pilz,S.; Tomaschitz,A.; Drechsler,C.; Dekker,J.M.; März,W.** 8, 2010, *Mol Nut Food Res*, Vol. 54, pp. 1103-1113.
86. *Role of vitamin D receptor activators on cardiovascular risk.* **Valdivielso,J.M.; Ayus,J.C.** Supp 111, 2008, *Kidney Int*, Vol. 74, pp. S44-S49.
87. *Vitamin D deficiency an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor?* **Lee,J.H.; O'Keefe,J.H.; Bell,D.; Hensrud,D.D.; Holick,M.F.** 2008, *J Am Coll Cardiol*, Vol. 52, pp. 1949-1956.
88. *Clinical and echocardiographic disease in patients starting end-stage renal disease therapy.* **Foley,R.N.; Parfrey,P.S.; Harnett,J.D.; et,al.** 1995, *Kidney Int*, Vol. 47, pp. 186-192.
89. *Left ventricular hypertrophy in nondiabetic predialysis CKD.* **Paoletti,E.; Bellino,D.; Cassottana,P.** 2, 2005, *Am J Kidney Dis*, Vol. 46, pp. 320-327.
90. *The role of vitamin D in left ventricular hypertrophy and cardiac function.* **Achinger,S.G.; Ayus,J.C.** Supp 95, 2005, *Kidney Int*, Vol. 67, pp. S37-S42.
91. *Association between 25-hydroxyvitamin D deficiency and cardiovascular disease in type 2 diabetic patients with mild kidney dysfunction.* **Chonchol,M.; Cigoloni,M; Targher,G.** 1, 2008, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 23, pp. 269-274.
92. *Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease.* **Wang,T.J.; Pencina,M.J.; Booth,S.L.; et,al.** [ed.] 511. 2008, *Circulation*, Vol. 117, p. 503.
93. *Mineral metabolism and arterial functions in end stage renal disease: Potencial role of 25-hydroxyvitamin D deficiency.* **London,G.M.; Guérin,A.P.; Verbeke,F.H.; et,al.** 2007, *J Am Soc Nephrol*, Vol. 18, pp. 613-620.
94. *A simple vascular calcification score predicts cardiovascular risk in haemodialysis patients.* **Adragão,T.; Pires,A.; Lucas,C.; et,al.** 2004, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 19, pp. 1480-1488.
95. *Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension.* **Koren,M.J.; Devereux,R.B.; Casale,P.N.; et,al.** 1991, *Ann Intern Med*, Vol. 114, pp. 345-352.

96. *Left ventricular mass monitoring in the follow-up of dialysis patients: prognostic value of left ventricular hypertrophy progression.* **Zoccali,C; Benedetto,F.A.; Mallama,F; et,al.** 2004, *Kidney Int*, Vol. 65, pp. 1492-1498.
97. *Value of B-type natriuretic peptide in diagnosing left ventricular dysfunction in dialysis-dependent patients.* **Zeng,C; Wei,T; Jin,L; et,al.** 2006, *Intern Med J*, Vol. 36, pp. 552-557.
98. *Brain natriuretic peptide and N-terminal proBNP in chronic haemodialysis patients.* **Racek,J; Králová,H; Trfil,L; et,al.** 2006, *Nephron Clin Pract*, Vol. 103, pp. c162-c172.
99. *Plasma concentrations of brain natriuretic peptide as an indicator of ventricular function in patients on hemodialysis.* **Nitta,K; Kawashima,A; Yumura,W; et,al.** 1998, *Am J Nephrol*, Vol. 18, pp. 411-415.
100. *Brain natriuretic peptide levels predict morbidity and mortality in hemodialysis patients.* **Matias,P; Jorge,C; Aires,I; et,al.** 2009, *Port J Nephrol Hipert*, Vol. 23, pp. 249-255.
101. *Natriuretic peptides.* **Levin,E.R; Gardner,D.G; Samson,W.K.** 1998, *N Engl J Med*, Vol. 36, pp. 552-557.
102. *Vascular calcifications: pathogenesis, management and impact on clinical outcomes.* **Cannata-Andía,J; Rodriguez-Garcia,M; Carrillo-López,N; Naves Diaz,M.L; Diaz-Lopez,J.B.** 2006, *J Am Soc Nephrol*, Vol. 17, pp. S267-S273.
103. *Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients.* **Wolf,M; Shah,O; Gutierrez,O; Ankers,E; Monroy,M; Tamez,H; Steele,D; Chang,Y; Camargo Jr,C.A; et al.** 2007, *Kidney Int*, Vol. 77, pp. 1004-1013.
104. *Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality.* **Dobnig,H; Pilz,S; Scharnagl,H; et,al.** 2008, *Arch Int Med*, Vol. 168, pp. 1340-1349.
105. *Vitamin D levels and patient outcome in chronic kidney disease.* **Ravani,P; Malberti,F; Tripepi,G; et,al;.** 2008, *Kidney Int*, Vol. 75, pp. 88-95.
106. *Chronic kidney disease, hypovitaminosis D, and mortality in the United States.* **Mehrotra,R; Kermah,D.A; Salusky,I.B.** 2009, *Kidney Int*, Vol. 76, pp. 977-983.
107. *Vitamin D status and mortality in chronic kidney disease.* **Pilz,S; Tomaschitz,A; Friedl,C; et,al.** 2011, *Nephrol Dial Transplant*.
108. *Systematic review: vitamin D and cardiometabolic outcomes.* **Pittas,A.G; Chung,M; Trikalinos,T; et,al.** 2010, *Ann Int Med*, Vol. 152, pp. 307-314.
109. *Chronic kidney disease as a predictor of coronary lesion morphology.* **Kilickesmez,K.O; Abaci,O; Okcun,B; et,al.** 2010, *Angiology*, Vol. 61, pp. 344-349.

110. *Systematic Review: Vitamin D and Calcium Supplementation in Prevention of Cardiovascular Events* . **Wang,L.; Manson,J.E.; Song,Y.; Sesso,H.D.** 2010, *Ann Int Med*, Vol. 152, pp. 315-323.

111. *Vitamin D compounds for people with chronic kidney disease not requiring dialysis*. **Palmer,S.C.; McGregor,D.O.; Craig,J.C.; Elder,G.; Macaskill,P.; Strippoli,G.F.** 2009, *Cochrane Database Syst Rev*, Vol. 4, p. CD008175.

112. *Vitamin D compounds for people with chronic kidney disease requiring dialysis*. **Palmer,S.C.; McGregor,D.O.; Craig,J.C.; Elder,G.; Macaskill,P.; Strippoli,G.F.** 2009, *Cochrane Database Syst Rev*, Vol. 4, p. CD005633.

113. *A Randomized Trial of Cholecalciferol versus Doxercalciferol for Lowering Parathyroid Hormone in Chronic Kidney Disease*. **Moe,S.M.; Saifullah,A.; LaClair,R.E.; Usman,S.A.; Yu,Z.** 2, 2010, *Clin J Am Soc Nephrol*, Vol. 5, pp. 299-306.

7. Discussão global

Nas últimas duas décadas, assistimos a uma surpreendente evolução da relevância dada à doença óssea e ao metabolismo fosfo-cálcico, no doente urémico.

Após um período inicial, em que a avaliação e interpretação da patologia óssea nos doentes com insuficiência renal mereceu mais atenção dos reumatologistas que dos próprios nefrologistas (como o demonstram os resultados pioneiros da Professora Dra. Marie Christine de Vernejoul, reumatologista do Hôpital Lariboisière, em Paris, com quem tivemos o privilégio de trabalhar (1; 2; 3; 4)), observou-se um crescente entusiasmo dos nefrologistas por esta área clínica.

Dando forma à relevância da doença óssea e do metabolismo mineral no doente urémico, a iniciativa KDIGO definiu-a, em 2006, como uma alteração sistémica caracterizada por uma ou mais das seguintes modificações: anomalias laboratoriais, anomalias na histologia óssea (do osso não descalcificado) e/ou calcificações vasculares e de tecidos moles (5). A esta definição corresponde a designação de CKD-MBD: “*Chronic Kidney Disease - Mineral and Bone Disorder*”.

E posteriormente, em 2009, surgiram as *guidelines* da KDIGO que, com grande rigor científico, utilizaram o sistema GRADE (*grades of recommendation, assessment, development and evaluation*) na seleção e classificação dos artigos que as suportaram (6).

São estas *guidelines* que balizam, atualmente, em grande medida, as decisões diagnósticas e terapêuticas na área da osteodistrofia renal.

Em nossa opinião, as *guidelines* KDIGO são mais relevantes pela classificação crítica de muitos artigos previamente publicados (e que, por vezes, surpreendentemente, surgem com graus de evidência muito baixos ou quase nulos na avaliação feita pelos peritos da KDIGO) e pela listagem exaustiva de áreas de investigação a desenvolver, do que pela afirmação clara e inequívoca de propostas de atuação.

Na verdade, a maioria das recomendações da KDIGO 2009 são suportadas por um grau de evidência muito baixo (6).

Atendendo a este elevado grau de exigência das *guidelines* KDIGO 2009, foi com grande prazer que vimos um nosso manuscrito incluído nestas *guidelines* e mais ainda ao ser um dos únicos dois, na área da osteodistrofia renal, a ser classificado com o grau de evidência “A”, correspondente a “*High quality of evidence*”, o mais elevado da classificação GRADE (7).

chapter 6

Table 45| Cumulative evidence matrix for all treatment studies by outcome

Outcome	Methodological quality of outcome								
	A			B			C		
	Author	N (on agent)	F/U	Author	N (on agent)	F/U	Author	N (on agent)	F/U
Mortality	—	—	—	Block (2007) ³⁰⁵ St Peter (2008) ^{207 a}	127 (60) 2102 (1051)	44 months 28 months	Cunningham (2005) ³⁸⁶	1184 (697)	6–12 months
Clinical CVD	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Hospitalization	—	—	—	—	—	—	Cunningham (2005) ³⁸⁶ Suki (2007) ^{200 a}	1184 (697) 2103 (1053)	6–12 months 20 months
CKD clinical outcomes	—	—	—	—	—	—	—	—	—
QoL	—	—	—	—	—	—	Cunningham (2005) ³⁸⁶	1184 (697)	6–12 months
Fractures	—	—	—	Ishani (2008) ⁴¹¹	4973 (3293)	36 months	Miller (2005) ¹²⁰ Cunningham (2005) ³⁸⁶ Baker (1986) ¹⁰¹ Jamal (2007) ¹²⁷ Grotz (2001) ¹⁰⁵ Coco (2003) ⁴⁰⁹ Miller (2007) ¹⁷⁰	2658 (X ^b) 1184 (697) 76 (38) 581 (X ^c) 80 (40) 72 (36) 731 (485)	22–25 months 6–12 months 60 months 36 months 12 months 12 months 21 months
PTx	—	—	—	—	—	—	Cunningham (2005) ³⁸⁶	1184 (697)	6–12 months
Bone density	Grotz (2001) ¹⁰⁵	80 (40)	12 months	Coco (2003) ⁴⁰⁹ Jeffery (2003) ¹⁷¹ Torres (2004) ¹⁶⁷ Wissing (2005) ⁴⁷⁷ Hernandez (2003) ⁴⁴⁴ Ishani (2008) ⁴¹¹	50 (X ^c) 117 (46) 90 (45) 90 (46) 50 (25) 4973 (3293)	12 months 12 months 12 months 12 months — 36 months	Miller (2005) ¹²⁰ Jamal (2007) ¹²⁷ Raggi (2005) ³⁴⁴ Asmus (2005) ³⁴⁴ De Sevaux (2002) ¹⁰⁰ Josephson (2004) ¹⁰⁸ Miller (2007) ¹⁷⁰	4643 (2335) 581 (X ^c) 111 (51) 114 (55) 113 (65) 64 (26) 731 (485)	22–25 months 36 months 12 months 21 months 6 months 12 months 21 months
Bone histology	Ferreira (2008) ¹⁰⁴ Barreto (2008) ²⁸⁸	91 (44) 101 (41)	13.5 months 12 months	Freemont (2005) ¹³ Spasovski (2006) ³⁸¹ Salusky (2005) ¹⁷ Malluche (2008) ¹⁰³	63 (30) 24 (12) 29 (15) 211 (51)	12 months 12 months 8 months 24 months	Hamdy (1995) ⁹⁷ Nordal (1988) ¹⁰² Baker (1986) ¹⁰¹ Salusky (1998) ⁸¹ Coco (2003) ⁴⁰⁹ Cuento-Manzano (2000) ⁴⁷⁰ Malluche (2008) ¹⁰³	134 (72) 30 (15) 76 (38) 46 (16) 72 (36) 30 (16) 48 (32)	24 months 8 months 60 months 12 months 12 months 12 months 24 months
Vascular/Valvular Calcification	—	—	—	Quinibi (2008) ²⁸⁷ Chertow (2002) ²⁴⁴ / Chertow (2003) ¹²⁷ Raggi (2004) ³⁴⁴ Block (2005) ³⁰⁵ Russo (2007) ²⁸⁰	203 (103) 200 (99) 132 (62) 148 (73) 90 (30)	12 months 12 months 12 months 18 months 24 months	Baker (1986) ¹⁰¹ Asmus (2005) ³⁴⁴ Barreto (2008) ²⁸⁸	76 (38) 114 (55) 101 (41)	60 months 21 months 12 months
GFR loss	—	—	—	—	—	—	Miller (2005) ¹²⁰ Coyne (2006) ³⁷⁷ Hamdy (1995) ⁹⁷ Coburn (2004) ¹⁷⁰ Grotz (2001) ¹⁰⁵ Coco (2003) ⁴⁰⁹ Jeffery (2003) ¹⁷¹ De Sevaux (2002) ¹⁰⁰ Torres (2004) ¹⁶⁷ Miller (2007) ¹⁷⁰ Wissing (2005) ⁴⁷⁷ Russo (2007) ²⁸⁰	4643 (2335) 220 (107) 176 (89) 55 (27) 80 (40) 72 (36) 117 (46) 113 (65) 90 (45) 731 (485) 90 (46) 90 (30)	22–25 months 6 months 24 months 6 months 12 months 12 months 12 months 6 months 12 months 21 months 12 months 24 months
Lab: Ca, P	Coyne (2006) ³⁷⁷ Coburn (2004) ¹⁷⁰ Culleton (2007) ¹³⁴	220 (107) 55 (27) 52 (26)	6 months 6 months 6 months	Block (2004) ³¹⁷ Lindberg (2005) ¹⁸⁸ Moe (2005) ¹⁹⁵ Baker (1986) ¹⁰¹ Hamdy (1995) ⁹⁷ Sprague (2003) ¹⁰² Freemont (2005) ¹³ Chertow (2002) ²⁴⁴ Block (2005) ³⁰⁵ Grotz (2001) ¹⁰⁵ Coco (2003) ⁴⁰⁹ De Sevaux (2002) ¹⁰⁰	741 (371) 395 (294) 0 ^a 76 (38) 176 (89) 266 (133) 98 (49) 200 (99) 148 (73) 80 (40) 72 (36) 113 (65)	6 months 6 months 6 months 60 months 24 months 3–8 months 12 months 12 months 18 months 12 months 12 months 6 months	Miller (2005) ¹²⁰ Hayashi (2004) ¹⁰¹ Finn (2006) ³⁴⁹ Suki (2007) ²⁰⁰ Asmus (2005) ³⁴⁴ Barreto (2008) ²⁸⁸	4643 (2335) 91 (47) 1359 (682) 2103 (1053) 114 (55) 101 (41)	22–25 months 12 months 24 months 20 months 24 months 12 months

Neste estudo (que já discutimos detalhadamente no capítulo 4), apresentámos os resultados da maior população de doentes hemodialisados, sujeitos a uma dupla biopsia óssea, tratados com 2 captadores de fósforo, de acordo com as recomendações K-DOQI, e mantendo ao longo das 54 semanas do estudo um rigoroso controlo do fósforo, do cálcio e da paratormona sérica.

Comparámos, em paralelo, a utilização de um captador de fósforo de base cálcica (carbonato de cálcio) com o sevelamer, neste estudo prospetivo e aleatorizado, o qual revelou resultados muito significativos para além dos diretamente inerentes à utilização dos diferentes captadores de fósforo.

Este estudo foi particularmente relevante, porque avaliou uma população homogénea, de doentes prevalentes em hemodiálise, todos biopsados em apenas 2 centros (Lisboa e Porto) e por apenas 2 investigadores (nós e o Professor Dr. João Frazão), com dupla biopsia óssea intervaladas de 54 semanas, e tratados tendo em conta faixas muito apertadas, previamente definidas, para a calcemia, fosfatemia e níveis séricos de PTH (todos determinados em laboratório central).

Um aspeto relevante deste estudo (e ao contrário do de Barreto *et al* publicado posteriormente e também considerado com grau de evidência “A” nos *guidelines* KDIGO), foi o facto de não ter incluído nenhum doente com depósitos ósseos significativos de alumínio (os nossos escassos 3 doentes com essa característica foram excluídos, em função dos resultados da primeira biopsia óssea).

Deste modo, podemos dizer que o nosso estudo reflete, pela primeira vez, a histomorfometria óssea de doentes hemodialisados “*na era moderna*”, isto é, tratados de acordo com as *guidelines* K-DOQI e sem exposição ao alumínio.

Outra particularidade deste nosso estudo é que, apesar de ter sido desenhado 3 anos antes da publicação das *guidelines* KDIGO 2009, a abordagem diagnóstica da histomorfometria óssea já foi feita de acordo com a avaliação de 3 grandes eixos: a remodelação óssea, a mineralização e o volume ósseo.

Esta foi uma antecipação feliz do que viria a ser, 3 anos mais tarde, a proposta de classificação da KDIGO, baseada no TMV (T = turnover; M = mineralization; V = volume).

Importa, no entanto, reconhecer que esta antecipação não foi fruto do acaso, visto que 3 dos autores do nosso estudo (o Professor Hartmut Malluche, o Professor João Frazão e nós próprios) vieram a integrar o grupo KDIGO responsável pela definição da nova classificação da CKD-MBD (doença mineral e óssea da doença renal crónica) e a introdução da classificação TMV para a histomorfometria óssea (5).

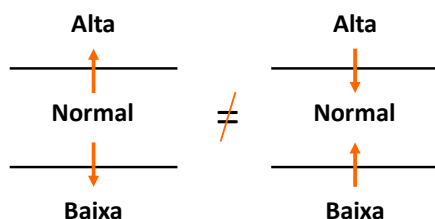
Olhando para os objetivos primários e secundários desta nossa investigação, reconhecemos, com facilidade, que este foi o primeiro trabalho publicado que teve em conta a classificação TMV, que mais tarde viria a ser proposta pela KDIGO (ainda que a terminologia utilizada não fosse, obviamente, a mesma) (7).

Sempre defendemos que os resultados histomorfométricos deveriam ser menos codificados e herméticos, de modo a transmitirem uma informação clara e relevante para o nefrologista do doente, nomeadamente para suportar diferentes atitudes terapêuticas.

Também na investigação clínica nos pareceu que o mais relevante seria avaliar o grau de remodelação óssea (que pode ser elevado, normal ou baixo), o volume ósseo (separando claramente o osso cortical e o osso trabecular) e a mineralização (que pode ser normal ou anormal) (7), como discutimos detalhadamente no capítulo 4.

Outra originalidade deste nosso estudo foi apresentar, em diversas comunicações orais, os resultados histomorfométricos sob a forma de grandeza vetorial. Este é um conceito relevante, tendo em conta que 2 evoluções em sentidos opostos podem originar a mesma média ou mediana, como é esquematizado na figura seguinte, que já apresentámos e discutimos detalhadamente no capítulo 4:

Média, mediana e remodelação óssea:
A verdade pode estar escondida...



Apesar dos revisores deste nosso manuscrito, publicado no *Journal of American Society of Nephrology*, não nos terem permitido publicar grande parte dos nossos resultados, nesta forma evolutiva de grandeza vetorial (provavelmente por representar um “corte” significativo com a habitual e exaustiva lista de medições histomorfométricas), parece-nos adequado ter a oportunidade de os discutir no contexto desta dissertação.

O esquema acima apresentado permite-nos representar graficamente, de forma simples e facilmente apreensível, a evolução temporal de qualquer parâmetro histomorfométrico, que tenha sido alvo de, pelo menos, duas medições.

Independentemente da representação sob a forma gráfica ou numérica, a abordagem dos resultados histomorfométricos em função da aproximação ou do afastamento da normalidade é a que nos faz mais sentido, visto permitir, por exemplo, aferir a eficácia de determinadas terapêuticas, comparar diferentes alternativas de intervenção, definir evolução de fatores de risco (por exemplo de calcificação ou de fratura óssea), etc.

Tínhamos utilizado, previamente, esta abordagem diagnóstica e de apresentação dos resultados, mas de forma muito parcial, no manuscrito que reflete a comparação entre a eficácia e segurança associada à utilização de dois captadores de fósforo: o carbonato de lantânio versus carbonato de cálcio (8).

No entanto, foi mais tarde, aquando da apresentação dos resultados do estudo prospetivo e aleatorizado, com dupla biópsia óssea, intervaladas de 1 ano, comparando

o cloridrato de sevelamer com o carbonato de cálcio, que esta opção para apresentação dos resultados mereceu a nossa adesão e aprofundamento (7).

Quando representamos, por exemplo, a remodelação óssea (avaliada pela taxa de formação óssea ou pela frequência de ativação), facilmente percebemos o conceito que vimos defendendo: a comparação de médias ou medianas destes parâmetros histomorfométricos, resultantes de 2 biópsias ósseas, nada nos diz sobre a evolução clínica dos doentes.

Por exemplo, à esquerda do esquema acima, temos representada a evolução antagônica de 2 doentes, cuja remodelação óssea passa do intervalo da normalidade, para a elevada remodelação (num caso) e para a baixa remodelação (no outro). No final temos então 2 doentes que deixaram de ter remodelação óssea normal. Pelo contrário, à direita da figura, está representada graficamente, a evolução para a normalidade, no que respeita à remodelação óssea, dos 2 doentes: num caso vindo da alta remodelação e no outro da baixa remodelação.

Olhando para a grandeza vetorial da evolução da remodelação, representada na figura acima, concluímos que, se avaliarmos os resultados histomorfométricos iniciais e finais como um todo, em vez de separarmos (como defendemos) os que se aproximam versus os que se afastam da normalidade, poderíamos, por exemplo, ter um valor médio de taxa de formação óssea idêntico nos 2 doentes representados à esquerda e nos 2 doentes representados à direita da figura, embora eles tenham tido uma evolução antagônica: no primeiro caso afastando-se ambos do normal e, no segundo caso, aproximando-se ambos da normalidade.

No final do capítulo 4 discutimos esta abordagem diagnóstica e esta forma de apresentação dos resultados com detalhe, precisamente a propósito do manuscrito que temos vindo a analisar.

Na nossa investigação, comparando um captador de base cálcica (o carbonato de cálcio) com o sevelamer, demonstrámos que a utilização do primeiro se associou a uma evolução desfavorável da remodelação óssea (avaliada pela “frequência de ativação”), a qual se afastou da normalidade no sentido da doença óssea adinâmica, em 14% dos doentes (versus apenas 3% no grupo tratado com sevelamer).

Mais relevante foi a evolução dos doentes que na biopsia óssea basal tinham uma remodelação óssea normal ou elevada, visto serem estes os que são passíveis de, mais facilmente, modificarem a remodelação óssea.

Na verdade, os doentes que apresentavam doença óssea adinâmica na avaliação inicial dificilmente modificariam, de forma significativa, o baixo grau de remodelação óssea.

Nestes doentes, foi ainda mais evidente a diferença de resultados obtidos com os dois captadores, ao evidenciar que 37,6% dos doentes medicados com carbonato de cálcio tiveram uma evolução da remodelação óssea desfavorável (isto é, afastando-se do normal, quer no sentido da baixa remodelação em 31,3% dos casos, quer no sentido da doença óssea de elevada remodelação, em 6,3% dos doentes), versus apenas 9,1% dos doentes que, no grupo de doentes tratados com sevelamer, evoluíram para doença óssea adinâmica.

Estes resultados foram igualmente suportados pela comparação da evolução da taxa de formação óssea entre os dois grupos de doentes, expostos a diferentes captadores de fósforo, na qual se evidenciou que apenas nos doentes tratados com sevelamer se observou um aumento significativo da taxa de formação óssea, quando se compararam as biopsias basais com as biopsias de final de estudo.

Não é apenas para a avaliação da remodelação óssea que, em nossa opinião, está indicado apresentar a evolução dinâmica dos diversos parâmetros, em função da faixa de normalidade.

Por exemplo, na sequência dos resultados acima discutidos, não é de estranhar que também os achados referentes ao volume ósseo total tenham tido uma evolução concordante com os da remodelação óssea: 24% dos doentes tratados com sevelamer aumentaram o seu volume ósseo total, no sentido da normalidade, versus apenas 14% no grupo tratado com carbonato de cálcio; bem como o facto de 12% destes últimos doentes verem o seu volume ósseo ainda mais diminuído (aumentando provavelmente, de forma significativa o risco de fratura).

No entanto, em nossa opinião, mais relevante que os resultados acima referidos (e discutidos no capítulo 4), foi a elevada prevalência de doença óssea adinâmica, numa população, sem toxicidade pelo alumínio e tratada de acordo com as propostas K-DOQI,

nomeadamente no que respeita à limitação de utilização de doses elevadas de cálcio elementar (como captador do fósforo) e de vitamina D.

Neste nosso estudo, encontramos doença óssea adinâmica em 58,8% dos doentes, aquando da biópsia basal e em 52,9% das biopsias de final do estudo (às 54 semanas).

Sendo certo que o progressivo aumento de doença óssea adinâmica já vinha sendo descrito por Malluche et al (9; 10), os nossos resultados e os de Barreto *et al* (11), publicados no mesmo ano, vieram evidenciar a crescente prevalência de doença óssea de baixa remodelação, bem como a escassa utilidade da interpretação isolada dos níveis de paratormona, no diagnóstico deste quadro clínico.

Na verdade, em 1/3 dos nossos doentes com doença óssea adinâmica, os níveis de PTH eram normais ou mesmo elevados (superiores a 150 pg/mL), o que ilustra a baixa especificidade e o reduzido valor preditivo dos níveis circulantes de paratormona, no diagnóstico de doença óssea de baixa remodelação.

Estes resultados e estas limitações não são de estranhar, face aos múltiplos fatores que condicionam os níveis circulantes de paratormona, como discutimos no capítulo 3 e sumarizámos na última figura desse capítulo.

Importa ter sempre presente que os doseamentos (séricos ou plasmáticos) da paratormona não refletem, necessariamente, os respetivos efeitos desta hormona no tecido ósseo.

Desde as fases iniciais do nosso projeto de investigação, apercebemo-nos que a concordância entre os níveis circulantes de paratormona e os parâmetros histomorfométricos é pouco consistente, fracamente reprodutível e consequentemente muito “grosseira”.

Esta foi, e continuará a ser, uma questão fulcral da nossa investigação, visto que pode condicionar atitudes terapêuticas com resultados opostos para os doentes urémicos.

Por exemplo, a inibição exagerada da atividade das glândulas paratiroides, por via medicamentosa ou cirúrgica, apenas baseada em níveis circulantes de paratormona,

pode agravar, significativamente, uma doença óssea de baixa remodelação num doente urémico.

Estas consequências serão particularmente graves se tomadas de forma irreversível (paratiroidectomia cirúrgica) e/ou em doentes jovens e candidatos a transplantação renal (e, conseqüentemente, potencialmente expostos a outros depressores da remodelação óssea, como a corticoterapia).

A primeira grande limitação à interpretação dos efeitos ósseos da paratormona circulante, nos doentes urémicos, é a diminuição da expressão do recetor da PTH em diversas células alvo desta hormona e, nomeadamente, nos tecidos ósseo e cartilágneo.

Tivemos a oportunidade de beneficiar da sequenciação do recetor da PTH-PTHrP, pelo grupo de Segre *et al*, em Boston, poucos meses antes de iniciarmos o nosso estágio, de longa duração (1993-1994), no Hôpital Necker-Enfants Malades, em Paris (12).

Nesta instituição trabalhámos com Pablo Ureña, um investigador que tinha integrado a equipa de Segre *et al*, e conseqüentemente, tivemos a possibilidade de participar em diversas linhas de investigação sobre este tema.

Pela primeira vez, no estudo da expressão do recetor da PTH-PTHrP, associámos técnicas de biologia molecular (nomeadamente *hibridização in situ*) com métodos de imunocitoquímica e de histomorfometria óssea. Esta última técnica já era do nosso domínio, fruto de estágios anteriores no Hôpital Lariboisière, em Paris (com a Prof. Marie-Christine de Vernejoul) e no Hospital del Mar, em Barcelona (com o Prof. Sergio Serrano).

Com Pablo Ureña e com o Prof. Tilman Drüeke, publicámos manuscritos evidenciando a diminuição da expressão do recetor da PTH-PTHrP num modelo animal de rato urémico (por nefrectomia de 5/6) (13; 14).

A redução da expressão deste recetor nas células tubulares renais, no modelo animal urémico, não foi influenciada pela tiro-paratiroidectomia (15).

Mais relevantes, em nossa opinião, foram os nossos resultados referentes à caracterização da expressão do recetor da PTH-PTHrP, na cartilagem de crescimento

(nomeadamente nos condrócitos hipertrofiados), num modelo animal de rato urémico, versus não urémico.

Por métodos de hibridização *in situ* (com quantificação em gama câmara) de imunocitoquímica e de histomorfometria óssea e da cartilagem, evidenciámos uma significativa redução da espessura da cartilagem de crescimento, do comprimento das colunas de condrócitos hipertrofiados e da expressão do recetor da PTH-PTHrP, nos animais urémicos.

As tíbias e os perónios dos animais urémicos apresentavam uma significativa redução das dimensões (sobretudo do comprimento).

No seu conjunto, estes nossos resultados suportam a conhecida redução de estatura / atraso de crescimento associados à urémia.

A diminuição da expressão do recetor da PTH-PTHrP justifica ainda, pelo menos em grande parte, a reconhecida resistência periférica à ação da paratormona no quadro urémico.

A redução da expressão deste recetor poderá ainda ser um dos principais mecanismos justificativos de quadros de doença óssea adinâmica ou de baixa remodelação, descritos por nós e por outros autores, em muitos doentes com níveis circulantes de paratormona normais ou mesmo significativamente elevados (7; 11).

Curiosamente, como descrevemos detalhadamente no capítulo 3 desta dissertação, e incluímos na discussão dos manuscritos iniciais que publicámos, referentes a esta linha de investigação, sempre colocámos como hipótese provável que a expressão do recetor da PTH-PTHrP poderia ser diretamente modulada pela vitamina D.

Passadas quase duas décadas, viemos a demonstrar na nossa investigação clínica que níveis de deficiência ou insuficiência em vitamina D se associaram a aumento das calcificações valvulares cardíacas, aumento das calcificações vasculares, maior IMVE (índice de massa do ventrículo esquerdo) e taxas de mortalidade global e cardiovascular mais elevadas (*vide* capítulo 6 e discussão abaixo) (16; 17; 18; 19).

Ficámos com um desafio em aberto, que consiste em voltar ao laboratório e poder demonstrar os efeitos, que suspeitamos possam ser relevantes, da suplementação

com vitamina D nativa, na expressão do recetor da PTH-PTHrP, no modelo animal urémico.

Para além da paratormona, partimos em busca de outros marcadores da remodelação óssea que pudessem ser validados na população com insuficiência renal.

Interessou-nos, particularmente, tentar avaliar de forma não invasiva a formação óssea separadamente da reabsorção óssea.

Esta separação entre dois processos ósseos antagónicos, mas que habitualmente decorrem em simultâneo, em zonas diferentes das trabéculas ósseas, é de grande relevância.

Na verdade, fruto de diferentes equilíbrios na ação osteoclástica e osteoblástica, para valores idênticos de paratormona circulante, poderemos ter um balanço do volume ósseo positivo, neutro ou negativo.

Tendo em conta que a paratormona circulante não nos permite dissociar a atividade de formação da atividade de reabsorção óssea, decidimos avaliar, separadamente, marcadores específicos de cada um destes processos.

Para caracterizar a formação óssea, avaliámos a sensibilidade e a especificidade dos níveis séricos da isoforma óssea da fosfatase alcalina, uma isoenzima específica da atividade osteoblástica.

No primeiro estudo publicado em doentes adultos urémicos, nos quais foram correlacionados os dados histomorfométricos (de doentes com baixa e com elevada remodelação) com os níveis circulantes da isoforma óssea da fosfatase alcalina, demonstrámos a superioridade destas determinações em relação às da fosfatase alcalina total (20).

A isoforma óssea da fosfatase alcalina apresentou um significativo aumento da sensibilidade e da especificidade (em comparação com a fosfatase alcalina total), quer no diagnóstico da doença óssea de elevada remodelação quer no diagnóstico diferencial entre doença óssea adinâmica e quadros de remodelação óssea normal (20; 21).

Estes últimos resultados são, em nossa opinião, particularmente relevantes, tendo em conta a dificuldade de separação entre estes dois diagnósticos.

Para a caracterização não invasiva da reabsorção óssea, o desafio foi ainda maior, porque ela reflete a atividade osteoclástica.

E a superfície osteoclástica (correspondente à superfície trabecular coberta por osteoclastos, em processo de reabsorção óssea ativa) tem, no osso normal, uma expressão dez a vinte vezes inferior à superfície osteoblástica.

Nestas circunstâncias, a validação de marcadores sistémicos da reabsorção óssea, que traduzam a atividade osteoclástica, continua a representar um enorme desafio para os investigadores e clínicos que se dedicam à osteodistrofia renal.

Tivemos a oportunidade de testar, pela primeira vez no soro de doentes urémicos, dois novos marcadores da reabsorção óssea: a piridinolina (PYD) e a desoxipiridinolina (DPYD).

Previamente à nossa investigação, a PYD e a DPYD apenas tinham sido utilizadas em determinações urinárias (para o diagnóstico de osteoporose de alta atividade de reabsorção) e davam os primeiros passos na determinação em soros de doentes oncológicos com metástases osteoclásticas (22; 23; 24).

Pretendemos, num primeiro tempo, caracterizar os níveis de PYD e de DPYD em doentes hemodialisados e anúricos (consequentemente sem qualquer função renal residual relevante).

Num segundo tempo, avaliámos a sensibilidade e especificidade da PYR e da DPYR no diagnóstico diferencial da doença óssea de elevada remodelação.

Como discutimos no capítulo 3, a PYR e a DPYR são duas pequenas moléculas de pontagem, que ligam e estabilizam as cadeias de colagénio tipo I, libertando-se para a circulação aquando dos processos de reabsorção óssea e de desagregação da matriz de colagénio tipo I.

Na nossa experiência, fruto dos doseamentos de PYD e de DPYD em 37 doentes prevalentes, sujeitos a biopsia óssea após marcação pela tetraciclina, demonstrámos que estas moléculas evidenciaram uma muito melhor correlação com a reabsorção óssea quantificada na biopsia (superfície osteoclástica e número de osteoclastos por mm^2), do que todos os outros marcadores bioquímicos, incluindo a PTH (25).

Estava assim identificado um marcador sérico não invasivo, da reabsorção óssea, passível de ser utilizado no doente urémico e, inclusivamente, no doente anúrico em hemodiálise.

Outro marcador sérico que veio a evidenciar utilidade na caracterização da atividade osteoclástica foi a fosfatase ácida. Aquando das nossas primeiras investigações, os métodos de determinação sérica desta enzima eram ainda pouco reprodutíveis e pouco consistentes, situação que sofreu moderada melhoria nos últimos anos (26; 27; 28).

No entanto, as determinações da fosfatase ácida sérica ainda não conseguiram afirmar-se como um marcador fiável e de interesse clínico significativo no diagnóstico da osteodistrofia renal (29).

No que respeita à fosfatase ácida, interessou-nos mais otimizar a sua identificação nas biopsias ósseas dos nossos doentes. Tendo em conta a reduzida presença de osteoclastos ativados numa biópsia óssea normal, facilmente se entende a importância da otimização do contraste destas células.

Este aspeto ganha particular relevância quando pretendemos fazer histomorfometria semiautomática com contagem baseada em programa informático, específico para a osteodistrofia renal. Neste caso, o contraste destas células é fundamental.

Como descrevemos no capítulo 4.1.4, desenvolvemos uma técnica de otimização da coloração dos osteoclastos ativos, através da coloração da fosfatase ácida com tempos de permanência em estufa e exposição a temperaturas específicas (30). Pensamos ter encontrado o compromisso ótimo entre o máximo de contraste dos osteoclastos ativados, evitando a lise destas células e conseqüentemente a influência da técnica nos resultados histomorfométricos (30).

Importa, no entanto, ter em atenção que, como referimos nos nossos manuscritos sobre este tema, a utilização da técnica de coloração da fosfatase ácida vai “inflacionar” a contagem de osteoclastos ativados e da superfície osteoclástica ativa (podendo atingir valores dez vezes superiores), quando comparada com a ausência de qualquer coloração específica para estas células (30; 31; 32).

Para além da diminuição da expressão do recetor da PTH/PTHrP que tivemos oportunidade de demonstrar, pela primeira vez, no tecido ósseo e cartilágneo (ver discussão acima), muitos outros fatores podem contribuir para a grande variabilidade (intra ensaio e inter ensaio), baixa especificidade e reduzida sensibilidade dos níveis circulantes de PTH na avaliação da remodelação óssea.

Entre estes fatores (que foram por nós analisados no capítulo 3), salientamos: diferentes métodos de determinação, variações circadianas, doseamentos no soro versus plasma, condições de colheita, transporte e conservação das amostras, idade e género do doente, gravidade da IRC, exposição a metais (ferro, alumínio), terapêuticas (vitamina D, cálcio elementar, calcimiméticos), concentração de cálcio da solução dialisante, etc. (33; 34).

Deste modo, pode ser muito grande a dissociação entre os níveis circulantes de PTH e as medições histomorfométricas que se encontram, aquando da leitura de uma biopsia óssea realizada em simultâneo.

A grande variabilidade dos níveis de PTH medidos no soro de doentes urémicos, utilizando diferentes ensaios para doseamento da PTH de 2ª geração, foi elegantemente demonstrada por Jean-Claude Souberbielle e colaboradores.

Na verdade, estes autores (com quem tivemos o privilégio de trabalhar no Hôpital Necker e publicar em coautoria sobre este tema), evidenciaram que os diferentes doseamentos da PTH intacta, por método imunométrico de 2ª geração, mostraram uma elevada variabilidade de -44.9% a +123%, quando comparados com o ensaio da “*Allegro*”, o mais frequentemente utilizado na determinação da denominada PTH intacta (35).

Foi, aliás, com base nos resultados laboratoriais obtidos com a utilização deste ensaio da “*Allegro*”, que foram definidos os valores alvo para a PTH propostos nos KDOQI (36).

Mais recentemente, os mesmos autores demonstraram a relevância da comparação dos valores de PTH ser feita com os doseamentos de uma população normal igualmente avaliada no mesmo laboratório (em vez de serem considerados como limites do normal os valores definidos pelo fabricante do método de determinação).

Deste modo foi possível reduzir significativamente a variabilidade inter-ensaio, na determinação da PTH (37).

Utilizando esta metodologia, que nos parece a mais adequada, verificou-se que os dois ensaios que apresentavam os valores absolutos mais alto e mais baixo de PTH tinham uma discordância de diagnóstico em 56,4% (se fossem aplicadas as propostas KQOQI), de 36,2% (se fossem aplicados os intervalos KDIGO) e de apenas 16,1% (se fossem aplicados os intervalos KDIGO, mas tendo como padrão os valores laboratoriais de uma população não doente, sem carência em vitamina D, com doseamentos simultâneos nesse laboratório) (38).

Estes resultados sustentam a importância de serem sempre utilizados, como limites de normalidade de determinado laboratório, os valores que resultam da quantificação dos níveis de PTH (seja por método de 2ª ou de 3ª geração), numa população normal, suplementada em vitamina D nativa, efetuada nesse mesmo laboratório.

Recentemente foram apresentados os primeiros resultados do maior estudo efetuado até à atualidade, no qual se compararam a sensibilidade e especificidade dos doseamentos de diferentes marcadores bioquímicos da remodelação óssea, entre os quais os da PTH de 2ª e 3ª geração, com os parâmetros histomorfométricos obtidos a partir de biopsias ósseas, efetuadas simultaneamente com as colheitas de sangue.

Esta investigação é promovida pelo núcleo da CKD-MBD da KDIGO, que integramos, reunindo o nosso Serviço de Nefrologia do Hospital Curry Cabral, e mais quatro laboratórios que se dedicam ao estudo invasivo da osteodistrofia renal, no Brasil, nos EUA, na Turquia e na Venezuela.

Estamos conscientes que, não apenas esta é a maior série estudada na qual são comparados os resultados de biópsias ósseas com soros colhidos simultaneamente, como dificilmente esta casuística será ultrapassada nos anos mais próximos (face à progressiva redução do número de biopsias ósseas realizadas, em muitos países).

Consequentemente, somos impelidos a explorar todas as correlações, associações e conclusões que resultem da análise destes dados histomorfométricos e bioquímicos, não sendo plausível que seja a dimensão da amostra a justificar a ausência de resultados eventualmente esperados.

A nossa investigação foi feita em 612 doentes, cujas biopsias ósseas foram lidas nos cinco centros acima descritos, após um processo de aferição de critérios de leitura histomorfométrica (através da troca e leitura simultânea das mesmas lâminas, por todos os centros envolvidos).

No nosso estudo pudemos fazer uma análise comparativa, nesta grande série de biópsias, acerca da adequação e capacidade discriminatória / diagnóstica dos objetivos K/DOQI com os KDIGO e ainda dos níveis de PTH de 2ª com os de 3ª geração.

Os níveis de PTH de 2ª e de 3ª geração mostraram uma especificidade razoável, mas uma sensibilidade reduzida para diferenciar a remodelação óssea elevada da remodelação óssea não elevada (isto é, normal ou baixa) (39).

Neste diagnóstico diferencial, os objetivos KDIGO apresentaram maior especificidade que os K/DOQI (40).

A utilização da PTH de 3ª geração apresentou maior sensibilidade que a PTH de 2ª geração na diferenciação de doença óssea adinâmica versus não adinâmica. No entanto, houve perda significativa de especificidade com a utilização dos níveis de PTH de 3ª geração para este diagnóstico (41).

Considerando os valores de PTH intacta (de 2ª geração) como uma variável contínua, a “AUC” (“area under the ROC curve”), mostrou valores otimizados de corte para o diagnóstico de remodelação baixa versus não baixa de 104 pg/ml e para o diagnóstico de elevada versus não elevada remodelação de 243 pg/ml (40).

Verificamos assim que, desta nossa investigação, podemos concluir que a PTH mostrou apenas capacidade muito marginal e limitada no diagnóstico diferencial de baixa remodelação versus elevada remodelação óssea (39).

A utilização de métodos de 3ª geração para determinação da PTH, com base nos nossos resultados, não se associa a aumento significativo da sensibilidade nem da especificidade no diagnóstico não invasivo da remodelação óssea (39; 41).

Consequentemente, estes métodos para determinação da PTH, mais dispendiosos e apenas praticados nalguns laboratórios especializados, não devem ser considerados relevantes para o diagnóstico não invasivo da remodelação óssea.

Pelo contrário, as conclusões desta investigação, confirmam as nossas propostas já anteriormente publicadas (42), nas quais defendemos a utilização e interpretação conjunta dos níveis circulantes da PTH com os de outros marcadores da formação e da reabsorção óssea (por exemplo a fosfatase alcalina óssea e a fosfatase ácida resistente ao ácido tártrico, respetivamente).

Nesta mesma população biopsada efetuámos um outro estudo original, na qual utilizámos, pela primeira vez, a nova classificação da osteodistrofia renal proposta pela KDIGO.

Os 612 doentes biopsados foram caracterizados em função da nova classificação TMV (T=Turnover; M=Mineralization; V=Volume) da KDIGO. Verificámos que 33% dos doentes tinham um diagnóstico de baixo volume (V), baixa remodelação (T) e normal mineralização (M) (40).

Deste modo, também pela nova classificação KDIGO (TMV) este grupo, que seria previamente classificado como “adinâmico”, continua a ser o mais numeroso.

Nas 612 biopsias ósseas que avaliámos, obtivemos em 24,4% dos doentes remodelação óssea normal, 30,9% com um volume ósseo total normal e observámos que apenas 16,1% dos doentes apresentavam compromisso significativo da mineralização óssea (40).

Concluimos que a nova classificação TMV da KDIGO permitiu classificar todas as lesões encontradas de forma válida, claramente discriminativa e muito mais informativa que as avaliações clássicas da osteodistrofia renal.

As propostas da KDIGO, em 2009, para as indicações de realização de biopsia óssea, são semelhantes às por nós já definidas em 2000 (43). Continuamos, no entanto, a insistir na necessidade de realizar mais biópsias após transplantação renal (o que não surgiu contemplado, com a relevância que nos parece merecer, nas “*guidelines*” da KDIGO), visto que muitos fatores com efeito oposto sobre a remodelação e o volume ósseo estão presentes nesta fase evolutiva dos doentes, nomeadamente: a gravidade e o tipo de doença óssea antes da transplantação, a manutenção de níveis circulantes desadequados de PTH e/ou de FGF-23, o grau de insuficiência renal residual após transplantação, a frequente insuficiência ou mesmo deficiência em vitamina D e ainda os efeitos de diferentes terapêuticas como a corticoterapia e o sirolimus (43).

Outra indicação para a realização de uma biopsia óssea num doente urémico, particularmente se em programa de diálise, é, em nossa opinião, após exposição maciça ao ferro. Habitualmente, para otimizar a resposta eritropoiética aos agentes estimuladores da eritropoiese, estes doentes podem ser expostos a longos períodos e doses maciças de ferro elementar, as quais se depositam, frequentemente, na frente de mineralização e, desse modo, contribuem para o desenvolvimento de uma doença adinâmica ou, mais raramente, para um compromisso da mineralização óssea (43).

Por este motivo, para excluir a presença de depósitos significativos de ferro no fragmento ósseo, como discutimos no capítulo 4, continuamos a realizar a coloração de Perls em todas as biopsias ósseas analisadas no nosso laboratório.

Para além da avaliação histológica da remodelação óssea, tentámos, desde cedo, integrar na nossa investigação a caracterização de alguns mecanismos e mediadores da interação entre as células, responsáveis pela renovação do esqueleto ósseo.

Esta vertente da nossa investigação tornou-se progressivamente mais aliciante à medida que era documentada a semelhança de processos metabólicos ósseos com os observados noutros tecidos, nomeadamente no aparelho cardiovascular (44; 45; 46; 47).

Na última década muitas das comorbilidades associadas ao aumento da mortalidade do doente urémico (como as calcificações vasculares e das válvulas cardíacas), surgiram associadas à perda da capacidade tampão do tecido ósseo (48). Quer a doença óssea de elevada remodelação (por libertar mais cálcio e fósforo do esqueleto), quer a doença óssea adinâmica (por impedir a incorporação destes dois iões no tecido ósseo) surgiram associadas ao aumento significativo das calcificações extra-esqueléticas (49).

Nestas circunstâncias, o osso “renasceu” para os nefrologistas, passando a ser encarado como um tecido fundamental para, mediante diversos processos celulares e bioquímicos, passivos e ativos, contribuir para o equilíbrio dos tecidos extra-esqueléticos.

Num trabalho em que colaborámos com Teresa Adragão, demonstrámos que um volume ósseo baixo na histologia óssea se associou a um maior risco de calcificação coronária em hemodialisados (50), ilustrando esta associação entre o tecido ósseo e o cardiovascular.

Na caracterização do diálogo entre as células que estão envolvidas na remodelação óssea, bem como na análise da evolução maturativa das linhagens osteoblástica e osteoclástica interessou-nos, particularmente, o papel de algumas citocinas e fatores de crescimento, envolvidas nestes processos.

Na nossa investigação, demos particular relevância a testar a nossa hipótese sobre o eventual efeito da remoção de algumas das citocinas e fatores de crescimento, durante os processos de hemodiálise.

Admitimos como plausível que membranas de hemodiálise com diferente porosidade (e conseqüentemente diferente ultrafiltração) e com diferente constituição (e conseqüentemente diferente capacidade adsorptiva) pudessem ter efeitos diretos sobre os níveis circulantes de citocinas e fatores de crescimento, com conhecida interferência nas linhagens osteoblástica e osteoclástica.

Para além das membranas de hemodiálise, a própria técnica depurativa pode interferir, pelo menos hipoteticamente, na ativação das células que participam na remodelação óssea, quando é usado um método que otimiza a convecção e a ultrafiltração, como é o caso da hemodiafiltração.

Ao longo dos anos e à medida que analisávamos mais biopsias ósseas (quer em Portugal, quer em França, com populações muito diferentes) facilmente nos fomos apercebendo que estávamos a ser testemunhas privilegiadas duma clara mudança no espectro da osteodistrofia renal.

O marcado aumento da prevalência de doença óssea de baixa remodelação, e mesmo de doença adinâmica severa a que assistíamos, numa fase em que já não encontrávamos significativa toxicidade pelo alumínio, era descrita igualmente do outro lado do Atlântico, por Malluche e colaboradores (10).

Embora as causas para este marcado aumento da adinamia óssea sejam múltiplas, como o demonstrou Jorge Cannata numa excelente revisão no *Kidney International* (51), assumimos que uma das causas possíveis poderia ser a utilização de membranas de hemodiálise mais biocompatíveis, menos ativadoras de resposta inflamatória e simultaneamente com maior capacidade para ultrafiltrar e/ou adsorver, à sua superfície, citocinas ativadoras da remodelação óssea.

Começámos por demonstrar, num estudo retrospectivo, que os doentes dialisados nos 18 meses anteriores à realização da biopsia óssea, com uma membrana de baixa permeabilidade (cuprofano), apresentavam uma remodelação óssea significativamente superior (formação e reabsorção) à que se observava nos doentes dialisados com uma membrana sintética de alta permeabilidade, apesar de terem níveis circulantes equivalentes de paratormona (52; 53; 54).

Este resultado vinha fortalecer a nossa hipótese de investigação, tanto mais que nos foi possível identificar, de imediato, uma significativa diferença nos níveis circulantes de β 2-microglobulina (β 2-M), a qual foi implicada na ativação direta e indireta da remodelação óssea (como discutimos, pormenorizadamente, no capítulo 5).

A β 2-M aumenta o número de recetores e a transcrição do gene do IGF-I (insulin growth factor-I), condicionando um efeito mitogénico nos osteoblastos em cultura (55).

Neste estudo demonstrámos uma correlação positiva dos níveis séricos de β 2-M com os níveis séricos da osteocalcina, da isoenzima óssea da fosfatase alcalina (marcadores da formação óssea) e com os níveis séricos da piridinolina (marcador da reabsorção óssea). Os níveis séricos de β 2-M correlacionaram-se ainda, de forma negativa, com o volume osteóide (matriz óssea não calcificada), o que está em concordância com estudos anteriores, em que foi demonstrada, *in vitro*, a indução da secreção de colagenase pelos fibroblastos da sinovial do coelho após estimulação com β 2-M (56).

Podemos pois concluir, desta primeira abordagem da nossa investigação, que se confirmou a nossa hipótese de que os doentes dialisados com membranas menos biocompatíveis e de baixa permeabilidade apresentavam uma remodelação óssea significativamente mais elevada. Ou, perspetivando a equação ao contrário, que os doentes hemodialisados com membranas sintéticas de alta permeabilidade apresentavam menor remodelação óssea e conseqüentemente (interpretação nossa) maior risco de desenvolver doença óssea de baixa remodelação.

Posteriormente, seguindo a mesma linha de investigação do papel de diferentes citocinas no processo de remodelação óssea, procedemos a outro estudo em dezassete hemodialisados, nos quais doseámos os níveis plasmáticos da interleucina-1, do

antagonista do recetor da interleucina-1, da interleucina-6 e do recetor solúvel da interleucina-6.

Escolhemos a quantificação destas citocinas e dos respetivos recetores, visto fazerem parte das que, à data da nossa investigação, já tinham suficiente documentação acerca do seu envolvimento na estimulação da linhagem osteoblástica e osteoclástica (57).

No quadro urémico tinham já sido evidenciados níveis séricos aumentados de diversas citocinas envolvidas na remodelação óssea (nomeadamente interleucina 1, interleucina 2, interleucina 6, interleucina 11, interleucina 27, TNF- α e TGF- β) (58; 59; 60; 61; 62), bem como o aumento dos respetivos recetores solúveis ou antagonistas. (63; 64).

Neste estudo demonstrámos a presença de níveis aumentados, nestes doentes hemodialisados, da interleucina-1, do antagonista do recetor da interleucina-1, da interleucina-6 e do recetor solúvel da interleucina-6 (57).

Outros autores publicaram, posteriormente, resultados concordantes com os nossos, sugerindo igualmente a participação da interleucina-6 na estimulação da reabsorção óssea (65).

A interleucina-6 parece ser um dos mediadores mais potentes da ação da PTH e de outros agentes estimuladores da reabsorção óssea (66).

Em concordância com esta hipótese, foi demonstrado que os níveis séricos de IL6 se correlacionam com os níveis circulantes de paratormona intacta e do telopeptido do colagénio tipo 1 (ICTP), sendo esta correlação mais forte nos doentes com hiperparatiroidismo secundário mais grave (66).

Salientamos as relações inversas que observámos, por um lado entre os níveis de antagonista do recetor da interleucina-1 e a superfície osteoblástica, e por outro lado entre o rácio do recetor da interleucina-6 / interleucina-6 (IL6-r/IL6) e a superfície osteoclástica.

Estes nossos resultados estão de acordo com os efeitos estimuladores da interleucina-1 sobre os osteoblastos, previamente descritos, sugerindo que níveis séricos

elevados do antagonista do recetor da interleucina-1 tornariam o esqueleto menos sensível à estimulação da formação óssea induzida pela interleucina-1.

A relação inversa entre o ratio do recetor da interleucina-6 / interleucina-6 e a superfície osteoclástica, que observámos nos nossos doentes, está de acordo com estudos *in vitro* que evidenciam o papel da interleucina-6 na promoção da diferenciação dos osteoclastos e na ativação dos osteoclastos maduros (67).

Face aos recentes progressos na caracterização dos processos biológicos envolvidos na remodelação óssea, incluindo os que resultam da nossa investigação, é aceitável que desequilíbrios nos níveis séricos do rácio recetor da interleucina-6/interleucina-6, em conjugação com alterações da função paratiroide e com modificações nos níveis de vitamina D, possam levar ao desenvolvimento de doença óssea de elevada remodelação ou de doença óssea de baixa remodelação.

Em concordância com esta nossa hipótese, estão igualmente os resultados, mais recentes, de Barreto e colaboradores, que correlacionaram o volume e a remodelação óssea (avaliados por técnica histomorfométrica) com os níveis séricos destas citocinas, em hemodialisados (68).

Perante estes resultados entusiasmantes, decidimos realizar um estudo prospetivo, aleatorizado e multicêntrico em 36 doentes, coordenado pelo nosso laboratório e que contou com a colaboração dos Serviços de Nefrologia de Amiens e do Hospital Necker em França, de um laboratório alemão (em Ulm, onde foram doseados os “Insulin-like growth factors”-IGF) e um laboratório norte-americano (Loma Linda, Califórnia, onde foram doseadas as proteínas de ligação dos IGF).

O resultado mais relevante deste estudo prospetivo e aleatorizado foi a confirmação da nossa hipótese inicial (baseada em prévias avaliações retrospectivas), de que a utilização de membranas de mais baixa permeabilidade e menor biocompatibilidade se associa a um aumento da remodelação óssea (69).

Nos doentes dialisados com uma membrana de alta permeabilidade e mais biocompatível, observou-se uma significativa redução do número de osteoclastos ativados, da superfície osteoclástica e da superfície osteoblástica entre o início e o final do estudo.

Pelo contrário, os doentes dialisados com uma membrana de acetato de celulose (baixa permeabilidade e menor biocompatibilidade) mostraram uma variação oposta, com significativo aumento destes três parâmetros histomorfométricos estáticos (69).

A redução da formação óssea, observada nos doentes dialisados com membranas de alta permeabilidade, pode ainda justificar-se pela diminuição dos níveis circulantes de IGF-1 (o qual promove mitoses na linhagem osteoblástica (55)) e pelo aumento das 2 proteínas de ligação (IGFBP-1 e IGFBP-2), que encontramos nos nossos doentes (69).

Em nossa opinião não é apenas o tipo de membrana de diálise utilizada, mas também a própria técnica dialítica (mais ou menos convectiva) que pode modificar a expressão da osteodistrofia renal, nos hemodialisados.

Para esta convicção contribuiu um outro estudo prospetivo que efetuámos, no qual comparámos os níveis do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), após uma sessão de hemodiálise com baixa convecção e após uma sessão com convecção otimizada. Usámos, em ambas as fases, membranas com constituição idêntica (polissulfona) para eliminar outras variáveis além da convecção.

Quando comparámos as sessões de diálise de baixa convecção (hemodiálise com polissulfona de baixa permeabilidade) com as sessões de convecção otimizada (polissulfona de alta permeabilidade e técnica de hemodiafiltração), verificámos que, na última opção, os níveis de TNF- α eram significativamente menores no final da sessão de diálise (70).

Visto que o TNF- α participa, diretamente, na ativação osteoclástica, mediante a ligação a um recetor específico existente na superfície destas células, este pode ser outro motivo pelo qual os doentes dialisados com técnicas mais convectivas podem ter uma prevalência aumentada de doença óssea de baixa remodelação (71; 72; 73).

As nossas conclusões deste conjunto de investigações, suportam a nossa hipótese inicial, de que as membranas de alta permeabilidade e maior biocompatibilidade, sobretudo quando utilizadas em técnicas de maior convecção, se associam a menor ativação da remodelação óssea.

Admitimos que tal facto possa resultar da ultrafiltração, da adsorção ou da redução da síntese de citocinas ativadoras da dos osteoblastos e dos osteoclastos.

Estes resultados originais poderão contribuir para explicar, em parte, o acentuado aumento da prevalência de doença óssea adinâmica observado nos últimos anos, em provável relação com o uso mais generalizado de membranas de alta permeabilidade e de técnicas de diálise mais convectivas (muito provavelmente potenciado pelo excesso de supressão farmacológica da paratormona).

Pensamos que os nossos resultados sublinham a necessidade de não suprimir demasiado os níveis circulantes de paratormona, sobretudo em doentes com outros fatores de risco de doença adinâmica, como é o caso dos doentes diabéticos, idosos ou sujeitos a corticoterapia prolongada.

Admitimos ainda que, face aos nossos resultados, possa eventualmente ser equacionado um objetivo mais elevado para o nível sérico da paratormona, nos doentes dialisados com membranas de alta permeabilidade e elevada convecção (especialmente pela técnica de hemodiafiltração), de modo a reduzir os riscos de doença óssea adinâmica.

Este cuidado, em nossa opinião, deve ser tido em conta, com particular atenção, nos doentes (com as patologias acima referidas) que já tenham um perfil de risco para desenvolver doença óssea de baixa remodelação e que, conseqüentemente, deixaram de contar com o tecido ósseo como órgão tampão do metabolismo fosfo-cálcico.

Finalmente, ainda no âmbito da caracterização das diferentes citocinas envolvidas na osteodistrofia renal, realizámos um outro estudo em 47 hemodialisados, no qual integrámos os resultados da biopsia óssea, com os marcadores séricos da remodelação óssea e ainda com os níveis de diversas citocinas (medidas por método de Elisa e por citometria de fluxo).

Nesta investigação, por análise de regressão múltipla, os níveis séricos do antagonista do recetor da interleucina-1 (IL-1Ra) e de IL-10 foram preditores independentes da área óssea, os níveis de IL-6 e de IL-12p70 foram preditores da taxa de aposição mineral (MAR) e os níveis de IL-12p70 foram preditores da taxa de formação óssea (BFR) (74).

Num modelo de regressão linear que elaborámos, 61,1% da variação média da taxa de formação óssea observada neste grupo de doentes podia ser explicada pelos níveis circulantes de fosfatase alcalina total, IL-12p70 e de albuminemia (74).

Estes nossos resultados (discutidos em pormenor no capítulo 5) ilustram a possibilidade de integrar, num mesmo modelo, resultados dos níveis circulantes de marcadores bioquímicos da remodelação óssea, com os resultados dos níveis circulantes de diversas citoquinas envolvidas no metabolismo ósseo, de forma a otimizar as possibilidades de diagnóstico não invasivo da remodelação óssea.

Como descrevemos nos capítulos 3 e 6 desta dissertação, desde as fases precoces do nosso projeto de investigação interessámo-nos, simultaneamente, pelo papel da vitamina D na modulação da resposta óssea e do metabolismo fosfo-cálcico, no doente urémico.

Desde as nossas investigações iniciais no modelo de animal urémico (por nefrectomia de 5/6), descritas no início desta discussão, apercebemo-nos da provável interferência dos níveis circulantes de vitamina D e da hipotética variabilidade na expressão do respetivo recetor, nas células alvo.

Nos últimos anos, fruto da surpreendente investigação e dos resultados entusiasmantes obtidos por vários grupos de investigadores, incluindo o nosso, o papel da vitamina D nativa (ou 25-hidroxivitamina D) nos doentes com IRC adquiriu grande protagonismo (75; 19; 76; 77).

Até recentemente, a relevância da 25-hidroxivitamina D tinha sido claramente negligenciada no quadro urémico, por se assumir que a perda de função renal conduzia à incapacidade de transformar a vitamina D nativa na forma mais ativa, que é a 1, 25-dihidroxivitamina D (76; 78; 79; 80; 81).

No entanto, a identificação do recetor da vitamina D em variados órgãos e tecidos (muitos deles diretamente envolvidos na morbilidade e mortalidade associada à urémia), bem como a evidência de que, ao contrário do que se supunha, muitas destas células possuem atividade da 1- α -hidroxilase, induziu um crescente interesse na investigação do metabolismo da 25-hidroxivitamina D (82; 83; 84; 85; 86; 87).

Para além dos efeitos conhecidos nas células ósseas e no metabolismo mineral, existem muitas outras ações extra-esqueléticas da vitamina D, que resultam da ligação desta vitamina aos seus recetores específicos existentes em múltiplos tecidos, nomeadamente: células musculares lisas dos vasos, células endoteliais, cardiomiócitos, células tubulares renais, hepatócitos, células dos ilhéus β do pâncreas, células tipo C da

tiroide, células da parótida, células do aparelho gastrointestinal, bem como da pele, do tecido mamário, dos ovários, placenta e endométrio, dos espermatozóides e de muitos outros tecidos, incluindo os neurónios cerebrais. No sistema imunitário existem recetores específicos para a vitamina D no timo, na medula óssea, bem como nos linfócitos T e B (88) (89) (90; 91; 92; 93; 94).

Estamos inteiramente de acordo com a posição de Jorge Cannata, ao defender que o papel da 25-hidroxitamina D no metabolismo ósseo e mineral do quadro urémico tem sido negligenciado (95). Na verdade, parece ser precisamente no contexto do quadro urémico, e perante a deficiência em vitamina D ativa, que o papel da 25 hidroxitamina D assume maior relevância (96).

Estudos *in vitro*, com recurso a técnicas de ativação transcripcional, mostram que a 25 hidroxitamina D é apenas cerca de 500 vezes menos ativa que o calcitriol. Esta diferença é relativamente pequena, sobretudo na presença de deficiência em calcitriol, como é característica dos quadros urémicos. Nestas circunstâncias, níveis séricos normais de 25 hidroxitamina D, isto é, superiores a 30 ng/mL são suficientes para ativar os recetores da vitamina D (97).

A população urémica apresenta um risco muito aumentado de insuficiência ou deficiência em vitamina D nativa, a qual é de causa multifactorial, como discutimos no capítulo 6, incluindo a deficiente ingestão, insuficiente exposição às radiações ultravioleta tipo B e também a deficiente síntese hepática, que foi recentemente descrita (98).

Tal como John Cunningham e Daniel Zehnder, também nós somos da opinião que a insuficiência / deficiência em vitamina D nativa nos doentes com IRC constitui uma endemia, quase sempre desvalorizada e não diagnosticada (99).

Parece-nos também que qualquer estudo prospetivo para avaliar a eficácia e segurança de novos fármacos (análogos da vitamina D, calcimiméticos, etc.) no tratamento das anomalias do eixo rim-osso-paratiróides-intestino-vasos deve ter um braço controlo (placebo) no qual seja corrigida a deficiência em vitamina D nativa (99).

Precisamente por estarmos conscientes desta insuficiência / deficiência endémica em vitamina D nativa, resolvemos começar por fazer o diagnóstico da mesma, na nossa população de hemodialisados (16).

Num segundo tempo, procedemos à suplementação, em vitamina D nativa, dos doentes com insuficiência / deficiência e fizemos, num estudo prospetivo, a avaliação da evolução de diversos fatores de risco de doença cardiovascular, ou marcadores laboratoriais de inflamação ou de disfunção cardíaca (17).

Na nossa investigação, baseada numa avaliação de 223 hemodialisados, os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D apresentaram-se baixos e correlacionaram-se negativamente, e de forma muito significativa ($r = -0,25$; $P < 0,001$), com os níveis de proteína C reativa (16). Na análise multivariada desta população, os níveis reduzidos de 25-hidroxivitamina D associaram-se a hipoalbuminemia (IC de 95%: 1,24 a 2,68; $P = 0,003$).

Tal como nós, também Picoits-Filho apenas encontrou correlação negativa entre inflamação (avaliada pela PCR) e a 25-hidroxivitamina D, mas não com a 1,25-dihidroxivitamina D (61).

Como discutimos no capítulo 6, este facto pode dever-se à dificuldade e pouca reprodutibilidade dos doseamentos de 1,25-dihidroxivitamina D, embora não se possa excluir que a forma da vitamina D nativa possa ter mais efeitos pleotróficos, nomeadamente nos processos inflamatórios, que a forma dihidroxilada desta vitamina.

Parece existir um elo de ligação direto entre a deficiência em vitamina D e o aumento da morbidade e mortalidade cardiovascular, o qual é suportado por múltiplos estudos de investigação experimental e clínica (100; 101; 102; 103; 104; 105; 106; 107).

A hipovitaminose D severa, que resulta dos níveis elevados de FGF-23 observados na IRC, induz o aumento da renina e conseqüentemente da angiotensina I e da angiotensina II. Quando a angiotensina II está elevada, vai diminuir a expressão de Klotho no rim e aumentar o FGF-23, o que vai perpetuar o processo, num ciclo vicioso. Deste modo, o eixo vitamina D – FGF23 - Klotho parece influenciar e ser influenciado, diretamente, pelo eixo renina – angiotensina - aldosterona (108).

A ativação do sistema renina-angiotensina induz hipertrofia e modificações pro-inflamatórias do miocárdio, pelo que a sua inibição pela vitamina D poderia justificar, em grande parte, os efeitos cárdio-protetores que têm sido associados a esta vitamina (que efetivamente se comporta como uma hormona) (109) (110).

Na nossa investigação, a que já fizemos referência anteriormente, efetuada em 223 hemodialisados, dos quais apenas 20,6% tinham níveis séricos normais de 25-hidroxivitamina D (isto é, superiores a 30 ng/mL), identificámos diversos e significativos fatores de risco cardiovascular associados a insuficiência/deficiência em vitamina D nativa (16).

Os níveis séricos reduzidos, traduzindo insuficiência ou deficiência em 25-vitamina D, correlacionaram-se negativa e significativamente com a idade ($r=-0,31$; $P<0,001$) com o diagnóstico de diabetes mellitus ($r=-0,20$; $P=0,0004$), com os níveis circulantes (\log_{10}) de BNP-“brain natriuretic peptide” ($r=-0,22$; $P=0,002$), com uma pressão de pulso elevada (superior a 65 mmHg) ($r=-0,21$; $P=0,003$) e com a presença de significativas calcificações vasculares, (definidas por um índice superior a 3, de acordo com a proposta validada por Adragão e colaboradores (111)) ($r=-0,26$; $P<0,0001$).

Também na análise multivariada, os níveis séricos de 25-vitamina D associaram-se, de forma independente, a valores patologicamente elevados de BNP ($P=0,0005$), a uma pressão de pulso superior a 65 mmHg ($P=0,0006$) e a um índice de calcificação vascular superior a 3 ($P=0,0002$) (112).

Estes resultados são relevantes, visto que níveis mais elevados de BNP associaram-se a maior mortalidade cardiovascular em hemodialisados (113; 114).

Tendo em conta que os cardiomiócitos expressam recetores para a vitamina D e que têm a possibilidade de hidroxilar a 25-vitamina D, graças à presença a 1- α -hidroxilase intracelular, ganha mais consistência a hipótese da vitamina D nativa exercer um efeito protetor da patologia cardiovascular, mediante a atuação por mecanismos endócrino, parácrino e/ou autócrino (115) (116).

No que respeita à prevalência de calcificações vasculares, que nos doentes urémicos assume características particulares, por envolver predominantemente a lâmina elástica das artérias de grande e médio/pequeno calibre (semelhantes à descritas nas “calcificações de Monckeberg”), encontrámos uma associação negativa e significativa com os níveis séricos de 25-vitamina D.

Quer na análise univariada, quer na multivariada, níveis séricos mais elevados de 25-vitamina D associaram-se a um índice de calcificação mais baixo.

O mesmo resultado já tinha sido demonstrado previamente por Cannata-Andía e colaboradores, que evidenciaram uma correlação negativa entre os níveis séricos de 25-vitamina D3 e a presença de calcificações vasculares (117), bem como, de forma indireta, por London *et al*, ao demonstrarem uma associação entre deficiência nesta vitamina e maior rigidez arterial (118).

Face a estes resultados entusiasmantes, resolvemos realizar um estudo prospetivo, com duração de um ano, em 158 doentes hemodialisados, no qual procedemos à suplementação com colecalciferol.

Na avaliação basal os níveis de 25-hidroxitamina D eram insuficientes (<30 ng/mL) em cerca de 80% dos doentes e os níveis séricos de 1,25-hidroxitamina D eram insuficientes (<20 ng/mL) em mais de 95% dos casos.

Após a suplementação com colecalciferol, observou-se um significativo aumento dos níveis séricos de 25-hidroxitamina D, de $22,3 \pm 12$ para $42 \pm 12,1$ ng/mL ($P < 0,001$), passando os doentes com níveis circulantes normais de 25-hidroxitamina D (>30 ng/mL) de 20% para 86%.

Esta intervenção terapêutica de suplementação com colecalciferol, nesta população que apresentava níveis tão deficientes em 25-hidroxitamina D, acompanhou-se de significativa redução dos níveis plasmáticos de “BNP-brain natriuretic peptide” ($P = 0,008$) e do IMVE- índice de massa do ventrículo esquerdo ($P = 0,01$).

Os resultados deste nosso estudo prospetivo, se confirmados em ensaios clínicos controlados e aleatorizados, são particularmente relevantes para uma população de doentes que apresenta uma elevadíssima taxa de mortalidade de causa cardiovascular.

A suplementação com colecalciferol, constitui uma forma fácil, segura, com boa adesão por parte dos doentes e com um elevado rácio eficácia/custo.

No entanto, ainda não sabemos se esta suplementação, *per si*, se associa a uma redução significativa de marcadores clínicos relevantes, nomeadamente da diminuição da morbidade e da mortalidade (global e cardiovascular).

O que nós já observámos (e apresentámos em gráficos de sobrevivência no capítulo 6) foi que os nossos hemodialisados com níveis séricos basais normais de 25-

hidroxivitamina D apresentaram menor morbidade (internamentos hospitalares), e menor mortalidade (global e cardiovascular) num período de observação superior a 3 anos, em comparação com os doentes que tinham níveis basais de insuficiência ou deficiência nesta vitamina (19).

Resultados concordantes foram descritos por Dobning et al, ao evidenciar um aumento da mortalidade global e cardiovascular associada a níveis baixos de 25-hidroxivitamina D (119).

No mesmo sentido vão os resultados dos estudos de Wolf et al, em doentes incidentes em hemodiálise, e os resultados de Ravani et al, evidenciando um pior prognóstico nos doentes com níveis circulantes, mais baixos, de vitamina D (120; 121).

Tal como Pilz et al e Kandula et al, que publicaram recentemente meta-análises sobre este tema, (que incluíram os nossos resultados), estamos conscientes de que grande parte do capítulo referente aos eventuais efeitos da vitamina D na mortalidade dos doentes hemodialisados está ainda por escrever (122; 123; 124).

Para demonstrar o hipotético efeito benéfico, da correção da deficiência em 25-hidroxivitamina D, nos doentes com IRC, são necessários ensaios prospetivos, aleatorizados, de longa duração e com grandes populações.

Atualmente coordenamos dois destes ensaios, que esperamos nos ajudem a obter algumas respostas às questões que foram levantadas pelos diversos estudos acima discutidos.

A publicação (que se prevê para breve) dos resultados do estudo COSMOS (“*current management of secondary hyperparathyroidism: a multicenter observational study*”) (125), que constitui o maior estudo prospetivo observacional, jamais realizado, na área da osteodistrofia renal e do metabolismo mineral, poderá, eventualmente, dar suporte a muitos dos nossos resultados, apresentados e discutidos ao longo desta dissertação, bem como estimular-nos para novas áreas de investigação futura.

A nossa investigação, desenvolvida ao longo de quase duas décadas, fez-nos partir da necessidade de implementar o diagnóstico invasivo da osteodistrofia renal, e tem-nos obrigado, constantemente, a voltar às biópsias ósseas como forma de documentar e suportar muitos dos nossos resultados originais.

Ao longo deste nosso percurso, sobressai a demonstração das limitações dos principais marcadores não invasivos da remodelação óssea e a busca constante de novos marcadores bioquímicos.

Demonstrámos que no quadro urémico a resposta das células envolvidas na remodelação óssea está significativamente alterada, o que se associou a modificações na expressão de diversos recetores celulares (nomeadamente da PTH) e/ou a alterações na “comunicação” intercelular (nomeadamente de citoquinas, fatores de crescimento e respetivos recetores).

Os nossos resultados tornam ainda muito plausível a nossa hipótese de investigação, acerca do provável efeito das membranas de hemodiálise de alto fluxo e das técnicas mais convectivas no desenvolvimento de doença óssea adinâmica, a qual demonstrámos estar presente, numa percentagem inesperadamente elevada, em doentes hemodialisados “contemporâneos” (e tratados de acordo com os “*guidelines*” atualmente em vigor).

Face à elevada prevalência de deficiência em vitamina D, que demonstrámos nos nossos doentes (e que, seguramente, reflete os níveis observados na restante população de hemodialisados portugueses), bem como aos excelentes resultados obtidos com a suplementação com colecalciferol nestes doentes, é com o maior prazer que temos observado uma modificação nas prescrições terapêuticas, que passaram a incluir, frequentemente, a suplementação em vitamina D nativa. Estamos convictos de que esta alteração de prescrição, que resultou diretamente da nossa investigação, irá associar-se a uma melhoria da morbilidade e mortalidade cardiovascular, a médio prazo.

Obviamente que, como já referimos, para o demonstrarmos, temos de desenvolver estudos aleatorizados, duplamente ocultados, e em populações suficientemente grandes. Este é um dos desafios mais interessantes, que se coloca atualmente a quem se dedica, como nós, ao estudo da osteodistrofia renal e do metabolismo fosfo-cálcico no doente urémico.

7.1. Bibliografia capítulo 7

1. *Relationships between histomorphometric features of bone formation and bone cell characteristics in vitro in renal osteodystrophy.* **Marie,J.P.; Abderrahim,L.; de Vernejoul,M.C.; Morieux,C.; Graulet,A-M.; Guéris,J.; Llach,F.** 1989, J Clin Endocrinol Metab, Vol. 69, pp. 1166-1173.
2. *Derived osteoblastic cells and control of bone formation.* **Marie,J.P.; de Vernejoul,M.C.** 1993, Bone, Vol. 14, pp. 463-468.
3. *Bone histomorphometry in hemodialysed patients.* **de Vernejoul,M.C.; Kuntz,D.; Miravet,L.; Guéris,J.; Bielakoff,J.; Ryckewaert,A.** 1981, Metab Bone Dis Relat Res, Vol. 3, pp. 175-179.
4. *Increased bone aluminum deposition after subtotal parathyroidectomy in dialyzed patients.* **de Vernejoul,M.C.; Marchais,S.; Landom,G.; Morieux,C.; Bielakoff,J.; Miravet,L.** 1985, Kidney Int, Vol. 27, pp. 785-71.
5. *Definition, evaluation and classification of renal osteodystrophy: A position statement from Kidney Disease: Improving General Outcome (KDIGO).* **Moe,S.M.; Drüeke,T.; Cunningham,J.; Goodman,W.G.; Martin,K.; Olgaard,K.; Ott,S.; Sprague,S.; Lameire,N.; Eknoyan,G.** 2006, Kidney Int, Vol. 69, pp. 1945-1953.
6. *KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention and treatment of chronic kidney disease - mineral and bone disorder (CKD-MBD).* Suppl 113, 2009, Kidney Int, Vol. 76, pp. S1-S130.
7. *Effects of sevelamer hydrochloride and calcium carbonate on renal osteodystrophy in hemodialysis patients.* **Ferreira,A.; Frazão,J.M.; Monier-Faugere,M-C.; Gil,C.; Galvão,J.; Oliveira,C.; Baldaia,J.; Rodrigues,I.; Santos,C.; Ribeiro,S; Hoenger,R.M.; Duggal,A.; Malluche,H.H.** 2008, J Am Soc Nephrol, Vol. 19, pp. 405-412.
8. *A multicenter study on the effects of lanthanum carbonate (Fosrenol) and calcium carbonate on renal bone disease in dialysis patients.* **D'Haese,P.; Spasovski,G.B.; Sikole,A.; Hutchison,A.; Freemont,T.J; Sulkova,S.; Swanepoel,C.; Pejanovic,C.; Djukanovic,L.; Coen,G.; Sulowicz,W.; Ferreira,A.; Torres,A.; Curic,S.; Popovic,M.; Dimkovic,N.; De Broe,M.E.** 2003, Kidney Int, Vol. 85, pp. S73-S78.
9. *Risk of adynamic bone disease in dialysed patients.* **Malluche,H.; Faugere,M.C.** 1992, Kidney Int, Vol. 42, pp. S62-S67.
10. *Trends in renal osteodystrophy: a survey from 1983 to 1995 in a total of 2248 patients.* **Monier-Faugere,M-C.; Malluche,H.** S-3, 1996, Nephrol Dial Transplant, Vol. 11, pp. S111-S120.

11. *K/DOQI-recommended intact PTH levels do not prevent low-turnover bone disease in hemodialysis patients.* **Barreto,F.C.; Barreto,D.V.; Moysés,R.M.A.; et,al.** 2008, *Kidney Int*, Vol. 73, pp. 771-777.
12. *The renal PTH/PTHrP receptor is down-regulated in rats with chronic renal failure.* **Ureña,P.; Kubrusly,M.; Mannstadt,M.; Hruby,M.; Trinh,M.M.; Silve,C.; et,al.** 1994, *Kidney Int*, Vol. 45, pp. 605-611.
13. *Down-regulation of the PTH/PTHrP receptor in uremia.* **Ureña,P.; Mannstadt,M.; Hruby,M.; Ferreira,A.; Segre,G.V.; Drüeke,T.** 1994, *J Bone Min Metab*, Vol. 12, pp. S87-S90.
14. *PTH/PTHrP receptor mRNA is down-regulated in epiphyseal cartilage growth plate of uremic rats.* **Ureña,P.; Ferreira,A.; Morieux,C.; Drüeke,T.; Vernejoul,M-C.** 1996, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 11, pp. 2008-2016.
15. *Parathyroidectomy does not prevent the renal PTH/PTHrP receptor down regulation in uremic rats.* **Ureña,P.; Mannstadt,M.; Hruby,M.; Ferreira,A.; Schmitt,F.; Silve,C.; Ardaillou,R.; Lacour,B.; Abou-Samra,A.-B.; Segre,G.V.; Drüeke,T.** 1995, *Kidney Int*, Vol. 47, pp. 1797-1805.
16. *25-hydroxyvitamin D3, arterial calcifications and cardiovascular risk markers in haemodialysis patients.* **Matias,P.J.; Ferreira,C.; Jorge,C.; Borges,M.; Aires,I.; Amaral,T.; Gil,C.; Cortez,J.; Ferreira,A.** 24, 2009, *Nephrol Dial Transplant*, pp. 611-618.
17. *Cholecalciferol supplementation in hemodialysis patients: effects on mineral metabolism, inflammation, and cardiac dimension parameters.* **Matias,P.J.; Jorge,C.; Ferreira,C.; Borges,M.; Aires,I.; Amaral,T.; Gil,C.; Cortez,J.; Ferreira,A.** 5, 2010, *Clin J Am Soc Nephrol*, pp. 905-911.
18. *25-Hydroxyvitamin D levels are predictors of morbidity and mortality in hemodialysis patients .* **Matias,P.; Jorge,C.; Ferreira,C.; et,al.** 2011, Abstract n°22797 - American Society of Nephrology Annual Meeting .
19. *25-hydroxyvitamin D and chronic kidney disease.* **Matias,P.; Ferreira,A.** 4, 2011, *Port J Nephrol Hipert*, Vol. 25, pp. 253-261.
20. *Plasma total versus bone alkaline phosphatase as markers of bone turnover in hemodialysis patients.* **Ureña,P.; Hruby,M.; Ferreira,A.; Ang,K.S.; de Vernejoul,M.C.** 1996, *J Am Soc Nephrol*, Vol. 7, pp. 1-7.
21. *Low serum levels of alkaline phosphatase of bone origin: a good marker of adynamic bone disease in haemodialysis patients.* **Couttenye,M.M.; D'Haese,P.; Van Hoof,V.O.** 1996, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 11, pp. 1065-1072.
22. *Urinary excretion of pyridinoline crosslinks correlates with bone turnover measured on iliac crest biopsy in patients with vertebral osteoporosis.* **Delmas,P.D.; Schlemmer,A.; Gineyts,E.; et,al.** 1991, *J Bone Min Res*, Vol. 6, pp. 639-644.

23. *Marqueurs biologiques du metabolisme osseux.* **Delmas,P.D.** 1993, Presse Med, Vol. 22, pp. 263-268.
24. *Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic woman in response to alendronate treatment.* **Garnero,P.; Shih,W.J.; Gineyts,E.; Karpf,D.B.; Delmas,P.D.** 1994, J Clin Endocrinol Metab, Vol. 79, pp. 1693-1700.
25. *Serum pyridinoline as a specific marker of collagen breakdown and bone metabolism in hemodialysis patients.* **Ureña,P.; Ferreira,A.; Kung,V.; et,al.** 1995, J Bone Min Res, Vol. 10, pp. 932-939.
26. *Characterization and assay of tartrate-resistant acid phosphatase activity in serum:Potencial use to assess bone resorption.* **Lau,K.; Orishi,T.; Wergedal,J.; et,al.** 1987, Clin Chem, Vol. 33, pp. 458-463.
27. *Development of an immunoassay for human serum osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase.* **Kraenzlin,M.E.; Lau,K-H.W.; Liang,L.; et,al.** 1990, J Clin Endocrinol Metab, Vol. 71, pp. 442-450.
28. *Correlation between histomorphometric parameters of bone resorption and serum type 5b tartrate-resistant acid phosphatase in uremic patients on maintenance hemodialysis.* **Chu,P.; Chao,T.Y.; Lin,Y.F.; Janckila,A.J.; Yam,L.T.** 5, 2003, Am J Kidney Dis, Vol. 41, pp. 1052-1059.
29. *Biology and clinical significance of tartrate-resistant acid phosphatases:new perspectives on an old enzyme.* **Janckila,A.J.; Yam,L.T.** 2009, Vol. 85, pp. 465-483.
30. *Optimization of the tartrate-resistant acid phosphatase detection by histochemical method.* **Galvão,M.J.; Santos,A.R.; Ribeiro,M.D.; Ferreira,A.; Nolasco,F.** 2011, Eur J Histochem, Vol. 55, pp. 1-4.
31. *A utilidade da biopsia óssea com histomorfometria na caracterização da osteodistrofia renal.* **Ferreira,A.; Carvalho,F.; Coelho,A.; Felicíssimo,P.; Galvão,M.J.; da Costa,M.** 1993, Rev Port Nefrol Hipert, Vol. 7, pp. 69-82.
32. *Técnica da biopsia óssea de osso não descalcificado com histomorfometria - Utilidade na caracterização da osteodistrofia renal.* **Galvão,M.J.; Ferreira,A.; Carvalho,F.; da Costa,M.** 1996, Rev Port Imunohist, Vol. 7, pp. 11-13.
33. *Biochemical markers of bone turnover in the diagnosis of renal osteodystrophy: what do we have, what do we need?* **Ferreira,A.** 1998, Nephrol Dial Transplant, Vol. 13, pp. 29-32.
34. *Spectrum of renal bone disease in end-stage renal failure patients not yet on dialysis.* **Spasovski,G.B.; Bervoets,A.R.; Behets,G.J.; et,al.** 2003, Nephrol Dial Transplant, Vol. 18, pp. 1159-1166.

35. *Inter-method variability in PTH measurements: implication for the care of CKD patients.* **Souberbielle,J-C.; Boutten,A.; Carlier,M-C.; et,al.** 2006, *Kidney Int*, Vol. 70, pp. 345-350.
36. *K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease.* **National Kidney Foundation,.** 2003, *Am J Kidney Dis*, Vol. 42, pp. S70-S77.
37. *Interpretation of serum PTH concentrations with different kits in dialysis patients according to the KDIGO guidelines: importance of the reference (normal) values.* **Cavalier,E.; Delanaye,P.; Vranken,L.; Bekaert,A-C; Carlisi,A.; Chapelle,J.P.; Souberbielle,J-C.** 2011, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. Epub ahead of print 22 September,
38. —. **Cavalier,E.; Delanaye,P.; Vranken,L.; Bekaert,A-C; Carlisi,A.; Chapelle,J.P.; Souberbielle,J-C.** 2011, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. Epub ahead of print 22 September.
39. *Sensitivity and specificity of guideline PTH targets to differentiate high and low bone turnover.* **Moe,S.M.; Bellorin-Font,E.R.; Carvalho,A.B.; D'Haese,P.C.; Drüeke,T.B.; Du,H.; Ferreira,A.; Malluche,H.H.; Sprague,S.M.** 2010
40. *International assessment of TMV classification of bone biopsy in ESKD.* **Sprague,S.M.; Hongyan,Du.; Manley,T.L.; Carvalho,A.B.; D'Haese,P.; Drüeke,T.B.; Ferreira,A.; Jorgetti,V.; Moe,S.M.; Malluche,H.H.; Bellorin-Font,E.R.** 2010
41. *Predictive value of biomarkers for bone turnover in ESKD.* **Malluche,H.H.; Bellorin-Font,E.R.; Rojas,E.; Carvalho,A.B.; D'Haese,P.C.; Drüeke,T.B.; Ferreira,A.; Jorgetti,V.; Moe,S.M.; Sprague,S.M.** 2010, abstract ,
42. *How to diagnose the different forms of renal osteodystrophy: Role of biochemical markers.* **Ferreira,A.; Drüeke,T.B.** 2000, *Am J Med Sci*, Vol. 320, pp. 85-89.
43. *Diagnosis of renal osteodystrophy: when and how to use biochemical markers and non-invasive methods; when one biopsy is needed.* **Ferreira,A.** 2000, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 15, pp. 8-14.
44. *High phosphorus diet induces vascular calcification, a related decrease in bone mass and changes in the aortic gene expression.* **Román-García,P.; Carrillo-López,N.; Fernández-Martín,J.L.; Naves-Díaz,M.; Ruiz-Torres,M.P.; Cannata-Andía,J.B.** 2010, *Bone*, Vol. 46, pp. 121-128.
45. *Vascular calcifications: pathogenesis, management and impact on clinical outcomes.* **Cannata-Andía,J.; Rodríguez-García,M; Carrillo-López,N.; Naves Díaz,M.L.; Díaz-Lopez,J.B.** 2006, *J Am Soc Nephrol*, Vol. 17, pp. S267-S273.
46. *Vascular calcification mechanisms.* **Giachelli,C.M.** 2004, *J Am Soc Nephrol*, Vol. 15, pp. 2959-2964.

47. *Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: Evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification.* **Shanahan,C.M.; Cary,N.R.; Salisbury,J.R.; et,al.** 1999, *Circulation*, Vol. 100, pp. 2168-2176.
48. *Associations between vascular calcification, arterial stiffness and bone mineral density in chronic kidney disease.* **Toussaint,N.N.; Lau,K.K.; Strauss,B.J.; Polkingjorne,K.R.; Kerr,P.G.** 2008, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 23, pp. 586-593.
49. *Vascular calcification: a stiff challenge for the nephrologist. Does preventing bone disease cause arterial disease?* **Goldsmith,D.; Ritz,E.; Covic,A.** 2004, *Kidney Int*, Vol. 66, pp. 1315-1323.
50. *Low bone volume: a risk factor for coronary calcifications in hemodialysis patients.* **Adragão,T.; Herberth,J.; Monier-Faugere,M-C.; Branscum,A.J.; Ferreira,A.; Frazão,J.M.; Dias Curto,J.; Malluche,H.H.** 2009, *Clin J Am Soc Nephrol*, Vol. 4, pp. 450-455.
51. *Hypokinetic azotemic osteodystrophy.* **Cannata-Andía,J.** 1998, *Kidney Int*, Vol. 54, pp. 1000-1016.
52. *Relationship between serum beta-2 microglobulin, bone histology, and dialysis membranes uraemic patients.* **Ferreira,A.; Ureña,P.; Ang,K.S.; Simon,P.; Morieux,C.; Souberbielle,J-C.; Vernejoul,M-C.; Drüeke,T.B.** 9, 1995, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 10, pp. 1701-1707.
53. *Beta-2-microglobulin amyloidosis and bone disease.* **Ferreira,A.; Ureña,P.; de Vernejoul,M.C.** 1994, *Rev Rhum (Engl Ed.)*, Vol. 61, pp. 23S-26S.
54. *Papel da Beta-2-microglobulina na Osteodistrofia Renal.* **Ferreira,A.; Drüeke,T.** 1995, *Rev Port Nefrol Hipert*, Vol. 9, pp. 211-216.
55. *Beta-2-microglobulin enhances insulin-like growth factor I receptor levels and synthesis in bone cell cultures.* **Centrella,M.; McCarty,T.L.; Canalis,L.** 1989, *J Biol Chem*, Vol. 264, pp. 18268-18271.
56. *Autocrine induction of collagenase by serum amyloid A-like proteins.* **Brinckerhoff,C.E.; Michell,T.I.; Karmilowicz,M.J.; et,al.** 1989, *Science*, Vol. 243, pp. 655-657.
57. *Potential role of cytokines in renal osteodystrophy.* **Ferreira,A.; Simon,P.; Drüeke,T.; Descamps-Latscha,B.** 1996, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 11, pp. 399-400.
58. *Influence of uremia and hemodialysis on circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor alfa.* **Herbelin,A.; Nguyen,A.T.; Zingraff,J.; Ureña,P.; Descamps-Latscha,B.** 1990, *Kidney Int*, Vol. 37, pp. 116-125.
59. *Elevated circulating levels of interleukin-6 in patients with chronic renal failure.* **Herbelin,A.; Ureña,P.; Nguyen,A.T.** 1991, *Kidney Int*, Vol. 39, pp. 954-960.

60. *Impaired release of interleukin-6 from human osteoblastic cells in the uremic milieu.* **Steddon,S.J.; McIntyre,C.W.; Schroeder,N.J.; Burrin,J.M.; Cunningham,J.** 2004, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 19, pp. 3078-3083.
61. *Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients.* **Pecoits-Filho,R.; Heimbürger,O.; Bárány,P; et,al.** 2003, *Am J Kidney Dis*, Vol. 43, pp. 1212-1218.
62. *Interleukin-27 inhibits human osteoclastogenesis by abrogating RANK-mediated induction of nuclear factor of activated T cells c1 and suppressing proximal RANK signaling.* **Kallioliias,G.D.; Zhao,B.; Triantafyllopoulou,A.; Park-Min,K.H.; Ivashkiv,L.B.** 2, 2010, *Arthritis Rheum*, Vol. 62, pp. 402-413.
63. *Balance between IL-1beta, TNF alpha, and their specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis: relationships with activation markers of T cells, B cells and monocytes.* **Descamps-Latscha,B.; Herbelin,A.; Nguyen,A.T.; Roux-Lombard,P.; Zingraff,J.; Moynot,A.; Verger,C.; Dahmane,D.; De Groote,D.; Jungers,P.; Dayer,J.M.** 1995, *J Immunol*, Vol. 154, pp. 882-892.
64. *Mortality, malnutrition and atherosclerosis in end-stage renal disease: What is the role of interleukin-6?* **Stenvinkel,P.; Barany,P; Heimbürger,O.; et,al.** 2002, Vol. 61, pp. S103-S108.
65. *Adenyl cyclase and interleukin 6 are downstream effectors of parathyroid hormone resulting in stimulation of bone resorption.* **Greenfield,E.M.; Shaw,S.M.; Gornik,S.A.; et,al.** 1995, *J Clin Invest*, Vol. 96, pp. 1238-1244.
66. *Serum interleukin-6 in renal osteodystrophy: relationship with serum PTH and bone remodeling markers.* **Montalban,C.; Garcia-Unzueta,M.T.; De Francisco,A.; Amado,J.A.** 1999, *Horm Metab Res*, Vol. 31, pp. 14-17.
67. *Mechanisms of disease: renal osteodystrophy.* **Hruska,K.A.; Teitelbaum,S.L.** 1995, *N Eng J Med*, Vol. 333, pp. 166-174.
68. *Osteoporosis in hemodialysis patients revisited by bone histomorphometry: a new insight into an old problem.* **Barreto,F.C.; Barreto,D.V.; Moyses,R.M.A.; Neves,C.L.; Jorgetti,V.; Draibe,S.E.; Canziani,M.E.; Carvalho,A.B.** 2006, *Kidney Int*, Vol. 69, pp. 1852-1857.
69. *Effect of type of dialysis membrane on bone in haemodialysis patients.* **Ferreira,A.; Ghazali,A.; Galvão,J.; Souberbielle,J-C.; Jehle,P.M.; Mohan,S.; Descamps-Latscha,B.; Oprisiu,R.; Fournier,A.; Drüeke,T.B.** 2001, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 16, pp. 1230-1238.
70. *On-line hemodiafiltration decreases the serum levels of TNF alfa in dialyzed patients.* **Gil,C.; Lucas,C.; Possante,C.; Jorge,C.; Gomes,F.; Candeias,M.; Lages,H.; Arranhado,E.; Ferreira,A.** 2003, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 18, pp. 447-448.
71. *A block at the toll gate.* **Mak,T.W.; Yeh,W.C.** 2002, *ature*, Vol. 418, pp. 835-836.

72. *RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism.* **Li,J.** 2000, Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 97, pp. 1566-1571.
73. *Osteoclast differentiation and activation.* **Boyle,W.B.; Simonet,W.S.; Lacey,D.L.** 2003, Nature, Vol. 423, pp. 337-342.
74. *Evaluation of bone remodeling in hemodialysis patients: serum biochemistry, circulating cytokines and bone histomorphometry.* **Ferreira,A.; Saraiva,M.; Behets,G.; Macedo,A.; Galvão,M.; D'Haese,P.; Drüeke,T.B.** 6, 2009, J Nephrol, Vol. 22, pp. 783-793.
75. *Estimates of optimal vitamin D status.* **Dawson-Hughes,B.; Heaney,R.P.; Holick,M.F.; Lips,P.; Meunier,P.J.; Vieth,R.** 2005, Osteoporos Int, Vol. 16, pp. 713-716.
76. *Ressurrection of vitamin D deficiency and rickets.* **Holick M F;** 2006, J Clin Invest, Vol. 116, pp. 2062-2072.
77. *Vitamin D deficiency.* **Holick,M.F.;** 2007, N Engl J Med, Vol. 357, pp. 266-281.
78. *High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health.* **Holick,M.F.** 2006, Mayo Clin Proc, Vol. 81, pp. 353-373.
79. *Hypovitaminosis D in medical inpatients.* **Thomas,K.K.; Lloyde-Jones,D.M.; Thadhani,R.I.; et,al.** 1998, N Engl J Med, Vol. 338, pp. 777-783.
80. *Prevalence of 25(OH) vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease stage 5 patients on hemodialysis.* **Del Valle,E.; Negri,A.L.; Aguirre,C.; Fradinger,E; Zanchetta,J.R.** 2007, Hemodial Int, Vol. 11, pp. 315-321.
81. *Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application.* **Holick,M.F.** [ed.] 78. 2009, Ann Epidemiol, Vol. 19, p. 73.
82. *Evidence for extrarenal production of 1-alpha, 25-dihydroxyvitamin D in man.* **Lambert,P.W.; Stern,P.H.; Avioli,R.C.; et,al.** 1982, J Clin Invest, Vol. 69, pp. 722-725.
83. *Extra-renal production of calcitriol in chronic renal failure.* **Dusso,A.; Lopez-Hilker,S.; Rapp,N.; Slatopolsky,E.** 1998, Kidney Int, Vol. 34, pp. 368-375.
84. *Prevalence of calcidol deficiency in CKD: A cross-sectional study across latitudes in the United States.* **LaClair,R.E.; Helman,R.N.; Karp,S.L.; et,al.** 2005, Am J Kidney Dis, Vol. 45, pp. 1026-1033.
85. *Prevalence of vitamin D inadequacy among postmenopausal North American women receiving osteoporosis therapy.* **Holick,M.F.; Siris,M.F.; Binkley,N.; et,al.** 2005, J Clin Endocrinol Metab, Vol. 90, pp. 3215-3224.

86. *Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men.* **Giovannucci,E.; Liu,Y.; Rimm,E.B.; et,al.** 2006, J Natl Cancer Inst, Vol. 98, pp. 451-459.
87. *Redefining vitamin D insufficiency.* **Malabanan,A.; Veronikis,I.E.; Holick,M.F.** 1998, Lancet, Vol. 351, pp. 805-806.
88. *Vitamin D.* **Dusso,A.S.; Brown A.J.;Slatopolsky E.;** 2005, Am J Physiol Renal Physiol, Vol. 289, pp. F8-F28.
89. *Overview of general physiologic features and functions of vitamin D.* **DeLuca,H.F.;** 2004, Am J Clin Nutr, Vol. 80, pp. (S)1689-(S)1696.
90. *Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands.* **Nagpal,S.; Na,S.; Rathnachalam,R.** 5, 2005, Endocr Rev, Vol. 26, pp. 662-687.
91. *Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction.* **Chiu, K.C.;Chu, A.;Go, V.L.W.; Saad, M.F.** 79, 2004, Am J Clin Nutr, pp. 820-825.
92. *Impaired vitamin D metabolism and response in spontaneously diabetic GK rats.* **Ishimura,E.; Nishizawa,Y.; Koyama,H.** 1995, Miner Electrolyte Metab, Vol. 21, pp. 205-210.
93. *Role of vitamin D receptor activators on cardiovascular risk.* **Valdivielso,J.M.; Ayus,J.C.** Supp 111, 2008, Kidney Int, Vol. 74, pp. S44-S49.
94. *Systematic Review: Vitamin D and Calcium Supplementation in Prevention of Cardiovascular Events .* **Wang,L.; Manson,J.E.; Song,Y.; Sesso,H.D.** 2010, Ann Int Med, Vol. 152, pp. 315-323.
95. *Vitamin D deficiency: a neglected aspect of disturbed calcium metabolism in renal failure.* **Cannata-Andía,J.; Alonso,C.G.** 2002, Nephrol Dial Transplant, Vol. 17, pp. 1875-1878.
96. *Vitamin D status and secondary hyperparathyroidism: the importance of 25-hydroxyvitamin D cut-off levels.* **Gomez-Alonso,C.; Naves-Diaz,M.L.; Fernandez-Martin,J.L.; et,al.** 2003, Kidney Int, Vol. 85, pp. S44-S48.
97. *Serum levels of 1,25-dihydroxyvitamin D, 24,25-dihydroxyvitamin D, and 25-hydroxyvitamin D in nondialysed patients with chronic renal failure.* **Ishimura,E.; Nishizawa,Y.; Inaba,M.** 1999, Kidney Int, Vol. 55, pp. 1019-1027.
98. *Reduced hepatic synthesis of calcidiol in uremia.* **Michaud,J.; Naud,J.; Ouimet,D.; et,al.;** . 2010, J Am Soc Nephrol, Vol. 21, pp. 1488-1497.
99. *New vitamin D analogs and changing therapeutic paradigms.* **Cunningham,J.; Zehnder,D.** 2011, Kidney Int, Vol. 79, pp. 702-707.

100. *Hypovitaminosis D Is Associated with Systemic Inflammation and Concentric Myocardial Geometric Pattern in Hemodialysis Patients with Low iPTH Levels.* **Bucharles,S; Barberato,S.H.; Stinghen,A.E.; et,al.** 4, 2011, *Nephron Clin Pract*, Vol. 118, pp. 384-391.
101. *Impact of hypovitaminosis D and alfacalcidol therapy on survival of hemodialysis patients: results from the French ARNOS study.* **Jean,G.; Lattailade,D.; Genet,L.; et,al.** 2011, *Nephron Clin Pract*, Vol. 118, pp. 204-210.
102. *Myocardial infarction is inversely associated with plasma 25-hydroxyvitamin D3 levels: a community-based study.* **Scragg,R.; Jackson,R.; Holdaway,I.M.** 1990, *Int J Epidemiol*, Vol. 19, pp. 559-563.
103. *Systematic review: vitamin D and cardiometabolic outcomes.* **Pittas,A.G.; Chung,M.; Trikalinos,T.; et,al.** 2010, *Ann Int Med*, Vol. 152, pp. 307-314.
104. *The role of vitamin D in left ventricular hypertrophy and cardiac function.* **Achinger,S.G.; Ayus,J.C.** Supp 95, 2005, *Kidney Int*, Vol. 67, pp. S37-S42.
105. *Vitamin D deficiency an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor?* **Lee,J.H.; O'Keefe,J.H.; Bell,D.; Hensrud,D.D.; Holick,M.F.** 2008, *J Am Coll Cardiol*, Vol. 52, pp. 1949-1956.
106. *Vitamin D deficiency and myocardial diseases.* **Pilz,S.; Tomaschitz,A.; Drechsler,C.; Dekker,J.M.; März,W.** 8, 2010, *Mol Nut Food Res*, Vol. 54, pp. 1103-1113.
107. *Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease.* **Wang,T.J.; Pencina,M.J.; Booth,S.L.; et,al.** [ed.] 511. 2008, *Circulation*, Vol. 117, p. 503.
108. *Cross talk between the renin-angiotensin-aldosterone system and vitamin D-FGF-23-Klotho in chronic kidney disease.* **Borst,M.H.; Vervloet,M.G.; Wee,P.M.; Navis,G.** 2011, *J Am Soc Nephrol*, Vol. 22, pp. 1603-1609.
109. *1,25-dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system.* **Li,Y.C.; Kong,J.; Wei,M.; Chen,Z.F.; Liu,S.Q.; Cao,L.P.** 2002, *J Clin Invest*, Vol. 110, pp. 229-238.
110. *Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system.* **Li, Y.C.;** 88, 2003, *J Cell Biochem*, pp. 327-331.
111. *A simple vascular calcification score predicts cardiovascular risk in haemodialysis patients.* **Adragão,T.; Pires,A.; Lucas,C.; et,al.** 2004, *Neprol Dial Transplant*, Vol. 19, pp. 1480-1488.
112. *Brain natriuretic peptide levels predict morbidity and mortality in hemodialysis patients.* **Matias,P.; Jorge,C.; Aires,I.; et,al.** 2009, *Port J Nephrol Hipert*, Vol. 23, pp. 249-255.

113. *Plasma concentrations of brain natriuretic peptide as an indicator of ventricular function in patients on hemodialysis.* **Nitta,K.; Kawashima,A.; Yumura,W.; et,al.** 1998, Am J Nephrol, Vol. 18, pp. 411-415.
114. *Value of B-type natriuretic peptide in diagnosing left ventricular dysfunction in dialysis-dependent patients.* **Zeng,C.; Wei,T.; Jin,L.; et,al.** 2006, Intern Med J, Vol. 36, pp. 552-557.
115. *Extra-renal 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in human health and disease.* **Hewison,M.; Burke,F.; Evans,K.N.; et,al.** 20, 2007, J Steroid Biochem Mol Biol, pp. 316-324.
116. *Expanding role for vitamin D in chronic kidney disease: importance of blood 25-OH-D levels and extra-renal 1-alpha-hydroxylase in the classical and non-classical actions of 1-alpha, 25-dihydroxyvitamin D3.* **Jones,G.;** 20, 2007, Semin Dial, pp. 316-324.
117. *Vascular calcifications: pathogenesis, management and impact on clinical outcomes.* **Cannata-Andía,J.; Rodriguez-Garcia,M; Carrillo-López,N.; Naves Diaz,M.L.; Diaz-Lopez,J.B.** 2006, J Am Soc Nephrol, Vol. 17, pp. S267-S273.
118. *Mineral metabolism and arterial functions in end stage renal disease: Potential role of 25-hydroxyvitamin D deficiency.* **London,G.M.; Guérin,A.P.; Verbeke,F.H.; et,al.** 2007, J Am Soc Nephrol, Vol. 18, pp. 613-620.
119. *Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality.* **Dobnig,H.; Pilz,S.; Scharnagl,H.; et,al.** 2008, Arch Int Med, Vol. 168, pp. 1340-1349.
120. *Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients.* **Wolf,M.; Shah,O.; Gutierrez,O.; Ankers,E.; Monroy,M.; Tamez,H.; Steele,D.; Chang,Y.; Camargo Jr,C.A.; et al.** 2007, Kidney Int, Vol. 77, pp. 1004-1013.
121. *Vitamin D levels and patient outcome in chronic kidney disease.* **Ravani,P.; Malberti,F.; Tripepi,G.; et,al.;** 2008, Kidney Int, Vol. 75, pp. 88-95.
122. *Vitamin D status and mortality in chronic kidney disease.* **Pilz,S.; Tomaschitz,A.; Friedl,C; et,al.** 2011, Nephrol Dial Transplant.
123. *Vitamin D status and mortality risk in CKD: a meta-analysis of prospective studies.* **Pilz,S.; Simona,I.; ; Zittermann,A.** 2011, Am J Kidney Dis.
124. *Vitamin D supplementation in chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies and randomized controlled trials.* **Kandula,P.; Dobre,M.; Shold,J.D.; Schreiber Jr,M.J.; Mehrotra,R.; Navaneethan,S.D.** s.l. : Clin J Am Soc Nephrol, 2011, Vol. 6, pp. 50-62.

125. *Current management of secondary hyperparathyroidism: a multicenter observational study (COSMOS)*. Cannata-Andía,J.B.; Fernández-Martín,J.L.; Zoccali,C; London,G.M.; Locatelli,F.; Ketteler,M.; Ferreira,A.; Covic,A.; Floege,J.; Górriz,J.L.; Rutkowski,B.; Memmos,D.E.; Verbeelen,D.; Tielemans,C.; Teplan,V.; Bos,W.J.; Nagy,J.; Ktamar,R.; Golssmith,D.J.; Ma. 2008, J Nephrol, Vol. 21, pp. 290-298.

8. Comentários finais e perspectivas de investigação futura

Há quase duas décadas, foi-nos transmitida a necessidade de implementar e desenvolver em Portugal o diagnóstico invasivo da doença óssea e metabólica associada à insuficiência renal crónica.

Os nossos resultados, discutidos ao longo dos capítulos anteriores, ilustram um longo caminho, que extravasou bastante a realização de biópsias ósseas e o diagnóstico invasivo da osteodistrofia renal.

Ao longo dos anos e em diferentes países, deparámo-nos com a dificuldade crescente de muitos nefrologistas continuarem a fazer biópsias ósseas para o diagnóstico da ODR. As razões para este declínio foram várias: trata-se duma técnica invasiva, frequentemente vista pelos nefrologistas como demasiado cruenta, dispendiosa, que implica um elevado consumo de tempo e uma curva de aprendizagem longa. Paralelamente, após a interrupção da utilização do hidróxido de alumínio como captador do fósforo (na maioria dos centros), assumiu-se que a realização das biópsias ósseas era relevante apenas nas áreas da investigação clínica e animal.

Curiosamente, as *guidelines* KDIGO 2009 fizeram renascer a importância da realização de biópsias ósseas para o diagnóstico da osteodistrofia renal no doente urémico, propondo inclusivamente indicações muito precisas para a realização desta técnica invasiva (1).

Estas indicações estão em total sintonia com o que tínhamos proposto, num artigo de revisão sobre este tema, no final da década de 90 (2).

Para além da montagem desta técnica de diagnóstico relevante para a terapêutica dos nossos doentes, pretendemos integrar linhas de investigação experimental e clínica, em desenvolvimento por grupos internacionais que se dedicavam (há longo tempo e com reconhecido prestígio científico) ao diagnóstico da osteodistrofia renal.

Tendo atualmente mais de 500 biópsias ósseas de osso não descalcificado, realizadas e interpretadas, no laboratório de morfologia renal do Hospital de Curry Cabral, atingimos uma casuística que nos tem permitido avaliar e validar diversos marcadores bioquímicos de remodelação óssea no doente urémico, bem como dar suporte a diferentes opções terapêuticas.

Como referimos ao longo desta dissertação e discutimos no capítulo anterior, apesar do elevado número de biopsias ósseas, avaliadas recentemente num grupo de estudo da KDIGO que integramos, não foi possível aumentar significativamente a sensibilidade nem a especificidade dos marcadores convencionais da remodelação óssea (como a paratormona e a isoforma óssea da fosfatase alcalina) no diagnóstico da osteodistrofia renal.

O grande desafio continua a colocar-se no diagnóstico da osteodistrofia renal no *doente individualizado*, tendo em conta a impossibilidade de fazer biopsias ósseas repetidas e as limitações dos marcadores bioquímicos da ODR, evidenciados por nós e por muitos outros autores (3).

A validação de novos marcadores bioquímicos da remodelação óssea, numa fase em que os conhecimentos da fisiopatologia da doença óssea e metabólica foram enriquecidos com novos interlocutores como o FGF-23, a Klotho e a Esclerostina / SOST (4; 5), é uma linha de investigação futura particularmente atrativa, para a qual esperamos poder contribuir.

Com base nos nossos resultados, propomos o diagnóstico não invasivo da doença óssea e metabólica no doente urémico, através da interpretação conjunta e simultânea de diversos marcadores (habitualmente a paratormona, a isoforma óssea da fosfatase alcalina e um marcador da reabsorção óssea, podendo ser a piridinolina ou a fosfatase ácida resistente ao ácido tártrico) (6).

Estamos inteiramente de acordo com as *guidelines* da KDIGO, nas quais é proposta a interpretação destes marcadores bioquímicos da remodelação óssea, de forma dinâmica, e em função da respetiva tendência evolutiva (1).

Os resultados da nossa investigação (7) e do grupo brasileiro de Barreto e colaboradores (8) contribuíram para o estabelecimento dos limites de paratormona, propostos em 2009 nas *guidelines* KDIGO (com um intervalo muito largo, entre 2 e 9 vezes o limite superior do normal). Neste intervalo de PTH circulante, encontrámos todos os diagnósticos histológicos possíveis e só abaixo ou acima daqueles limites seria de esperar, com grande probabilidade, o diagnóstico de doença óssea adinâmica ou de doença óssea de elevada remodelação, respetivamente, respetivo

Desejamos, no futuro, validar estes intervalos de PTH em doentes suplementados em vitamina D, após correção dos níveis de deficiência / insuficiência em calcidiol.

Também a hipotética interferência dos depósitos de ferro e de magnésio na frente de mineralização óssea (em doentes tratados com estes metais como captadores do fósforo) justifica, em nossa opinião, uma investigação futura, para a qual esperamos contribuir. Não existem quaisquer resultados referentes a biópsias ósseas de doentes tratados com carbonato de magnésio, sendo de prever que para além dos efeitos indiretos (mediados pela redução do fósforo), o magnésio possa ter outros efeitos particularmente relevantes nos doentes urémicos, nomeadamente os associados à inibição de síntese / libertação de paratormona (9). As ações inibidoras da cristalização e da mineralização, bem como a menor associação com calcificações vasculares, recentemente descritas num modelo animal urémico suplementado com carbonato de magnésio, levam-nos a considerar este projeto de investigação prioritário e bastante promissor (10).

Na sequência dos nossos resultados, em estudos de corte transversal, evidenciando uma insuficiência / deficiência em vitamina D na maioria dos doentes com insuficiência renal, estamos particularmente interessados nos resultados da suplementação com colecalciferol, em doentes incidentes em hemodiálise, “naïve” para o tratamento com esta vitamina (hormona). Num estudo prospetivo, aleatorizado e com dupla ocultação que acabamos de iniciar, pretendemos avaliar as ações esqueléticas e extra esqueléticas da suplementação com colecalciferol nestes doentes incidentes em hemodiálise.

Face aos efeitos imunomoduladores da vitamina D, desejamos revisitar o tema das ativação osteoclástica e osteoblástica mediada por citoquinas e por fatores de crescimento local e sistémico. Pretendemos avaliar a interferência do estado de carência / suficiência em calcidiol nos níveis séricos das citoquinas que, na nossa investigação anterior, se associaram a ativação / inibição da remodelação óssea. O conhecimento destas hipotéticas interferências poderá justificar alguns dos resultados por nós obtidos anteriormente e condicionar diferentes atitudes terapêuticas.

8.1. Bibliografia do Capítulo 8

1. *KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention and treatment of chronic kidney disease - mineral and bone disorder (CKD-MBD)*. Suppl 113, 2009, *Kidney Int*, Vol. 76, pp. S1-S130.
2. *Biochemical markers of bone turnover in the diagnosis of renal osteodystrophy: what do we have, what do we need?* **Ferreira,A.** 1998, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 13, pp. 29-32.
3. *Diagnosis of renal osteodystrophy: when and how to use biochemical markers and non-invasive methods; when one biopsy is needed.* **Ferreira,A.** 2000, *Nephrol Dial Transplant*, Vol. 15, pp. 8-14.
4. *Targeted ablation of FGF-23 demonstrates an essential physiological role of FGF-23 in phosphate and vitamin D metabolism.* **Shimada,T.; Kakitani,M.; Yamazaki,Y.; et,al.** 2004, *J Clin Invest*, Vol. 113, pp. 561-568.
5. *FGF-23: its role in renal bone disease.* **Fukagawa,M.; Kazama,J.J.;** 2006, *Pediatr Nephrol* , Vol. 21, pp. 1802-1806.
6. *How to diagnose the different forms of renal osteodystrophy: Role of biochemical markers.* **Ferreira,A.; Drüeke,T.B.** 2000, *Am J Med Sci*, Vol. 320, pp. 85-89.
7. **Ferreira,A.; Frazão,J.M.; Monier-Faugere,M-C.; Gil,C.; Galvão,J.; Oliveira,C.; Baldaia,J.; Rodrigues,I.; Santos,C.; Ribeiro,S; Hoenger,R.M.; Duggal,A.; Malluche,H.H.**
8. *K/DOQI-recommended intact PTH levels do not prevent low-turnover bone disease in hemodialysis patients.* **Barreto,F.C.; Barreto,D.V.; Moysés,R.M.A.; et,al.** 2008, *Kidney Int*, pp. 771-777.
9. *Inverse correlation between serum magnesium and parathyroid hormone in peritoneal dialysis patients: a contributing factor to adynamic bone disease?* **Wei,M.; Esbaei,K.; Bargman,J.M.; Oreopoulos,D.G.** 2006, *INT Urol Nephrol*, Vol. 38, pp. 317-322.
10. *Relationship between Magnesium and Clinical Biomarkers on Inhibition of Vascular Calcification.* **Salem,S.; Bruck,H.; Bahlmann,F.H.; et,al.** 1, 2012, *Am J Nephrol*, Vol. 35, pp. 31-39.

9. Resumos

9.1. Resumo

Os resultados das nossas investigações, apresentadas ao longo desta dissertação, contribuíram para a otimização do diagnóstico invasivo e não invasivo da osteodistrofia renal e permitiram evidenciar a relevância, para a expressão clínica e histológica da ODR, de algumas particularidades específicas da população hemodialisada, nomeadamente: a utilização de membranas de hemodiálise mais biocompatíveis e com elevada permeabilidade, o recurso a técnicas de hemodiafiltração com otimização da capacidade convectiva, as limitações dos marcadores bioquímicos de remodelação óssea ou a insuficiência / deficiência em vitamina D nativa (bem como os resultados da suplementação com esta vitamina).

Testámos, pela primeira vez em doentes hemodialisados, novos marcadores da formação e reabsorção óssea, que validámos mediante a comparação com os resultados da histomorfometria óssea.

No seu conjunto, e de forma integrada, as nossas investigações permitiram-nos:

- Evidenciar a diminuição da expressão do recetor da PTH/PTHrP na cartilagem de crescimento, num modelo animal de IRC, o que explica, pelo menos em parte, o atraso de crescimento observado nesta patologia, bem como a diminuição da resposta à ação da PTH;
- Demonstrar as vantagens da determinação da isoforma óssea da fosfatase alcalina, em relação à fosfatase alcalina total, no diagnóstico diferencial entre baixa e elevada remodelação óssea;
- Utilizar, pela primeira vez em hemodialisados, a piridinolina e a desoxipiridinolina no diagnóstico da reabsorção óssea. Este foi o primeiro marcador sérico específico da atividade osteoclástica, utilizado com sucesso em doentes anúricos em hemodiálise. Evidenciamos uma excelente correlação destes dois marcadores bioquímicos com a superfície osteoclástica e com o número de osteoclastos/mm²;
- Demonstrar as acentuadas limitações de outros marcadores da formação e reabsorção óssea (nomeadamente a osteocalcina, o propeptido carboxiterminal

do procolagénio tipo I-PICP, e o Telopectido do colagénio tipo I – ICTP) com base nas correlações entre os doseamentos séricos ou plasmáticos destes marcadores e a biópsia óssea com avaliação histomorfométrica;

- Evidenciar as limitações induzidas pela sobrecarga alumínica na interpretação dos níveis séricos dos marcadores não invasivos da remodelação óssea;
- Testar a eficácia e segurança da utilização de “*microdoses*” de desferroxamina na terapêutica da intoxicação alumínica, em doentes com acentuada exposição a este metal;
- Demonstrar que os doentes hemodialisados cronicamente com dialisadores de poliacrilonitrilo (membranas de alta permeabilidade), apresentavam menor ativação osteoblástica e osteoclástica, que os doentes dialisados com membranas de cuprofano (baixa permeabilidade), sendo os níveis de iPTH semelhantes em ambos os grupos estudados.

Estes resultados apontam para uma menor ativação da remodelação óssea quando se utilizam membranas de hemodiálise mais biocompatíveis e/ou de maior permeabilidade, o que se poderá relacionar com a ultrafiltração de mediadores da ativação celular ou com a menor ativação dos mecanismos estimuladores da remodelação óssea, por parte destas membranas.

Entre os mediadores da remodelação óssea que demonstrámos serem relevantes e estarem aumentados no soro de hemodialisados com membranas de baixo fluxo, contam-se a beta-2-microglobulina (β 2-M) e algumas citocinas, com ação estimuladora das linhagens celulares envolvidas na remodelação óssea.

Demonstrámos igualmente uma correlação positiva dos níveis séricos de β 2-M com os níveis séricos da osteocalcina, da isoenzima óssea da fosfatase alcalina (marcadores da formação óssea) e com os níveis séricos da piridinolina (marcador da reabsorção óssea). Os níveis séricos de β 2-M correlacionaram-se ainda, de forma negativa, com o volume osteoide (matriz óssea não calcificada).

Nestes doentes hemodialisados, demonstrámos a presença de níveis séricos aumentados da interleucina-1, do antagonista do recetor da interleucina-1, da interleucina-6 e do recetor solúvel da interleucina-6.

Salientamos as relações inversas que observámos, por um lado entre os níveis de antagonista do recetor da interleucina-1 e a superfície osteoblástica, e por outro lado entre o rácio do recetor da interleucina-6 / interleucina-6 (IL6-r/IL6) e a superfície osteoclástica.

De acordo com estes nossos resultados originais, entendemos que a interferência nos níveis circulantes e na ativação local destes mediadores poderá justificar, em grande parte, o aumento da prevalência de doença óssea adinâmica, descrita por nós e por outros grupos.

Evidenciámos uma elevadíssima prevalência de doença adinâmica (>50% dos doentes), numa população de hemodialisados sem exposição prévia ao alumínio, tratados de acordo com os K/DOQI “*guidelines*” e que ao longo de um ano mantiveram níveis séricos de cálcio e de fósforo controlados.

Consequentemente, os doentes tratados de forma otimizada apresentaram uma prevalência surpreendentemente elevada de doença adinâmica.

Os nossos resultados (classificados com o grau de evidência máxima pelos peritos KDIGO) contribuíram para dar suporte à grande diferença nos *guidelines* K/DOQI (2003) e KDIGO (2009) no que respeita aos valores alvo da PTH.

Estamos conscientes de que o facto de termos uma percentagem tão elevada de doença óssea adinâmica nas nossas populações de hemodialisados, bem como a demonstração de que alguns doentes com valores de PTH intacta (2ª geração) de cerca de 600 pg/ml tinham doença óssea adinâmica, condicionaram os novos objetivos KDIGO para a PTH.

Os nossos resultados suportam, em nossa opinião, a adequação e vantagem da utilização dos critérios da KDIGO em vez dos KDOQI. Tendo em conta que os primeiros definem objetivos para a PTH entre 2 e 9 vezes o limite superior do normal e não se comprometem com valores alvo absolutos e rígidos (definidos previamente nos KDOQI entre 150 e 300 pg/mL), esta nova abordagem parece-nos mais correta.

Na nossa investigação clínica, caracterizámos ainda a população hemodialisada portuguesa no que respeita aos níveis séricos de calcidiol, identificando a população com suficiência, insuficiência ou deficiência em vitamina D3. Documentámos uma acentuada prevalência de insuficiência e mesmo de deficiência nesta vitamina, numa vasta população de hemodialisados, a qual, muito provavelmente, reflete de forma fidedigna, o que se pode observar na restante população de doentes portugueses IRC em estágio 5d (em diálise).

Descrevemos, pela primeira vez em doentes hemodialisados, uma associação entre deficiência em calcidiol e a presença de fatores de risco cardiovascular (que têm sido identificados nos doentes urémicos).

A nossa investigação conduziu-nos a resultados originais, ao identificar os níveis baixos de 25(OH)vitamina D3 como um provável fator de risco cardiovascular em hemodialisados, visto que a deficiência nesta vitamina se associou, de forma muito significativa, ao aumento da prevalência de calcificações vasculares, a inflamação, a pressão de pulso mais elevada, a hipertrofia ventricular esquerda, a insuficiência cardíaca e a níveis séricos aumentados de “BNP-*Brain natriuretic peptide*”.

Finalmente, numa avaliação prospetiva, de intervenção terapêutica, corrigimos a insuficiência ou deficiência em 25(OH)vitamina D3 e demonstrámos que essa correção se associou a uma redução dos fatores de risco cardiovascular. Esta última intervenção foi totalmente inovadora, visto ser a primeira avaliação prospetiva da evolução dos fatores de risco cardiovasculares, em função da suplementação com vitamina D nativa, em doentes hemodialisados.

Em resumo, pensamos que os resultados das nossas investigações, acima sumarizadas e apresentadas ao longo dos diversos capítulos desta dissertação, contribuíram para uma nova perspetiva da osteodistrofia renal e para recolocar o foco da atenção dos nefrologistas no tecido ósseo e no eixo paratormona – vitamina D – remodelação óssea.

Este eixo surge claramente envolvido em múltiplos processos fisiopatológicos, que suportam a elevada morbidade e mortalidade (nomeadamente de causa cardiovascular) observada nos doentes urémicos.

9.2. Abstract

The results of our research, presented throughout this thesis, contributed towards the optimisation of the invasive and non-invasive diagnosis of renal osteodystrophy. They have also highlighted the importance, to the clinical and histological expression of the ODR, of some specific characteristics of the haemodialysis population, including: the use of biocompatible high permeability haemodialysis membranes, the use of haemodiafiltration techniques with convection enhancement, as well as the limitations of biochemical markers of bone turnover or native vitamin D insufficiency/deficiency (along with the supplementation results of this vitamin).

New bone formation and resorption markers, which were validated by comparison with the results of bone histomorphometry, have been tested for the first time on haemodialysis patients.

As a whole, and in an integrated approach, our research enabled us to:

- Show the decrease of the PTH/PTHrP receptor expression in cartilage growth, used on an IRC animal model, which explains, to some extent, not only the delayed growth observed in this pathology, but also the slow response to PTH.
- Point out the advantages of the determination of bone isoform of alkaline phosphatase, in relation to the total alkaline phosphatase, in the differential diagnosis between low and high-bone turnover.
- Use pyridinoline and deoxypyridinoline in the diagnosis of bone resorption for the first time on haemodialysis patients. This was the first specific serum marker of the osteoclastic activity, which was successfully used on anuric patients undergoing haemodialysis treatment. We also observed an excellent correlation of these biochemical markers with the osteoclastic surface and the number of osteoclasts/mm².
- Demonstrate the sharp limitations of other markers of bone formation and resorption (namely osteocalcin, carboxyterminal propeptide of type I-PICP procollagen and telopeptide of type I-ICTP collagen) based on correlations

between these markers' serum or plasma assays and bone biopsy with histomorphometric assessment.

- Show the limitations induced by aluminium overload in the interpretation of serum levels of bone remodelling non-invasive markers.
- Test the efficacy and the safety of the use of deferoxamine “microdoses” for treatment of aluminium overload among patients with high levels of serum aluminium.
- Demonstrate that patients with chronic haemodialysis dialysers of polyacrylonitrile (high permeability membranes) show a lower osteoblastic and osteoclastic activation than those undergoing dialysis with cuprofan membranes (low permeability), being the iPTH levels similar in both groups of patients.

These findings point towards a lower activation of bone remodelling when using more biocompatible dialysis membranes and/or of higher permeability, which may relate to the ultrafiltration of cell activation mediators or to the lower activation of the stimulating mechanisms of bone remodelling, regarding the membranes.

Beta-2-microglobulin (β 2-M) and some cytokines that play a role/participate in bone remodelling are among the bone remodelling mediators, which we demonstrated to be relevant and to be increased in the serum of haemodialysis with low flow membranes.

We also proved that there is a positive correlation of serum β 2-M levels not only with serum osteocalcin levels, of the bone isoenzyme of alkaline phosphatase (bone forming markers), but also with levels of serum pyridinoline (bone resorption marker). Serum β 2-M levels correlate negatively with the volume of osteoid (uncalcified bone matrix).

We also demonstrated the presence of elevated serum levels of interleukin-1, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in haemodialysis patients.

We stress the inverse relationship which we observed on one hand between the interleukin-1 receptor antagonist levels and the osteoblastic surface and on the other between the ratio of interleukin-6 receptor / interleukin-6 (IL6-r/IL6) and the osteoblastic surface.

According to these unique findings, we believe that the interference in the circulating levels and in the local activation of these mediators may partly explain the rising prevalence of adynamic bone disease.

A high prevalence of adynamic disease has also been observed in a haemodialysis population (>50% of patients) with no previous exposure to aluminium. The patients were treated according to K/DOQI guidelines and maintained controlled serum calcium and phosphorus levels over one year.

As a result, the patients who received optimised treatment showed a surprisingly high prevalence of adynamic disease.

Our results, which were ranked with the highest degree of evidence by KDIGO experts, contributed to the great difference regarding the target values of PTH in the K/DOQI (2003) and KDIGO (2009) guidelines.

We are aware that the finding of such a high percentage of adynamic bone disease in our haemodialysis population, as well as the evidence that some patients with intact PTH values (2nd generation) of 600 pg/ml suffered from adynamic bone disease, have hindered, the new KDIGO objectives to PTH.

In our opinion, our results support the suitability and the advantage of using KDIGO criteria instead of KDOQI. This seems to be the right approach when taking into consideration that KDIGO sets objectives to PTH between 2 and 9 times the normal upper limit and does not compromise with the rigid and absolute target values (between 150 and 300 pg/mL) previously defined by KDOQI.

In our clinical research, the Portuguese haemodialysis population was characterised in terms of serum calcidiol levels and identified as having vitamin D3 sufficiency, insufficiency or deficiency. It was also recorded the prevalence of severe vitamin D3 insufficiency and even deficiency in a large haemodialysis population,

which most likely provides a reliable picture of the rest of the population in IRC Portuguese patients with 5d stage (undergoing dialysis).

We described for the first time in haemodialysis patients an association between calcidiol deficiency and the presence of cardiovascular risk factors, (which have been identified on uraemic patients).

Our research led us to unique findings by having identified the low levels of 25 (OH) vitamin D3 as a likely cardiovascular risk factor in patients undergoing haemodialysis treatment, given that deficiency in this vitamin has been significantly associated not only with a rise in the prevalence of vascular calcifications, but also inflammation, left ventricular hypertrophy, high pulse pressure and high serum BNP-Brain natriuretic peptide levels.

Finally, based on a prospective assessment of therapeutic intervention, 25(OH) vitamin D3 insufficiency or deficiency was corrected and we were able to demonstrate that this same correction was associated with a reduction in cardiovascular risk factors. This was a forward-looking intervention regarding the supplementation of native vitamin D in haemodialysis patients, since it was the first prospective assessment of the evolution of cardiovascular risk factors.

In short, the results of our research, summarised above and presented throughout the various chapters of this thesis, contributed towards a new perspective of the renal osteodystrophy and also to draw the nephrologists' attention to the bone tissue and to the axis PTH – vitamin D – bone remodelling.

This axis appears clearly involved in multiple physiopathological processes, which support the high morbidity and mortality rate, (particularly of cardiovascular causes), observed in uraemic patients.

10. Chave de abreviaturas utilizadas

a.a.	Amino ácidos
AAD	Amiloidose associada à diálise
ADN	Ácido desoxi-ribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
β2-M	Beta-2 microglobulin
BFR	Bone formation rate
BMU	Bone metabolic unit
BNP	Brain natriuretic peptide
CKD-MBD	Chronic kidney disease-mineral and bone disorder
CRF	Chronic renal failure
DFG	Débito do filtrado glomerular
DMP1	Dentin matrix protein 1
DPYD	Desoxipiridinolina
FGF	Fibroblast growth factor
FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1
FGF-23	Fibroblast growth factor 23
GM-CSF	Granulocytic-macrophage colony stimulating factor
HPTH 2°	Hiperparatiroidismo secundário
IGF-I	Insulin growth factor I
IL-1	Interleukin 1
IL-1Ra	Interleukin 1 receptor antagonist
IL-1β	Interleukin 1 beta
IL-6	Interleukin 6
IL-11	Interleukin 11
IL-12	Interleukin 12
IMVE	Índice de massa do ventrículo esquerdo
IRC	Insuficiência renal crónica
KDOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
KDIGO	Kidney disease: improving general outcomes
MAR	Mineral apposition rate
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MEPE	Matrix extracellular phosphoglicoprotein
MGP	Matrix gla protein
NFATc1	Nuclear factor of activated T cells c1
OPG	Osteoprotegerin
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PTH	Parathyroid hormone / Paratohormona
iPTH	Paratohormona intacta
PTHrP	PTH related protein
PYD	Piridinolina
RANK	Receptor activator of nuclear factor kappa B
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand
ROC	Receiver operator curves
sIL-6r	Interleukin 6 soluble receptor
TGF-β	Transforming growth factor beta
TNF-α	Tumour necrosis factor alpha

TRACP	Fosfatase ácida resistente ao ácido tártrico
TRPV6	Transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6
UMO	Unidade metabólica óssea
VDBP	Vitamin D binding protein
25(OH)-D2	Ercalcidiol
25(OH)-D3	Calcidiol
1,25(OH)₂-D2	Ercalcitriol
1,25(OH)₂-D3	Calcitriol