Guido de Paula Colares Neto

**Raquitismo e osteomalácia hipofosfatêmicos
de origem genética mediados por FGF23:
caracterização molecular, óssea e renal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra. Regina Matsunaga Martin

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Colares Neto, Guido de Paula

Raquitismo e osteomalácia hipofosfatêmicos de origem genética mediados por FGF23 : caracterização molecular, óssea e renal / Guido de Paula Colares Neto. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Regina Matsunaga Martin.

Descritores: 1.Raquitismo 2.Osteomalácia 3.Raquitismo hipofosfatêmico familiar 4.Hipofosfatemia 5.Hipofosfatemia familiar 6.Endopeptidase neutra reguladora de fosfato PHEX 7.Densitometria 8.Nefrocalcinose 9.Nefrolitíase 10.Ultrassonografia 11.Tomografia computadorizada por raios X 12.Densidade óssea

USP/FM/DBD-305/15

Este trabalho foi realizado na Unidade de Doenças Osteometabólicas e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM/42) da disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Dedicatória

Dedico esta tese à minha família pelo apoio constante.
Sem ele, nada disto seria possível.

Agradecimentos

À equipe da Unidade de Doenças Osteometabólicas:

À minha orientadora, Dra. Regina Matsunaga Martin, por seu brilhantismo, simplicidade e dedicação na condução deste projeto. Foram cinco anos de convivência e amizade, nos quais aprendi a ter curiosidade pelo conhecimento científico e entendi que todo aprendizado deve ser revertido na melhoria do cuidado dos pacientes. Obrigado por ser um modelo e inspiração no meu dia a dia.

Ao Dr. Pedro Henrique Silva Corrêa pelo estímulo na busca do conhecimento através das suas perguntas perspicazes.

Ao Dr. Bruno Ferraz de Souza pelas valiosas discussões científicas e conselhos que engrandeceram meu aprendizado.

À Mariana Tenório Antunes Reis e Marcela Paula Ferraz pelo convívio nos ambulatórios.

Ao grupo do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM-42:

À Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça pela acolhida e apoio durante todo este trabalho.

Ao Dr. Ivo Jorge Prado Arnhold pela generosidade e auxílio no início deste projeto.

Ao Dr. Vinicius Nahime Brito por compartilhar os seus conhecimentos em estatística e descomplicar este campo tão árduo.

À Mariana Funari, Mirian Nishi, Maria Aparecida Medeiros, Andresa de Santi, Cristina Rossi e Denise Aragão por toda assistência e paciência comigo durante a execução do trabalho de bancada.

À Helena Valassi, Luciana Leopoldino, Giselle Yuri, Fran Pereira e a todos os funcionários do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM-42 pela colaboração nos exames laboratoriais e pelo convívio sempre agradável.

À Nilda Oliveira e Maria Aparecida da Silva pela eficiência, cuidado e disponibilidade constante em ajudar.

Aos colaboradores desta tese:

Aos pacientes e seus familiares pela oportunidade de conhecer suas histórias.

À Dra. Rosa Maria Pereira Rodrigues pela receptividade no Laboratório de Metabolismo Ósseo da Disciplina de Reumatologia da FMUSP/LIM-17 e pelas sugestões na avaliação dos parâmetros densitométricos e estruturais ósseos.

À Liliam Takayama, Jackeline Couto Alvarenga e a todos do LIM-17 pela cooperação na realização dos exames de densitometria e HR-pQCT.

Ao Dr. Ronaldo Hueb Baroni e ao Dr. Fernando Ide Yamauchi pelo auxílio na obtenção dos dados tomográficos.

À Dra. Maria Cristina Chammas, Dra. Andrea Cavallanti Gomes e ao Dr. Igor Fontenele pela colaboração com os dados de ultrassonografia.

Ao Dr. Alexander Jorge e à Dra. Maria Helena Vaisbich pelas críticas e sugestões na banca de qualificação.

A todos os assistentes e colaboradores do serviço de Endocrinologia Pediátrica do Instituto da Criança - HCFMUSP, por terem despertado em mim todo o fascínio e entusiasmo pela endocrinologia. Em especial, agradeço ao Dr. Durval Damiani pelo estímulo e ao Dr. Hamilton Cabral de Menezes Filho por ter me ensinado os primeiros conhecimentos do metabolismo ósseo.

Àqueles que vivenciaram esta jornada comigo:

À minha mãe, Maiza Colares de Carvalho, exemplo de médica e profissional, pelo seu incentivo constante para que eu pudesse ir além dos meus limites.

Ao meu pai, Raimundo Ernando de Carvalho, pela sua confiança no meu potencial e comemorações a cada vitória conquistada.

À minha irmã, Marina Colares de Carvalho, pelo seu carinho e torcida em todos os momentos e à minha sobrinha, Ana Maiza, por todos os sorrisos que me proporciona.

Aos meus avós maternos, Guido de Paula Colares (*in memoriam*) e Monisa Gomes Colares, avós paternos, João e Rita (*in memoriam*), tias, tios, primos e todos meus familiares por compreenderem a minha distância e por manterem seus braços sempre abertos aos meus retornos.

À Adriana Braz pelo incentivo para o início desta pós-graduação e por possibilitar o primeiro contato com minha orientadora.

Ao Leonardo Falangola pelo companheirismo e apoio durante esta jornada.

A todos os amigos, particularmente a JB Uchôa, Luiza Lins, Carlos Júnior, Haniery, André, Darlan, Fláubert, Gustavo, Sidnei, Peterson e Alexandre pelo carinho, acolhimento e simples gestos de solidariedade nos momentos nos quais eu mais precisei.

Aos colegas do Centro de Triagem Neonatal Dr. Tatuya Kawakami, Hospital Infantil Márcia Braidó e Hospital Infantil Darcy Vargas por todo apoio e incentivo para a conclusão deste trabalho.

Finalmente, a Deus, pelo dom da vida e por esta conquista.

*“Entender é sempre limitado.
Mas não entender pode não ter fronteiras.”
Clarice Lispector*

Normalização Adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

- Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).
- Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.
- Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras e gráficos

Lista de tabelas

Lista de anexos

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Metabolismo do fósforo	02
1.2. Raquitismo e osteomalácia	06
1.2.1. Raquitismo por aumento do PTH	07
1.2.2. Raquitismo por defeitos nos NaPi-IIa e NaPi-IIc	08
1.2.3. Raquitismo por aumento do FGF23	08
1.2.3.1. Raquitismo e/ou osteomalácia hipofosfatêmicos ligado ao X (XLHR)	09
1.2.3.2. Raquitismo e/ou osteomalácia hipofosfatêmicos autossômico dominante (ADHR)	10
1.2.3.3. Raquitismo e/ou osteomalácia hipofosfatêmicos autossômico recessivo (ARHR)	11
1.3. Avaliação da DMO e dos parâmetros estruturais ósseos	12
1.4. Nefrocalcinose e nefrolitíase	13
2. OBJETIVOS	17
3. METODOLOGIA	19
3.1. Considerações éticas	20
3.2. Casuística	20
3.2.1. Pacientes	20
3.2.2. Grupo controle	21
3.3. Avaliação clínica e laboratorial	21

3.4. Avaliação genotípica	25
3.4.1. Pesquisa de mutações por PCR e sequenciamento automático	25
3.4.1.1. Gene <i>PHEX</i>	25
3.4.1.2. Gene <i>FGF23</i>	28
3.4.2. Pesquisa de número de cópias nos genes <i>PHEX</i> e <i>FGF23</i> por MLPA	28
3.5. Avaliação da DMO e dos parâmetros estruturais ósseos	29
3.6. Avaliação de nefrocalcinose e nefrolitíase	30
3.7. Análise estatística	32
4. RESULTADOS	33
4.1. Avaliação clínica e laboratorial	34
4.2. Avaliação genotípica	38
4.2.1. Avaliação do gene <i>PHEX</i>	38
4.2.2. Avaliação do gene <i>FGF23</i>	41
4.3. Avaliação da DMO e dos parâmetros estruturais ósseos	41
4.3.1. Avaliação da DMOa por DXA	42
4.3.2. Avaliação dos parâmetros geométricos, da DMOv e da microarquitetura óssea obtidos por HR-pQCT	44
4.4. Avaliação de nefrocalcinose e nefrolitíase	51
5. DISCUSSÃO	55
5.1. Estatura nos RQ/OM hipofosfatêmicos de origem genética mediados por FGF23	56
5.2. Etiologia molecular dos pacientes com RQ/OM hipofosfatêmicos de origem genética mediados por FGF23	58
5.3. DMO e os parâmetros estruturais ósseos nos XLHR	59
5.4. Nefrocalcinose e nefrolitíase nos XLHR	63
6. CONCLUSÕES	67
7. ANEXOS	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

Listas

Lista de abreviaturas e siglas

1,25(OH) ₂ D	1,25 diidroxivitamina D = calcitriol
25OHD	25 hidroxivitamina D = calcidiol
aa	Aminoácido
ADHR	Raquitismo e/ou osteomalácia hipofosfatêmicos autossômicos dominantes
ARHR	Raquitismo e/ou osteomalácia hipofosfatêmicos autossômicos recessivos
ASARM	<i>Acidic Serine and Aspartic Acid-Rich Motif</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
BV/TV	Relação entre o volume ósseo e o volume total
Ca	Cálcio
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CASR	Receptor sensível ao cálcio
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
Ct vBMD	Densidade volumétrica cortical
Ct.area	Área cortical
Ct.Th	Espessura média da cortical
CTx	Telopectideo carboxiterminal do colágeno tipo 1
DMO	Densidade mineral óssea
DMOa	Densidade mineral óssea areal
DMOv	Densidade mineral óssea volumétrica
DMP1	<i>Dentin Matrix Phosphoprotein 1</i>
DNA	Ácido desoxirrinucleico
DP	Desvio padrão
DXA	Densitometria óssea de dupla emissão com fontes de raios-X
ENPP1	<i>Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1</i>

Es/E	Relação estatura sentada/estatura
FGF23	<i>Fibroblast Growth Factor 23</i>
FGFR1	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor type 1</i>
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GALNT3	<i>UDP-N-acetyl-alpha-d-GALactosamine-polypeptide N-acetylglactosaminyl-Transferase 3</i>
HA	Hidroxiapatita
HC	Hospital das Clínicas
HR-pQCT	<i>High Resolution peripheral Quantitative Computed Tomography</i>
IC	Intervalo de confiança
KDOQI	<i>Kidney Disease Outcomes Quality Initiative</i>
MDP- ^{99m} Tc	Metil-difosfonato ligado ao tecnécio radioativo
MEPE	<i>Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
NaPi-IIa	Cotransportadores de sódio-fósforo tipo IIa
NaPi-IIb	Cotransportadores de sódio-fósforo tipo IIb
NaPi-IIc	Cotransportadores de sódio-fósforo tipo IIc
NC	Nefrocalcinose
NL	Nefrolitíase
P	Fósforo
P1NP	Propetideo aminoterminal do colágeno tipo 1
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PHEX	<i>Phosphate-regulating gene with Homologies to Endopeptidases on the X chromosome</i>
PO ₄	Fosfato
PTH	Paratormônio
RANKL	<i>Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand</i>
RQ/OM	Raquitismo e/ou osteomalácia
RX	Raio-X
SD.1/Tb.N	Falta de homogeneidade da rede trabecular
Tb vBMD	Densidade volumétrica trabecular

Tb.area	Área trabecular
Tb.N	Número médio das trabéculas
Tb.Sp	Espaço médio entre as trabéculas
Tb.Th	Espessura média das trabéculas
TC	Tomografia computadorizada
TIO	Tumor indutor de osteomalácia
Total vBMD	Densidade volumétrica total
TRP	Taxa de reabsorção tubular de fosfato
US	Ultrassonografia
vs	<i>versus</i>
XLHR	Raquitismo e/ou osteomalácia hipofosfatêmicos ligados ao X
Z	Desvio padrão para a mesma faixa etária e sexo

Lista de figuras e gráficos

Figura 1 - Regulação da homeostase do fósforo.....	03
Figura 2 - Vias de ação dos ASARMs.....	05
Figura 3 - Manifestações clínicas e radiológicas do raquitismo.....	07
Figura 4 - O papel da fosfatúria na litíase renal.....	15
Gráfico 1 - Comparação do Z de estatura dos pacientes com RQ/OM hipofosfatêmicos segundo a faixa etária	35
Gráfico 2 - Comparação do Z de estatura dos pacientes com RQ/OM hipofosfatêmicos adultos segundo o uso de fosfato de sódio e potássio na infância e adolescência	36
Gráfico 3 – Comparação da DMOa de L1-L4 obtida por DXA entre o grupo de pacientes com XLHR e o grupo controle	42
Gráfico 4 – Comparação da DMOa de L1-L4 obtida por DXA entre os pacientes com XLHR estratificados por faixa etária e seus respectivos controles	43
Gráfico 5 – Comparação da DMOa de 1/3 distal do rádio obtida por DXA entre o grupo de pacientes com XLHR e o grupo controle	44
Gráfico 6 – Comparação da DMOv total de rádio distal obtida por HR-pQCT entre os pacientes com XLHR e seus respectivos controles	45

Gráfico 7 – Comparação da DMOv trabecular e cortical de rádio distal obtidas por HR-pQCT entre os pacientes com XLHR estratificados por faixa etária e seus respectivos controles	46
Gráfico 8 – Comparação da DMOv total de tíbia distal obtida por HR-pQCT entre os pacientes com XLHR e seus respectivos controles	47
Gráfico 9 – Comparação das DMOv trabecular e cortical de tíbia distal obtidas por HR-pQCT entre os pacientes com XLHR e seus respectivos controles	47
Gráfico 10 – Comparação da Tb.N de rádio distal obtida por HR-pQCT entre os pacientes com XLHR estratificados por faixa etária e seus respectivos controles	48
Gráfico 11 – Comparação da Tb.Sp de rádio distal obtida por HR-pQCT entre os pacientes com XLHR estratificados por faixa etária e seus respectivos controles	49
Gráfico 12 – Comparação da SD.1/Tb.N de rádio distal obtida por HR-pQCT entre os pacientes com XLHR estratificados por faixa etária e seus respectivos controles	49
Gráfico 13 – Comparação das DMOv trabecular e cortical de tíbia distal obtidas por HR-pQCT entre os pacientes com XLHR estratificados por <i>status</i> metabólico e seus respectivos controles	50
Gráfico 14 - Distribuição dos graus de NC de acordo com a US e a TC de rins e vias urinárias nos 39 pacientes com XLHR estratificados por faixa etária	52

Lista de tabelas

Tabela 1 - Exames laboratoriais: método de dosagem e coeficientes de variação intraensaio e interensaio	24
Tabela 2 - Valores de referência para os parâmetros avaliados em urina de 24h	24
Tabela 3 - Parâmetros fornecidos pela HR-pQCT	30
Tabela 4 - Mutações no gene <i>PHEX</i> em 21 casos familiares e 20 casos esporádicos de XLHR	40
Tabela 5 - Avaliação da função renal e dos fatores de risco para NC e NL nos pacientes com XLHR estratificados por faixa etária	53

Lista de anexos

ANEXO A - <i>Primers</i> para a avaliação da região codificadora dos genes <i>PHEX</i> e <i>FGF23</i> (tabelas 1 e 2)	71
ANEXO B - Dados clínicos, laboratoriais e de imagem dos pacientes com RQ/OM hipofosfatêmicos de origem genética mediados por FGF23 (figuras 1 e 2; tabelas 3 e 4)	73
ANEXO C - DMO, parâmetros geométricos e dados de microarquitetura óssea obtidos por DXA e HR-pQCT: comparação entre pacientes com XLHR e controles saudáveis (tabelas 4 a 8)	76

Resumo

Colares Neto GP. *Raquitismo e osteomalácia hipofosfatêmicos de origem genética mediados por FGF23: caracterização molecular, óssea e renal* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Introdução: raquitismo e osteomalácia hipofosfatêmicos de origem genética mediados por FGF23 (RQ/OM-FGF23) são caracterizados pelo aumento patológico dos níveis séricos de FGF23 com consequentes hiperfosfatúria e hipofosfatemia. A forma hereditária mais comum é a ligada ao X dominante (XLHR) ocasionada por mutações inativadoras no gene *PHEX*. **Objetivos:** identificar a etiologia molecular; avaliar a densidade mineral óssea (DMO) e a microarquitetura óssea e, determinar a prevalência de nefrocalcinose (NC), nefrolitíase (NL) e de alterações metabólicas urinárias em 47 pacientes com RQ/OM-FGF23 (16 crianças e 31 adultos). **Métodos:** as análises dos genes *PHEX* e *FGF23* foram realizadas pelos métodos de Sanger e MLPA. A DMO areal (DMOa) foi avaliada por densitometria óssea (DXA), enquanto a DMO volumétrica (DMOv) e os parâmetros de microarquitetura óssea foram analisados por HR-pQCT. A NC foi classificada segundo uma escala de 0-3 (0 = ausência de NC; 3 = NC grave) pelas ultrassonografia (US) e tomografia computadorizada (TC) renais. A presença de NL foi analisada pela TC renal. Fatores de risco para NC e NL foram avaliados pela urina de 24 horas. **Resultados:** foram identificadas mutações no *PHEX* em 41 pacientes (87,2%). A avaliação óssea foi realizada em 38 pacientes com XLHR que foram comparados a controles saudáveis. Os pacientes tiveram maior DMOa em L1-L4 ($p=0,03$) e menor DMOa em 1/3 distal do rádio ($p<0,01$). Em rádio distal, a DMOv total (Total.vBMD) e os componentes trabecular (Tb.vBMD) e cortical (Ct.vBMD) foram semelhantes entre os grupos. Na tíbia distal, os pacientes apresentaram menor Total.vBMD em relação aos controles devido ao déficit no Tb.vBMD ($p<0,01$). Além do mais, ao separarmos por *status*

metabólico, os pacientes descompensados tiveram menor Ct.vBMD em tíbia distal comparados aos controles ($p=0,02$). Quanto aos parâmetros estruturais, em rádio distal, os pacientes apresentaram menor número de trabéculas (Tb.N; $p=0,01$), maior espessura trabecular (Tb.Th; $p<0,01$) e maior falta da homogeneidade trabecular (SD.1/Tb.N; $p=0,02$). Na tíbia distal, eles tiveram menor Tb.N ($p<0,01$), maior separação trabecular (Tb.Sp; $p<0,01$) e maior SD.1/Tb.N ($p<0,01$). A avaliação renal foi feita em 39 pacientes com XLHR. A NC foi diagnosticada em 15 (38,5%) pacientes pelas US e TC, principalmente no grupo pediátrico em uso intensivo de fosfato. A US detectou NC em 37 (94,8%), majoritariamente como grau 1 (97%), enquanto a TC identificou NC medular em 15 (38,5%): 10 (66,7%) como grau 1 e cinco (33,3%) como grau 2. Quatro (10,2%) pacientes adultos tinham NL determinada pela CT. Além da hiperfosfatúria presente em todos os pacientes, a hipocitratúria foi a alteração metabólica mais comum (30,7%); somente dois pacientes apresentaram hipercalcúria (5,1%) e nenhum apresentou hiperossalúria. **Conclusões:** nesta casuística, a XLHR foi a principal forma hereditária de RQ/OM-FGF23. A HR-pQCT foi mais informativa do que a DXA e o compartimento ósseo trabecular foi mais afetado pela doença, particularmente na tíbia distal. Finalmente, a NC foi mais prevalente que a NL; o principal fator de risco metabólico foi a hiperfosfatúria e o tratamento intensivo com fosfato parece ser um agravante na formação da NC.

Descritores: raquitismo; osteomalácia; raquitismo hipofosfatêmico familiar; hipofosfatemia; hipofosfatemia familiar; endopeptidase neutra reguladora de fosfato PHEX; densitometria; nefrocalcinose; nefrolitíase; ultrassonografia; tomografia computadorizada por raios X; densidade óssea.

Summary

Colares Neto GP. *FGF23-mediated inherited hypophosphatemic rickets: molecular characterization, bone analysis and renal evaluation* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Background: FGF23-mediated hypophosphatemic rickets is a group of diseases characterized by a pathological increase of FGF23 serum levels, resulting in hyperphosphaturia and hypophosphatemia. In this group, the most common form of inheritance is the X-linked dominant (XLHR) caused by inactivating mutations in the *PHEX* gene. **Aims:** to identify the molecular basis; to evaluate the bone mineral density and bone microarchitecture; to determinate the prevalence of nephrocalcinosis (NC), nephrolithiasis (NL) and their related metabolic factors in 47 patients with FGF23-mediated hypophosphatemic rickets (16 children and 31 adults). **Methods:** *PHEX* and *FGF23* were analyzed by conventional Sanger sequencing and MLPA. The areal BMD (aBMD) was evaluated by dual-energy x-ray absorptiometry (DXA), while the volumetric BMD (vBMD) and the bone microarchitecture were analyzed by high-resolution peripheral quantitative computed tomography (HR-pQCT). NC was investigated by renal ultrasonography (US) and computed tomography (CT) and classified using a 0–3 scale (0= no NC and 3= severe NC). The presence of NL was determined by renal CT. Risk factors for NC and NL were evaluated by 24-hour urinary samples. **Results:** 41 patients (87.2%) presented mutations in *PHEX*. The bone analysis was made in 38 XLHR patients compared to healthy controls. XLHR patients presented higher aBMD at L1-L4 ($p=0.03$) and lower aBMD at the distal third of the radius ($p<0.01$). At the distal radius, HR-pQCT showed no differences in the vBMD neither in its trabecular (Tb.vBMD) and cortical (Ct.vBMD) components. At the distal tibia, the XLHR patients showed lower Total.vBMD ($p<0.01$) compared to controls due to decreased Tb.vBMD ($p<0.01$).

Moreover, after XLHR patients were sorted by metabolic status, the non-compensated ones revealed lower Ct.vBMD at the distal tibia compared to their respective controls ($p=0.02$). Regarding to the microarchitectural parameters, at the distal radius, XLHR patients showed lower trabecular number (Tb.N; $p=0.01$), greater trabecular thickness (Tb.Th; $p<0.01$) and more inhomogeneous trabecular network (SD.1/Tb.N; $p=0.02$). At the distal tibia, they had lower Tb.N ($p<0.01$), larger trabecular separation (Tb.Sp; $p<0.01$) and greater SD.1/Tb.N ($p<0.01$). The renal assessment was done in 39 XLHR patients. NC was diagnosed in 15 (38.5%) patients by US and CT, mainly in the pediatric group that was in phosphate treatment. US identified NC in 37 (94.8%), mostly as grade 1 (97%), meanwhile CT determined medullary NC in 15 (38.5%) patients: 10 (66.7%) as grade 1 and five (33.3%) as grade 2. Four (10.2%) adults patients had NL determined by CT. Besides hyperphosphaturia present in all XLHR patients, hypocitraturia was the most common metabolic factor (30.7%); hypercalciuria occurred in only two patients (5.1%) and none had hyperoxaluria. **Conclusions:** in our cohort, XLHR was the most prevalent form of FGF23-mediated inherited hypophosphatemic rickets. HR-pQCT was more informative than DXA and the cancellous bone compartment was the most affected by the disease particularly at the distal tibia. Finally, NC was more prevalent than NL; the main metabolic risk factor was hyperphosphaturia and the intensive treatment with phosphate seems to be an aggravating factor in the formation of NC.

Descriptors: rickets; osteomalacia; familial hypophosphatemic rickets; hypophosphatemia; familial; PHEX phosphate regulating neutral endopeptidase; densitometry; nephrocalcinosis; nephrolithiasis; ultrasonography; tomography, X-ray computed; bone density.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Metabolismo do fósforo

O fósforo é um dos principais elementos do organismo humano. Está presente nos cristais de hidroxiapatita do esqueleto, na estrutura base do DNA (ácido desoxirribonucleico), na membrana plasmática e nos ATPs (trifosfatos de adenosina); participa de reações enzimáticas e age na sinalização intracelular. Oitenta por cento do fósforo corpóreo encontra-se no esqueleto, cerca de 15% encontra-se no meio intracelular e o restante está no fluido extracelular (1).

A regulação do fósforo ocorre pelo balanço entre a absorção dietética no trato gastrointestinal e a excreção renal. Cerca de 60% do fósforo dietético é absorvido no duodeno e jejuno por meio do transporte ativo pelos cotransportadores de sódio-fósforo tipo IIb (NaPi-IIb) presentes na membrana apical dos enterócitos, além da difusão passiva nos espaços intercelulares. Oitenta a noventa por cento do fósforo excretado na urina é reabsorvido na membrana apical do túbulo proximal pelos cotransportadores de sódio e fósforo tipo IIa (NaPi-IIa) e cotransportadores de sódio e fósforo tipo IIc (NaPi-IIc). Estes são importantes para a captação de fósforo pelas células ósseas também (2) – figura 1.

Os principais reguladores do metabolismo do fósforo são o PTH (paratormônio) e o FGF23 (*Fibroblast Growth Factor 23*) (3).

O PTH é produzido pelas paratireoides e eleva a calcemia ao estimular: a reabsorção óssea, a reabsorção tubular e a absorção intestinal de cálcio através do aumento da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (1,25 diidroxivitamina D ou calcitriol). É um importante hormônio fosfatúrico ao promover a endocitose e degradação lisossomal dos cotransportadores sódio e fósforo no túbulo proximal renal (3).

Figura 1 - Regulação da homeostase do fósforo. Enquanto uma pequena parte do fósforo (P) dietético absorvido pelo intestino é responsável por suas concentrações extracelulares, a maior fração é depositada no esqueleto e o excedente é excretado pelos rins. O calcitriol [1,25(OH)₂D] estimula a absorção do fósforo ingerido e a produção de FGF23. Por sua vez, o FGF23 aumenta a fosfatúria, inibe a síntese de calcitriol e provavelmente exerce uma ação supressora sobre as concentrações de PTH via receptor FGFR/KL. O PTH aumenta a fosfatúria e estimula a síntese de calcitriol. FGFR/KL refere-se ao complexo formado pelo FGFR1 e pelo Klotho, enquanto PTH1R representa o receptor de PTH. Adaptado de *Bergwitz et al* (3).

O FGF23 é uma glicoproteína constituída por 251 aa (aminoácidos) e codificada pelo gene *FGF23*, constituído por três éxons e situado no *locus* 12p13.3 (3). É um hormônio produzido majoritariamente pelos osteoblastos e osteócitos em áreas de remodelação ativa nos ossos. Também é expresso em outros tecidos como o coração, fígado, tireoide, paratireóides e intestino (4).

Para a formação da proteína madura, o FGF23 perde sua porção aminoterminal (sequência sinalizadora composta por 24 aa) e sofre glicosilação na região 162-228 aa pela enzima GALNT3 (*UDP-N-acetyl-*

alpha-d-GALactosamine-polypeptide N-acetylgalactosaminyl-Transferase 3). O FGF23 circulante (25-251 aa) forma um complexo ternário com o FGFR1 (*Fibroblast Growth Factor Receptor type 1*) e a proteína Klotho, cofator necessário para a sua ação tecidual. Este complexo está expresso no túbulo distal renal predominantemente. Como o principal sítio de ação do FGF23 está no túbulo proximal, acredita-se que este efeito é parácrino intermediado por outra(s) fosfatonina(s) (3).

O FGF23 acelera a endocitose e a degradação lisossomal dos NaPi-IIa e NaPi-IIc na membrana tubular com consequente aumento da fosfatúria. Também, reduz a formação de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ por inibição da atividade da 1α -hidroxilase e estímulo da 24-hidroxilase (3, 4). Seu efeito sobre osso ainda permanece incerto, sendo considerado um possível modulador de mineralização nos osteoblastos durante a formação óssea (1, 3).

A produção de FGF23 é regulada pelas proteínas PHEX (*Phosphate-regulating gene with Homologies to Endopeptidases on the X chromosome*) e DMP1 (*Dentin Matrix Phosphoprotein 1*) (3, 5) – figura 1.

O PHEX é uma endopeptidase homóloga da família M13 das metaloproteases, composta por 749 aa e codificada por um gene de mesmo nome, composto por 22 éxons, localizado no *locus* Xp22.1. Está presente na membrana dos osteoblastos, odontoblastos e condrócitos da placa de crescimento, nas paratireoides, nos pulmões, no cérebro, nos músculos, nas gônadas e na pele. Uma de suas funções é controlar os níveis circulantes de FGF23 (6, 7).

O DMP1 é uma proteína SIBLING formada por 513 aa e codificada por um gene de mesmo nome, formado por seis éxons, situado no *locus* 4q21. É expressa nos tecidos ósseo e dentário, além de estar presente no cérebro, glândulas salivares, fígado, músculo, pâncreas e rins. Sua principal função é suprimir a secreção de FGF23, mas o seu mecanismo de ação não está totalmente esclarecido (8).

Os últimos 23 aa da porção carboxiterminal de proteínas da família SIBLING, que incluem o DMP1 e o MEPE (*Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein with ASARM motif*), compõem o peptídeo ASARM (*Acidic Serine and Aspartic Acid-Rich Motif*).

Figura 2 – Vias de ação dos ASARMs. (A) Via indireta: o PHEX interage com DMP1 através da sua região ASARM, promovendo a redução da expressão do FGF23. Por outro lado, a ligação do PHEX com os peptídeos ASARMs promove a degradação destes últimos. (B) Via direta: os peptídeos ASARMs estimulam a produção de FGF23 e tem uma ação direta sobre os rins com aumento da fosfatúria e diminuição da produção de calcitriol. Adaptado de David *et al* (9).

A degradação de proteínas SIBLING por proteases osteoblásticas, como a catepsina B, libera peptídeos ASARM fosforilados resistentes a proteases na circulação e no osso. Estes peptídeos aumentam a expressão do FGF23 e inibem a reabsorção tubular de fósforo com consequente prejuízo da mineralização óssea (9, 10) - figura 2.

Ao se unir a DMP1 pela região ASARM, o PHEX diminui a transcrição gênica de FGF23. Além disso, o PHEX promove a clivagem dos peptídeos

ASARM com diminuição da sua ação fosfatúrica direta e estímulo a homeostase do FGF23 (9, 10) - figura 2.

1.2. Raquitismo e osteomalácia

O raquitismo é uma doença da placa de crescimento, exclusiva da criança e do adolescente até a fusão epifisária. A hipofosfatemia, fator comum de todos os tipos de raquitismos, promove um defeito na apoptose dos condrócitos hipertróficos terminais da placa por não ativar a via mitocondrial caspase-9 dependente e impede a adequada mineralização e formação ósseas (2).

Em contraste, a osteomalácia é um defeito de mineralização dos ossos cortical e trabecular com acúmulo de tecido osteoide não mineralizado. Durante a infância e a puberdade, ela pode coexistir com o raquitismo (2).

Na infância, via de regra, o quadro clínico envolve deformidades em membros inferiores (geno varo, geno valgo e joelhos em vendaval) com o início da deambulação, alargamento de punhos e joelhos, torção anteromedial da tíbia, retardo no crescimento com baixa estatura desproporcionada e alterações odontológicas (taurodontismo e abscessos dentários) (11). Na criança, as imagens radiológicas características são o alargamento metafisário e o encurvamento lateral de fêmures e/ou tíbias – figura 3.

Quando a apresentação clínica tem início na fase adulta, os pacientes podem apresentar: redução de estatura por colapso vertebral, fraqueza muscular, fraturas de fragilidade, dores ósseas e articulares, entesopatias e alterações dentárias. Radiologicamente, a osteomalácia é caracterizada por pseudofraturas, trabeculação grosseira e rarefação óssea (1, 12, 13).

O padrão-ouro para diagnóstico de osteomalácia é a histomorfometria da biópsia de crista ilíaca, que mostra uma taxa de formação óssea

reduzida, hipomineralização irregular difusa e aumento do rebordo osteoide (1).

Figura 3 – Manifestações clínicas e radiológicas do raquitismo. (A) Geno varo; (B) Alargamento de punhos; (C) Encurvamento de fêmures e alterações metafisárias na radiografia simples de membros inferiores.

Os raquitismos e/ou osteomalácias podem ser classificados pelos mecanismos que levam à hipofosfatemia:

1.2.1. Por aumento do PTH

Nestes casos, a baixa ingestão ou má absorção de cálcio e as alterações no metabolismo da vitamina D diminuem os níveis de cálcio extracelular com consequente aumento do PTH via CASR (receptor sensível ao cálcio). Valores elevados de PTH aumentam a expressão do RANKL (*Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand*) pelos osteoblastos que estimula a maturação dos osteoclastos culminando com o aumento da reabsorção óssea e liberação de cálcio e o fósforo do esqueleto para o fluido extracelular. No entanto, a diminuição da reabsorção renal de fósforo pelo PTH leva a hipofosfatemia associada ao raquitismo e/ou osteomalácia (2).

1.2.2. Por defeitos nos NaPi-IIa e NaPi-IIc

Algumas doenças genéticas, como a cistinose (OMIM 219800), comprometem os túbulos renais de modo mais amplo e afetam os NaPi-IIa e os NaPi-IIc em diferentes graus com consequente aumento da excreção renal de fósforo, bicarbonato, aa, glicose etc. O indivíduo acometido desenvolve raquitismo e/ou osteomalácia como resultado da hipofosfatemia crônica (2). Nestes casos, outras manifestações, como a acidose metabólica e o diabetes insípido nefrogênico, costumam ser encontradas (14).

Mais especificamente, o defeito genético pode comprometer exclusivamente o gene *SLC34A3* que codifica os NaPi-IIc (OMIM 241530). Nesta situação, a perda renal é exclusiva de fósforo gerando hipofosfatemia, aumento da produção de calcitriol e consequente hipercalcúria (2).

1.2.3. Por aumento do FGF23

Neste grupo, destacam-se doenças genéticas com forma de transmissão distintas: o raquitismo e/ou osteomalácia hipofosfatêmicos ligado ao X (**XLHR**), o raquitismo e/ou osteomalácia hipofosfatêmicos autossômico dominante (**ADHR**) e o raquitismo e/ou osteomalácia hipofosfatêmicos autossômico recessivo (**ARHR**) (2).

Adicionalmente, o FGF23 pode ser produzido ectopicamente por tecidos fibrodisplásicos na displasia fibrosa polioestótica (OMIM 174800) ou por tecidos tumorais na osteomalácia oncogênica, a qual é mais frequente em adultos (2).

Do ponto de vista laboratorial, os níveis elevados de FGF23 determinam níveis reduzidos ou inapropriadamente normais de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ por inibição da 1α -hidroxilase, além de diminuir a taxa de reabsorção tubular de fosfato (TRP; valores inferiores a 95% em vigência de hipofosfatemia) com consequente hiperfosfatúria (15). Observa-se um

aumento dos marcadores de formação óssea, mas a calcemia, as concentrações de PTH e de 25 hidroxivitamina D (25OHD) estão normais geralmente (13).

O tratamento de escolha para pacientes sintomáticos é a reposição de calcitriol e fosfato. Na faixa pediátrica, o tratamento promove correção parcial das deformidades, diminui o número de cirurgias e melhora a estatura final. Nos adultos, diminui as dores ósseas e a extensão da osteomalácia, melhora a cicatrização óssea e acelera a recuperação cirúrgica. Os principais efeitos colaterais são: hipercalcemia, hipercalciúria, nefrocalcinose (NC), nefrolitíase (NL) e hiperparatireoidismo. Apesar do tratamento clínico, cirurgias corretivas em membros são necessárias geralmente (13).

Estudos iniciais em humanos com o KRN23, anticorpo humano anti-FGF23, sugerem um benefício potencial no tratamento dos pacientes com XLHR. A medicação mostrou-se segura e não foram relatados efeitos adversos significativos. Foram demonstradas melhora da TRP, do fósforo sérico e dos níveis de $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sem aumento da prevalência de NC e hiperparatireoidismo terciário (16, 17). Apesar disso, esta medicação ainda está indisponível para uso comercial.

1.2.3.1. Raquitismo e/ou osteomalácia hipofosfatêmicos ligado ao X (XLHR)

O XLHR (OMIM 307800) é a forma hereditária mais comum de raquitismo. Entretanto, é uma doença rara com incidência de 3,9:100.000 nascidos vivos e prevalência de 4,8:100.000. Tem herança dominante ligada ao X e é ocasionado por mutações distribuídas ao longo dos 22 éxons do gene *PHEX* sem zona de *hotspot*. O gene defeituoso produz uma proteína pouco ativa ou inativa determinando a elevação dos níveis de FGF23 (12, 13).

O quadro clínico inicia-se na infância e a fraqueza muscular, sintoma esperado nas hipofosfatemias, está habitualmente ausente, diferenciando-a dos demais tipos de raquitismo. A ausência de fraqueza muscular ainda tem causa incerta e, por ser um sintoma subjetivo, pode ser um fator de confusão na classificação dos raquitismos hipofosfatêmicos (12, 13).

1.2.3.2. Raquitismo e/ou osteomalácia hipofosfatêmicos autossômico dominante (ADHR)

Diferente da forma ligada ao X, a fraqueza muscular é um sintoma comumente relatado no ADHR (OMIM 193100). Uma peculiaridade desta forma é a possibilidade de início das manifestações clínicas na infância ou na fase adulta. Em 1997, Econs *et al* descreveram uma família com 23 membros portadores de ADHR distribuídos em sete gerações. Surpreendentemente, eles identificaram dois grupos de pacientes: o primeiro com início dos sintomas na infância e o segundo com apresentação mais tardia, durante a adolescência e a fase adulta (18). Para os casos esporádicos de início tardio, o principal diagnóstico diferencial deve ser feito com pacientes portadores de osteomalácia hipofosfatêmica oncogênica.

Nos pacientes com ADHR, a causa molecular envolve mutações *missense*, particularmente nos códons 176 e 179 do *FGF23*: p.R176Q, p.R176W, p.R179Q e p.R179W (19, 20). Esses códons são bastante conservados e dão origem a duas argininas (*RXXR motif*) fundamentais para o reconhecimento do FGF23 pela enzima responsável pela sua proteólise. Apesar da manutenção da sua bioatividade, o FGF23 mutante torna-se menos sensível à clivagem proteica do que o FGF23 selvagem (21). Além disso, a mutação não interfere na mensuração do FGF23 pelos ensaios disponíveis (22).

1.2.3.3. Raquitismo e/ou osteomalácia hipofosfatêmicos autossômico recessivo (ARHR)

Os primeiros relatos de ARHR por mutação inativadora no gene *DMP1* (OMIM 241520) datam de 2006 (23, 24). Uma particularidade desta forma, segundo a descrição de dois irmãos finlandeses por Makitie *et al* em 2010, é o agravamento da doença na vida adulta caracterizada por hiperostose craniana, artrite generalizada, entesopatias e calcificações dos ligamentos espinhais (25). Em outra publicação, também foram relatadas falanges distais displásicas, anormalidades faciais e dentárias, além de surdez neurossensorial manifesta tardiamente (26).

Mutações inativadoras do gene *ENPP1* (*Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1*), localizado no cromossomo 6q22-q23, são relatadas como causa da calcificação arterial generalizada da infância (GACI) (OMIM 208000). O *ENPP1* codifica uma proteína envolvida na regulação do pirofosfato inorgânico que é inibidor fisiológico da calcificação (27).

Nos últimos anos, algumas mutações inativadoras no *ENPP1* têm sido descritas como causas de ARHR (OMIM 613312). Os pacientes com esta forma de ARHR podem apresentar deformidades ósseas, arteriosclerose e surdez progressiva associada (28-30).

A distinção entre XLHR, ADHR e ARHR é baseada na história clínica do paciente e seus antecedentes familiares e, por isso, está sujeita a limitações nos casos esporádicos e erros pela subjetividade na caracterização de sintomas. Diante destes fatos, a análise genotípica dos pacientes com RQ/OM hipofosfatêmicos foi uma das propostas do presente trabalho, pois permite uma classificação fidedigna e a homogeneização da casuística de acordo com o gene envolvido, o que contribui para a compreensão de diferenças fisiopatológicas das diferentes etiologias. Além

disso, a identificação da base molecular de um caso-índice permite o rastreamento de casos familiares e o aconselhamento genético.

1.3. Avaliação da DMO e dos parâmetros estruturais ósseos

A massa óssea aumenta progressivamente do nascimento até a terceira década de vida, quando atinge o seu pico. Ela sofre influência de fatores genéticos, nutricionais, endócrinos e mecânicos que, do ponto de vista histológico, determinarão sua geometria, sua microarquitetura e o seu grau de mineralização (31).

Na infância e adolescência as necessidades metabólicas ósseas para um esqueleto em crescimento são aumentadas e o tratamento é imprescindível em pacientes com RQ/OM hipofosfatêmicos mediados por FGF23. Nesta fase, os marcadores ósseos são de extrema utilidade para avaliação do sucesso terapêutico, refletindo melhor ou pior controle.

No entanto, na fase adulta, as necessidades metabólicas são menores e os marcadores ósseos, geralmente normais, nem sempre refletem o real *status* de atividade da doença de base. Assim, a análise da massa e da microarquitetura ósseas pode fornecer dados importantes para o seguimento destes pacientes.

Quanto à microarquitetura, os ossos podem ser classificados em cortical e trabecular. O osso trabecular é mais interno, apresenta aspecto esponjoso e é mais ativo metabolicamente. Por sua vez, o osso cortical é mais externo, formado por lamelas ósseas compactas, conferindo propriedades de resistência e sustentação. Por estas características, suas análises devem ser particularizadas durante a avaliação da massa óssea (32).

A DXA (densitometria óssea de dupla emissão com fontes de raios-X) é a técnica mais utilizada para avaliação da densidade mineral óssea (DMO) embora apresente algumas limitações. Por se tratar de uma técnica

bidimensional, avalia a densidade mineral óssea areal (DMOa) e está sujeita à influência de fatores antropométricos, hormonais e extra-esqueléticos. Por isso, pacientes com baixa estatura ou atraso puberal podem ter valores de DMOa subestimados. Enquanto a presença de calcificações extra-esqueléticas, na região de aquisição de imagem pela DXA, costumam resultar em valores de DMOa superestimados. Além do mais, este exame não distingue os componentes trabecular e cortical, nem fornece dados sobre a microarquitetura óssea (31).

A HR-pQCT (*High Resolution peripheral Quantitative Computed Tomography*), ainda pouco disponível na prática clínica, é um método novo e mais acurado para a aquisição simultânea de dados fornecidos pela DXA e histomorfometria ósseas. Ela mensura a densidade mineral óssea volumétrica (DMOv) e por isso, sofre menor influência de fatores de confusão na análise. O seu grande diferencial é a construção digital tridimensional da microarquitetura óssea com a obtenção de dados sobre o componente trabecular (número, espessura e separação das trabéculas ósseas) e cortical (a espessura e porosidade) (31, 33, 34).

Tradicionalmente as informações sobre qualidade óssea de pacientes com RQ/OM hipofosfatêmicos de origem genética foram geradas por estudos histomorfométricos. Neste contexto, por ser um método não invasivo, a HR-pQCT mostra-se como um ferramenta importante para a obtenção de dados para a melhor avaliação da doença e do tratamento neste grupo de pacientes (31, 33, 34). Assim, devido às poucas informações disponíveis por HR-pQCT em pacientes com RQ/OM hipofosfatêmicos, um dos objetivos deste trabalho foi a análise dos parâmetros densitométricos e estruturais ósseos por meio deste método de imagem.

1.4. Nefrocalcinose e nefrolitíase

A NC é a deposição de cálcio no parênquima renal, enquanto a NL é a calcificação dentro do sistema coletor renal (35, 36).

A NC é listada como uma doença rara pelo *Office of Rare Diseases of National Institutes of Health* (<http://rarediseases.info.nih.gov/>), porém, a prevalência na população geral ainda não foi definida. Em um estudo italiano recente, Piccoli *et al* identificaram uma prevalência de 2,4% de NC em pacientes de um único centro de referência em Nefrologia (37). Por sua vez, a incidência de NL em adultos é de 3-5% (38, 39), enquanto é dez vezes menor nas crianças (35, 40).

Tanto a NC como a NL são multifatoriais. Os principais fatores de risco envolvidos são as alterações metabólicas primárias ou secundárias, as infecções urinárias de repetição, as malformações gêrito-urinárias e o uso de medicações como as suplementações de cálcio e fósforo (41-44). Outro fator importante é a predisposição genética. Aproximadamente, 20-29% dos diagnosticados com NC (42, 45) e 40% dos portadores de NL (36, 46) apresentam história familiar positiva (42, 45).

Quanto às alterações metabólicas associadas, a hipercalcúria é o principal fator de risco para a NC (42, 43), enquanto a hipocitratúria e a hiperoxalúria dividem a importância com a hipercalcúria na NL (36, 46, 47).

A hiperfosfatúria é considerada um fator de risco independente para a formação de calcificações no trato urinário. Fisiologicamente, ela leva à hipofosfatemia com estímulo da produção de calcitriol que aumenta a absorção intestinal de cálcio e fósforo. A formação de cristais ocorre principalmente no segmento descendente da alça de Henle, onde há maior reabsorção de água com aumento da concentração dos íons cálcio e fosfato. Assim, os cristais de hidroxapatita migram do epitélio para o interstício da papila renal, mais precisamente nas placas de Randall, local ideal para o crescimento do cálculo – figura 4 (48, 49).

Por estimular a hiperfosfatúria, o FGF23 tem papel importante na patogênese das calcificações do trato urinário (48). Portanto, os RQ/OM hipofosfatêmicos de origem genética mediados por FGF23 são considerados um grupo de risco para estas complicações.

Figura 4 – O papel da fosfatúria na litíase renal. O fosfato (PO_4) não reabsorvido no túbulo proximal concentra-se no segmento descendente da alça de Henle devido à maior reabsorção de água nesta região. Com o aumento da concentração, o fosfato liga-se ao cálcio (Ca) e precipita. Os cristais de cálcio e fósforo são atraídos pela membrana basal e migram através do interstício para a papila onde há a formação dos cálculos renais. Adaptado de *Prie et al* (49).

Enquanto a NC é silenciosa, a NL pode ter sintomas como a dor lombar e/ou abdominal, hematúria e disúria (36, 46). Na grande maioria dos casos, os exames de imagem tem papel decisivo no diagnóstico da NC e NL.

Para o diagnóstico de NC, alguns consideram que a US de rins e vias urinárias é o exame de eleição (13, 35, 50). Enquanto a US apresenta uma maior sensibilidade (96% vs 64%), a TC apresenta uma melhor especificidade (96% vs 85%) (50). Segundo Cheidde *et al*, a maior sensibilidade (92%) e especificidade (89%) são atingidas com a detecção de

NC em dois dos exames de imagem devido às eventuais discordâncias entre os resultados da US e da TC (43).

Para a detecção da NL, a tomografia computadorizada (TC) sem contraste de rins e vias urinárias é o método mais sensível e específico (36, 46).

Não há relatos na literatura da avaliação de calcificações renais por US e TC de rins e vias urinárias conjuntamente, incluindo a identificação dos fatores de risco metabólicos para NC e NL em pacientes com RQ/OM hipofosfatêmicos de origem genética mediados por FGF23 com diagnóstico molecular definido. Diante deste fato, um dos objetivos do presente estudo foi a determinação da prevalência de NC e NL e seus fatores de risco a fim de obter dados para otimizar a vigilância destas comorbidades e prevenir possíveis complicações nesta população.

2. OBJETIVOS

Em uma coorte de pacientes com RQ/OM hipofosfatêmicos de origem genética mediados por FGF23, nossos objetivos foram:

- 2.1. Identificar a etiologia molecular;
- 2.2. Avaliar a DMO e os parâmetros estruturais ósseos e
- 2.3. Avaliar a presença de NC e/ou NL e seus fatores de risco associados.

3. MÉTODOS

3.1. Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) - CAAE: 15774113.7.0000.0068; registro *online* número 10683.

Termos de consentimentos, por escrito, foram obtidos de todos os pacientes e controles ou pais/tutores antes do início do estudo.

3.2. Casuística

3.2.1. Pacientes

Todos os pacientes estudados foram provenientes do ambulatório de doenças osteometabólicas do Serviço de Endocrinologia do HC-FMUSP.

A seleção foi realizada a partir do histórico médico, achados de exame físico e exames complementares consistentes com raquitismo e/ou osteomalácia hipofosfatêmicos. Os critérios laboratoriais de inclusão, no momento do diagnóstico, foram: hipofosfatemia com fração de excreção de excreção de fósforo superior a 5% (15), valores aumentados de FGF23 e/ou marcadores ósseos elevados como a fosfatase alcalina, P1NP (propeptideo aminoterminal do colágeno tipo 1), osteocalcina e CTx (telopectideo carboxiterminal do colágeno tipo 1). A pesquisa de sinais de raquitismo foi feita através de radiografias simples de punho e/ou joelhos nas crianças, enquanto, nos adultos, a cintilografia óssea com MDP-^{99m}Tc direcionou a

realização de radiografias simples para a pesquisa de pseudofraturas. Foram excluídos os pacientes com outras tubulopatias e osteomalácia hipofosfatêmica oncogênica.

Foram selecionados 47 pacientes (16 crianças e 31 adultos; 11 homens e 36 mulheres), sendo 26 casos esporádicos e 21 casos familiares compreendendo nove casos índice. Todas as crianças (≤ 18 anos) estavam em uso intensivo de fosfato de sódio e potássio (30-60 mg/kg/dia) e calcitriol, enquanto a maior parte dos adultos utilizaram apenas o calcitriol. Todos os casos de insuficiência de vitamina D foram prontamente corrigidos. Os pacientes foram acompanhados por, aproximadamente, cinco anos em intervalos regulares: crianças a cada quatro meses e adultos a cada seis meses.

3.2.2. Grupo controle

Um grupo composto por 44 indivíduos saudáveis, maiores de 5 anos, provenientes do banco de dados do LIM-17, foi pareado por sexo, idade e estágio puberal com o grupo de pacientes que realizou DXA e HR-pQCT.

3.3. Avaliação clínica e laboratorial

A avaliação clínica foi baseada em informações obtidas dos prontuários durante o seguimento ambulatorial e complementada por questionamento ativo.

Na anamnese, foram investigados o histórico pessoal e familiar de raquitismo e/ou osteomalácia, presença de consanguinidade, além de NC e/ou NL, presença de malformações urinárias, infecções urinárias de repetição (superior a duas por ano) e uso de medicamentos. Quanto ao

tratamento, foram avaliados principalmente: o uso de fosfato de sódio e potássio na infância, além da idade de início e o tempo total de uso.

No exame físico, destaque foi dado para a aferição de estatura, estatura sentada e avaliação de deformidades ósseas (dados não mostrados).

Utilizamos como critério de baixa estatura, valores inferiores a dois escores de desvio padrão para a mesma faixa etária e sexo (escore Z de estatura < -2) calculado de acordo com as curvas de crescimento do CDC de 2000 (<http://www.cdc.gov/growthcharts/>). O escore Z da relação estatura sentada/estatura (Es/E) foi calculado (51) e o valor $> +2$ foi considerado indicativo de baixa estatura desproporcional por comprometimento do crescimento dos membros (52).

As dosagens bioquímicas e hormonais foram realizadas no Laboratório Central e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 do HC-FMUSP a partir de amostras de sangue venoso periférico e de urina.

As coletas de sangue venoso periférico ocorreram no período matutino e foram realizados exames referentes ao metabolismo ósseo que são utilizados para a rotina do acompanhamento do paciente: cálcio total, cálcio iônico, fósforo, creatinina, PTH, 25 hidroxivitamina D e marcadores do metabolismo ósseo (fosfatase alcalina, P1NP, osteocalcina e CTx).

Para as dosagens de FGF23, optamos pela dosagem da molécula intacta com Acs monoclonais (Kainos, Tóquio, Japão), pela sua melhor performance (53).

Baseado em critérios clínicos, laboratoriais e radiológicos, todos os pacientes foram categorizados, segundo seu *status* metabólico, em compensados e não compensados. Na faixa etária pediátrica, foram analisados a velocidade de crescimento para o sexo e idade, os valores de fosfatase alcalina e a presença de sinais de raquitismo nas RX de punhos e/ou joelhos. Nos adultos, ambos os valores de fosfatase alcalina e P1NP

elevados foram os critérios utilizados para a determinação da descompensação metabólica.

Por não dispormos da dosagem da fração óssea, a fosfatase alcalina dosada é total, que inclui uma fração hepática. Assim, os aumentos desta dosagem só foram valorizados na presença de valores normais de enzimas hepáticas (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e de gama glutamiltransferase).

Coletas de urina de 24 horas foram realizadas para as dosagens de cálcio, fósforo, creatinina, citrato e oxalato. De acordo com os resultados encontrados, foram determinados os números de episódios de hipercalciúria, hipocitratúria e hiperoxalúria para cada paciente no período estudado.

Os exames realizados, a metodologia empregada e seus respectivos coeficientes de variação intraensaio e interensaio estão descritos na tabela 1. Os valores de referência para os exames urinários estão apresentados na tabela 2 (36).

Para os pacientes até 18 anos, a função renal foi estimada pelo cálculo da taxa de filtração glomerular determinada pela fórmula de Schwartz. Para os pacientes acima de 18 anos, foi utilizada a fórmula de Cockcroft-Gault. Os resultados foram classificados segundo as diretrizes do KDOQI e considerados normais com valores ≥ 90 ml/min/1,73 m² (36, 54).

Tabela 1 - Exames laboratoriais: método de dosagem e coeficientes de variação intraensaio e interensaio

Analito	Método de dosagem	Variação intraensaio	Variação interensaio
Cálcio total	Colorimétrico automatizado	< 3,1%	< 3,5%
Cálcio iônico	Eletrodo íon seletivo	< 0,7%	< 0,3%
Fósforo	Colorimétrico enzimático	< 3,0%	< 4,4%
Magnésio	Colorimétrico automatizado	< 2,1%	< 2,4%
Creatinina	Colorimétrico cinético	< 3,2%	< 2,3%
Fosfatase alcalina	Cinético automatizado	< 2,1%	< 1,8%
P1NP	Eletroquimioluminométrico	< 7,0%	< 5,1%
Osteocalcina	Eletroquimioluminométrico	< 7,0%	< 4,3%
CTx	Eletroquimioluminométrico	< 10,0%	< 4,3%
PTH	Imunoquimioluminométrico	< 15%	< 6,7%
25OHD	Quimioimunoensaio	< 3,2%	< 7,6%
FGF23	Enzimaimunoensaio	< 5,2%	< 10,5%
Cálcio urinário	Colorimétrico automatizado	< 4,6%	< 5,9%
Creatinina urinária	Colorimétrico automatizado	< 3,8%	< 5,9%
Fósforo urinário	Colorimétrico automatizado	< 9,2%	< 10,6%
Citrato urinário	Enzimático UV	<6,4%	<12,4%
Oxalato urinário	Colorimétrico enzimático	ND	<6,8%

ND: não disponível.

Tabela 2 - Valores de referência para parâmetros avaliados em urina de 24h

Parâmetro	Sexo	Valores de referência
Creatinúria	Ambos	Crianças: 2 mg/kg $\pm$ 0,8 mg/kg Adultos: 15-25 mg/kg
Calciúria	Ambos	1,5-4 mg/kg/d
Citratúria	Masculino	> 365 mg/1,73 m ²
	Feminino	> 310 mg/1,73 m ²
Oxalúria	Ambos	$\leq$ 45 mg/1,73 m ²

3.4. Avaliação genotípica

Foram coletados 10 mL de sangue, de cada paciente, em dois tubos contendo anticoagulante EDTA a partir dos quais o DNA genômico foi extraído. A identificação de familiares afetados também pode ser realizada através de amostra de sangue, de raspado de mucosa oral ou de cordão umbilical.

A extração de DNA de sangue e de raspado de mucosa oral foi realizada segundo o procedimento padronizado pelo LIM-42, baseado na técnica *salting out* adaptada de *Miller et al* (55).

A extração de DNA a partir de cordão umbilical foi realizada com o *Wizard® Genomic DNA purification kit* (Promega Corporation, Madison, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.4.1. Pesquisa de mutações por PCR e sequenciamento automático

3.4.1.1. Gene *PHEX*

A partir do DNA genômico de cada paciente, foi amplificada toda a região codificadora do gene *PHEX* através da técnica de PCR. De acordo com a sequência da região codificadora do *PHEX* depositada no *Genbank*, foram desenhados *primers* específicos flanqueando cada um dos 22 éxons deste gene. As sequências de todos esses *primers* e os tamanhos dos respectivos *amplicons* esperados estão descritos no ANEXO A.

Para a amplificação de cada fragmento, foram preparadas reações com um volume final de 25 µL, utilizando-se: cerca de 100 ng de DNA genômico, 200 µmol/L de cada desoxinucleotídeo, 10 pmol de *primer F* e 10 pmol de *primer R* referente ao éxon de interesse, 1 unidade da enzima *Taq*

DNA polimerase (Promega Corporation, Madison, EUA), tampão 5x de reação *Green Go TaqTM* fornecido pelo fabricante da enzima e água ultrapura para completar o volume.

Todos os éxons foram amplificados com o mesmo protocolo que consistiu de uma pré-desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de PCR (desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridação a 54°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto) e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Todas as reações foram realizadas em termociclador automático *Mastercycler* (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) ou *Veriti 96 Thermal Cycler* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, EUA).

O tamanho e a concentração dos *amplicons* foram determinados através da comparação com fragmentos do marcador de peso molecular 1 Kb (Invitrogen, Carlsbad, EUA), de concentração conhecida, após eletroforese em gel de agarose a 1% (Invitrogen, Carlsbad, EUA) preparado com tampão TAE 1x (Tris 0,004 mol/L; ácido acético glacial; EDTA 0,001 mol/L pH 8,0), corado com corante fluorescente *SYBR Safe DNA Stain* (Life Technologies Corporation, Carlsbad, EUA) e observado em transiluminador ultravioleta.

Após confirmação da amplificação, cerca de 30 ng dos produtos de PCR foram purificados com 10 U das enzimas exonuclease I e *shrimp alkaline phosphatase* do kit EXO-SAP (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Reino Unido) por meio de incubação a 37°C por 15 minutos seguida por inativação das enzimas a 80°C por 15 minutos.

Os produtos purificados foram sequenciados com o kit *ABI PrismTM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit 3.1* (PE Applied Biosystems, Foster City, EUA). Utilizaram-se 30 ng de produto de PCR purificado, 1 µL de *BigDye Terminator*, 3 µL de tampão de sequenciamento, 5 pmol de um dos *primers* específicos para cada éxon (ANEXO A) e água ultrapura para completar o volume de 10 µL. Todas as reações de sequenciamento foram realizadas nos termocicladores citados anteriormente e seguiram o mesmo protocolo de amplificação independente do éxon em

questão: 25 ciclos sendo cada ciclo constituído por uma etapa de desnaturação a 96°C por 10 segundos, hibridação a 50°C por 5 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos.

O material resultante da reação de sequenciamento foi transferido para uma placa de 96 poços (*MicroAmp optical 96-well Reaction Plate*, PE Applied Biosystems, CA, EUA) e precipitado seguindo o protocolo de isopropanol/etanol (PE Applied Biosystems, Foster City, EUA). Após a adição de 15 µL de formamida (PE Applied Biosystems, Foster City, EUA) em cada poço da placa, o produto foi submetido a uma eletroforese capilar no equipamento *ABI Prism Genetic Analyzer 3100 automatic DNA sequencer* (PE Applied Biosystems, Foster City, EUA). A análise dos dados foi realizada com auxílio do programa *Sequencher* v.4.8 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, EUA) e as sequências obtidas foram comparadas com as descritas no *Ensembl* (*Transcript* ENST00000379374.4).

Quando foi identificada alguma mutação conhecida, a mesma foi confirmada por meio de uma nova reação de PCR e de sequenciamento automático. Para verificar se já estavam descritas, as variantes alélicas encontradas foram pesquisadas nos bancos de dados: *1000 Genomes* (<http://www.1000genomes.org/>), *Ensembl* (<http://www.ensembl.org>), *PubMed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) e *PHEXdb* (<http://www.phexdb.mcgill.ca/>). No caso de variantes alélicas não descritas do tipo *missense*, foi feita uma predição *in silico* do impacto da troca de aminoácido na estrutura e função da proteína, por meio dos programas computacionais *PolyPhen-2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) e *MutationTaster*. Para variantes alélicas com alterações no sítio de *splicing*, foram utilizados os programas *MutationTaster* (<http://www.mutationtaster.org>) e *Human Splicing Finder* (<http://www.hmd.be/HSF/>).

3.4.1.2. Gene *FGF23*

Para os casos sem alterações no estudo do gene *PHEX*, foi avaliado apenas o éxon 3 do gene *FGF23* (região *hotspot* para mutações ativadoras) pelas técnicas de PCR e sequenciamento automático descritas anteriormente para o gene *PHEX*. As sequências dos *primers* e os tamanhos dos *amplicons* esperados estão descritos no ANEXO A.

3.4.2. Pesquisa de número de cópias nos genes *PHEX* e *FGF23* por MLPA

Nos casos em que não foram encontradas mutações na região codificadora do *PHEX* nem no éxon 3 do *FGF23*, foi realizada a pesquisa de número de cópias para estes genes através da técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) por meio do *kit* comercial *MLPA P223-B1 PHEX* (MCR Holland, Amsterdam, Holanda). O *kit* disponibiliza:

- 28 sondas específicas complementares ao *PHEX* (1 sonda para cada um dos 22 éxons e 1 sonda adicional para os éxons 1, 3, 5, 11, 12 e 15);
- 4 sondas específicas complementares ao *FGF23* (1 sonda para cada um dos 3 éxons e 1 sonda adicional para o éxon 1) e
- 10 sondas de referência (1 sonda no Xp11.23 e as demais localizadas em autossomos).

Para cada ensaio de MLPA, foram incluídas, no mínimo, três amostras de DNA de indivíduos controle do mesmo sexo que os pacientes estudados.

Foram utilizados cerca de 100 ng de DNA genômico de cada amostra (pacientes ou indivíduos controle) e a reação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

Os produtos resultantes foram detectados e quantificados por eletroforese capilar no sequenciador automático *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* (PE Applied Biosystems, Foster City, EUA) e analisados pelo programa *Coffalyser.NET* (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda) fornecido pelo fabricante.

3.5. Avaliação da DMO e dos parâmetros estruturais ósseos

Todos os pacientes, maiores de cinco anos, realizaram a DXA e a HR-pQCT no mesmo dia no Laboratório de Metabolismo Ósseo da Disciplina de Reumatologia da FMUSP (LIM-17).

A DXA foi feita com o aparelho *Hologic DXA Scanner* (QDR 4500; Hologic, Waltham, EUA) para a avaliação da DMOa em coluna lombar (L1-L4), fêmur proximal (colo de fêmur e fêmur total) e antebraço distal esquerdo (rádio distal total, 1/3 distal do rádio e rádio ultradistal); nas crianças, também foi avaliada a DMOa de corpo inteiro subtotal.

A HR-pQCT foi realizada com o aparelho *Xtreme CT II* (SCANCO Medical AG, Brüttisellen, Suíça) em rádio e tíbia distais esquerdos para a avaliação de parâmetros de DMOv e estruturais ósseos, utilizando as recomendações definidas pelo fabricante (33, 34). O estudo de cada sítio dura três minutos e é realizado separadamente em antebraço e perna imobilizados em uma concha de fibra de carbono para evitar artefatos decorrentes de movimentação. É realizado um RX simples de rádio e tíbia distais para determinação de planos padronizados de início e término da TC (*scout view*). Para que as áreas de interesse de pacientes e controles representem regiões semelhantes, a aquisição de imagem guarda uma mesma proporção em relação às extremidades ósseas de rádio e tíbia. São realizadas 110 fatias compreendendo 9,02 mm ao longo do eixo axial do osso. Posteriormente, os dados digitais são transformados em imagens seccionais e é feita uma reconstrução tridimensional. Para que o sistema reconheça o volume total do tecido e realize as análises, são necessárias as

determinações do perímetro externo da cortical óssea e da divisão entre os compartimentos cortical e trabecular. Com isso, através de algoritmos matemáticos, os principais parâmetros ósseos são calculados - tabela 3 (33, 34).

Tabela 3 - Parâmetros fornecidos pela HR-pQCT

Sigla	Parâmetros	Unidade
-	Área óssea total	mm ²
-	Perímetro médio	mm
Tb.area	Área trabecular	mm ²
Ct.area	Área cortical	mm ²
Total vBMD	Densidade volumétrica total	mg HA/cm ³
Tb vBMD	Densidade volumétrica trabecular	mg HA/cm ³
Ct vBMD	Densidade volumétrica cortical	mg HA/cm ³
BV/TV	Relação entre o volume ósseo e o volume total	-
Tb.N	Número médio das trabéculas	mm ⁻¹
Tb.Th	Espessura média das trabéculas	mm
Tb.Sp	Espaço médio entre as trabéculas	mm
SD.1/Tb.N	Falta de homogeneidade da rede trabecular	mm
Ct.Th	Espessura média da cortical	mm

HA: hidroxapatita.

3.6. Avaliação de nefrocalcinose e nefrolitíase

Todos os pacientes foram submetidos a exames de US e TC de rins e vias urinárias, realizados no Instituto de Radiologia do HC-FMUSP (InRad). As USs foram realizadas com os aparelhos *GE LOGIQ E9 with XDclear ultrasound system* (General Electric Company, Fairfield, EUA) e *Phillips iU22 ultrasound system* (Phillips Healthcare, Andover, EUA) e as TCs com os aparelhos *Phillips CT Brilliance 64 channel* (Phillips Healthcare, Cleveland,

EUA) e *Toshiba Aquillion 64 channel* (Toshiba Medical Systems, Otawara, Japão). As TCs foram feitas *multislice* sem contraste que representa um avanço tecnológico em relação à helicoidal (56).

As imagens obtidas pelas USs foram analisadas independentemente por dois radiologistas com experiência no diagnóstico de NC e classificadas segundo o escore abaixo (35):

- Escore 0: ausência de ecogenicidade;
- Escore 1: moderada ecogenicidade ao redor das pirâmides medulares;
- Escore 2: moderada ecogenicidade ao redor e dentro das pirâmides;
- Escore 3: grave ecogenicidade em todas as pirâmides.

As imagens obtidas pelas TCs de rins e vias urinárias *multislice* sem contraste foram analisadas independentemente por outros dois radiologistas, sem conhecimento dos resultados das USs, e com experiência no diagnóstico de NC e NL por este método. A classificação da NC foi feita de acordo com o seguinte escore (35):

- Escore 0: ausência de calcificações;
- Escore 1: uma a três calcificações pontuais;
- Escore 2: aumento da densidade das pirâmides;
- Escore 3: calcificações das pirâmides.

A presença de qualquer papila envolvida forneceu um escore maior que 0, sem número mínimo de papilas exigidas. Quando houve a presença de características de vários níveis ou a extensão da doença diferiu entre os dois rins, prevaleceu o maior escore (35).

A confirmação de NC foi determinada com o resultado positivo em ambos os métodos de imagem (43), US e TC, enquanto o diagnóstico de NL foi realizado apenas pela TC (47).

3.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa *SPSS Statistics software versão 22.0* (SPSS Inc, Chicago, EUA). Foi realizado o teste de normalidade *Shapiro-Wilk* para os dados de cada variável quantitativa estudada. Segundo o tipo de distribuição, os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão ou mediana com valores mínimo e máximo. As diferenças entre grupos foram testadas quanto à significância através dos testes *T-student* (distribuição normal) e *Mann-Whitney* (distribuição não normal). Conforme a normalidade da distribuição da variável, as correlações foram realizadas pelos coeficientes de *Spearman* ou de *Pearson*. Para as variáveis qualitativas, foi utilizado o teste qui-quadrado ou o teste exato de *Fisher* de acordo com as frequências esperadas. A significância foi considerada pelo valor de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação clínica e laboratorial

Foram estudados 47 pacientes com RQ/OM hipofosfatêmicos mediados por FGF23, compreendendo 26 casos esporádicos e 21 casos familiares pertencentes a nove famílias não relacionadas. Os heredogramas das famílias I e II estão representados nas figuras 1 e 2 do ANEXO B, respectivamente. A família III foi composta por dois irmãos, enquanto as famílias IV a VII foram constituídas por mães e filhos.

Trinta e seis pacientes eram do sexo feminino (76,5%) e 11 do sexo masculino (23,5%), sendo 12 mulheres e 4 homens com idade igual ou inferior a 18 anos e 24 mulheres e 7 homens com idade superior a 18 anos. A média de idade para os pacientes ≤ 18 anos foi de $10,9 \pm 5,0$ anos enquanto a média de idade para os pacientes > 18 anos foi de $41,8 \pm 14,7$ anos. Foram calculados os escores Z de estatura e da relação estatura sentada/estatura para cada paciente – tabela 3 do ANEXO B.

Todos os pacientes na faixa etária pediátrica estavam em uso de fosfato de sódio e potássio na dose de 30-60 mg/kg/d, mas, entre os 31 pacientes adultos, 13 não usaram fosfato durante a infância e puberdade.

No que se refere à estatura, 38 dos 47 pacientes analisados têm baixa estatura (80,8%): 12/16 (75%) com idade ≤ 18 anos e 26/31 (83,8%) com idade > 18 anos. Apesar da frequência de baixa estatura ter sido alta em ambas as faixas etárias, a média do Z de estatura dos pacientes com idade ≤ 18 anos foi superior à média do Z de estatura dos adultos ($-2,4 \pm 1,4$ vs $-3,5 \pm 1,5$; $p = 0,01$) – gráfico 1.

Gráfico 1 - Comparação do Z de estatura dos pacientes com RQ/OM hipofosfatêmicos segundo a faixa etária

Além disso, a média do Z de estatura dos adultos que usaram fosfato durante a infância e adolescência foi superior à média do Z de estatura dos que não utilizaram o medicamento ($-3,0 \pm 1,3$ vs $-4,2 \pm 1,5$; $p = 0,04$) – gráfico 2. Embora não tenha sido estatisticamente significativa, a média do Z de estatura dos adultos que fizeram uso de fosfato durante a infância e adolescência tendeu a ser inferior a dos pacientes pediátricos ($-3,0 \pm 1,4$ vs $-2,4 \pm 1,4$; $p = 0,17$).

Para os pacientes na faixa etária pediátrica (idade ≤ 18 anos), não houve correlação entre a estatura e a idade de início ($p=0,408$) ou duração do tratamento com fosfato ($p=0,206$).

Quanto à relação Es/E, três pacientes adultos com baixa estatura não conseguiram realizar a mensuração da estatura sentada devido às deformidades ósseas em membros inferiores.

Gráfico 2 – Comparação do Z de estatura dos pacientes com RQ/OM hipofosfatêmicos adultos segundo o uso de fosfato de sódio e potássio na infância e adolescência

Trinta e um dos 35 pacientes com baixa estatura (88,5%) apresentaram desproporção corporal ($Z > +2$). Nove dos 12 pacientes pediátricos (75%) com baixa estatura eram desproporcionados, enquanto 22 dos 26 (84,6%) pacientes adultos com baixa estatura tinham desproporção corporal. Seis dos nove pacientes com estatura normal também apresentaram-se desproporcionados (66,6%). Além disso, a frequência de baixa estatura desproporcionada foi 9/11 (81,8%) nos adultos que não usaram fosfato na infância e adolescência e 13/17 (76,4%) nos que usaram a medicação.

Em relação às deformidades ósseas, elas estiveram presentes desde a infância em todos os pacientes e particularmente nos membros inferiores (dados não mostrados). Trinta e cinco pacientes foram submetidos a

correções ortopédicas, seis deles durante a infância e puberdade e 29 após término do crescimento longitudinal.

Na tabela 3 do ANEXO B, além de dados demográficos, são expostos os perfis laboratoriais individualizados dos pacientes estudados. Todos apresentaram níveis séricos elevados de FGF23, taxa de reabsorção tubular de fosfato aumentada e hipofosfatemia. Os níveis de cálcio eram normais e 24/47 pacientes apresentaram hiperparatireoidismo secundário decorrente da insuficiência de vitamina D e/ou baixa ingestão de cálcio. Estas deficiências foram prontamente corrigidas no decorrer do acompanhamento com normalização dos níveis de PTH.

Cinco adultos foram diagnosticados com hiperparatireoidismo terciário: quatro durante o seguimento e um caso anteriormente ao estudo. Em três pacientes, o diagnóstico do hiperparatireoidismo terciário ocorreu na sexta década de vida (aos 50, 55 e 58 anos); todos com histórico de uso de fosfato na vida adulta. Uma paciente foi diagnosticada aos 29 anos e relatava uso de fosfato apenas na infância. O tratamento cirúrgico foi bem sucedido nos quatro casos com consequente normalização bioquímica. Apenas uma paciente não tinha histórico de tratamento com fosfato ou calcitriol; seu diagnóstico foi feito aos 75 anos de idade e a apresentação do hiperparatireoidismo era assintomática com hipercalcemia e aumento de PTH discretos. Neste caso, a abordagem cirúrgica foi contraindicada devido à hipertensão arterial de difícil controle.

Quanto aos marcadores laboratoriais, no período estudado, a compensação metabólica não foi alcançada em 15 de 16 pacientes pediátricos mesmo com o uso de doses altas de fosfato (60 mg/kg/d) e calcitriol. Nos adultos, 10 de 31 pacientes estavam descompensados metabolicamente.

A maioria dos indivíduos teve função renal normal. Apenas três pacientes idosas apresentaram diminuição da taxa de filtração glomerular, sendo uma em estágio 2 e duas em estágio 3 de acordo com a *National*

Kidney Foundation (54). As três pacientes apresentavam hipertensão arterial, das quais duas eram mal controladas.

4.2. Avaliação genotípica

4.2.1. Avaliação do gene *PHEX*

O estudo do gene *PHEX* através de PCR e sequenciamento automático, pelo método de Sanger, possibilitou a determinação da base molecular em 35 dos 47 pacientes (18 casos familiares com sete casos índice e 17 casos esporádicos) com RQ/OM hipofosfatêmicos de origem genética mediados por FGF23, classificando-os como XLHR.

Entre os pacientes identificados como XLHR, foram encontradas 24 mutações, sendo 14 inéditas na literatura: três do tipo *nonsense*; cinco com microdeleções e uma com inserção de 79 pb implicando na formação de *frameshifts*; uma do tipo *missense* e quatro na região de sítio de *splicing* – tabela 4. Todas as mutações encontradas estavam distribuídas ao longo dos 22 éxons ou em suas sequências intrônicas. Além disso, nenhuma mutação foi encontrada na região 3'-UTR.

As mutações novas do tipo *nonsense* e resultantes em *frameshifts* foram consideradas deletérias por implicarem na formação de uma proteína truncada.

A variante alélica p.G575R do tipo *missense* foi identificada em uma paciente sem história familiar e não foi testada em seus pais. Ela foi descartada como polimorfismo por não estar descrita nos bancos de dados dos sites: *1000 Genomes*, *Ensembl*, *PubMed* e *PHEXdb*. Posteriormente, foi testada *in silico* (programas de predição *PolyPhen-2* e *MutationTaster*), considerada danosa para a proteína pelos dois programas e, portanto, indicada como causa da doença.

As variantes alélicas c.350-2A>G, c.1302+1G>A, c.2070+5G>A e c.2071-1G>C, localizadas em sítios de *splicing* também pertencem a casos esporádicos e não foram testadas em seus pais. Elas foram descartadas como polimorfismos pelos mesmos motivos citados acima. Todas estavam localizadas entre -2 e +5 pb das regiões dos sítios de *splicing*. A seguir, foram testadas *in silico* (programas de predição *MutationTaster* e *Human Splicing Finder*) e, por apresentarem alta probabilidade de mudança de sítio de *splicing*, também foram consideradas responsáveis pela doença.

Em três casos esporádicos, sem mutações detectadas pelo método de Sanger, a análise pela técnica de MLPA identificou deleções em heterozigose em duas mulheres (éxons 1-19 e éxon 16) e deleção em hemizigose, em um homem (éxons 15-22). Neste último caso, a falha na amplificação destes éxons por PCR já levantava esta suspeita. Não foi realizada análise de MLPA de familiares destes casos – tabela 4.

Em uma família, mãe e filha compartilharam a duplicação no éxon 12. Adicionalmente, em outro caso com apresentação familiar foi encontrada uma deleção em heterozigose dos éxons 13-15. O pai desta menina apresenta XLHR, porém seu DNA não foi acessível para o mesmo estudo.

Desta forma, em seis casos esporádicos com RQ/OM hipofosfatêmicos de origem genética mediados por FGF23, não foram identificadas alterações nas regiões codificadora e de *splicing* do *PHEX* pesquisadas pelos métodos de Sanger e MLPA.

Além do esclarecimento etiológico de grande parte dos casos (41/47), o estudo genético do *PHEX* permitiu excluir o filho da paciente 7 da família II (figura 2 do ANEXO B) como portador de XLHR o qual nasceu no decorrer do estudo. A análise foi realizada nos primeiros meses de vida da criança, por meio do DNA genômico obtido do seu coto umbilical.

Tabela 4 – Mutações no gene *PHEX* em 21 casos familiares e 20 casos esporádicos de XLHR

Apresentação	Localização	DNA	Proteína	dbSNP ID/HGMD
Mutações <i>nonsense</i>				
F (n = 5)	Éxon 1	c.623C>T	p.R20*	CM971148
F (n = 2)	Éxon 5	c.1076G>T	p.E171*	Nova
E	Éxon 5	c.1105G>A	p.W180*	Nova
E	Éxon 15	c.2210C>T	p.R549*	CM973083
F (n = 2)	Éxon 16	c.2264C>T	p.R567*	CM060430
E	Éxon 20	c.2545G>A	p.W660*	Nova
F (n = 4)	Éxon 22	c.2804C>T	p.R747*	CM981530
Frameshift: inserções e deleções				
F (n = 2)	Éxon 9	c.1550_1550delC	p.H329Ifs*2	Nova
E	Éxon 11	c.1854_1854delA	p.D430Vfs*5	Nova
E	Éxon 16	c.2226_2236del11nt	p.E554Afs*24	Nova
E	Éxon 18	c.2461_2462ins79	p.N633Ifs*6	Nova
E	Éxon 20	c.2589_2589delG	p.G675Afs*12	Nova
E	Éxon 21	c.2669_2669delC	p.R702Efs*38	Nova
Mutações <i>missense</i>				
E	Éxon 12	c.1914T>C	p.L450P	CM111057
E	Éxon 13	c.2035A>T	p.E490D	rs371934258
E	Éxon 17	c.2288G>C	p.G575R	Nova
E	Éxon 17	c.2300G>C	p.G579R	CM971166
E	Éxon 22	c.2810T>C	p.W749R	CM981531
Mutações em sítios de <i>splicing</i>				
E	Intron 3	c.350-2A>G	NA	Nova
E	Intron 11	c.1302+1G>A	NA	Nova
F (n = 1) [#]	Intron 14	c.1586_1586+1delAG	NA	Gaucher <i>et al</i> (57)
F (n = 2)	Intron 18	c.1899+1G>A	NA	CS092782
E	Intron 20	c.2070+5G>A	NA	Nova
E	Intron 20	c.2071-1G>C	NA	Nova
Análise pelo MLPA				
E	Deleção éxon 1-19		NA	Nova
F (n=2)	Duplicação éxon 12		NA	Nova
F (n=1) ^{##}	Deleção éxon 13-15		NA	Nova
E	Deleção éxon 15-22		NA	Nova
E	Deleção éxon 16		NA	Nova

F: familiar; E: esporádica; n: número de membros afetados; NA: não se aplica; [#]paciente possui dois filhos afetados que não pertencem à nossa casuística; ^{##}pai da paciente é afetado e não pertence à casuística.

4.2.2. Avaliação do gene *FGF23*

Nos seis pacientes com RQ/OM hipofosfatêmicos de origem genética mediados por *FGF23* e pesquisa negativa para mutações no *PHEX*, a avaliação do éxon 3 do gene *FGF23* (região *hotspot* para mutações ativadoras) pelas técnicas de PCR e sequenciamento automático não evidenciou alterações. O estudo do MLPA também não identificou alterações no número de cópias do *FGF23*.

4.3. Avaliação da DMO e dos parâmetros estruturais ósseos

Com o intuito de homogeneizar a casuística, seis pacientes foram excluídos da análise por não apresentarem mutações inativadoras no gene *PHEX*. Adicionalmente, foram excluídas três crianças por terem idade inferior a seis anos quando a reprodutibilidade da HR-pQCT não é confiável (58). Desta forma, 38 pacientes (28 mulheres e 10 homens; 13 crianças e 25 adultos) com XLHR, confirmados com mutação no *PHEX*, foram selecionados para a análise dos resultados de DXA e HR-pQCT.

Devido às deformidades esqueléticas, particularmente em membros inferiores, e/ou a presença de objetos metálicos (placas, pinos e parafusos) nos sítios a serem analisados, nem todos os pacientes realizaram a DXA em fêmur proximal (n=33) e a HR-pQCT de tíbia distal (n=34).

Todos os pacientes foram pareados para a idade, sexo e estágio puberal com indivíduos saudáveis provenientes do banco de dados do LIM-17.

4.3.1. Avaliação da DMOa por DXA

Os valores absolutos de DMOa obtidos pela DXA nos diferentes sítios estudados estão mostrados nas tabelas 5 e 6 do ANEXO C.

Os pacientes com XLHR apresentaram maior DMOa em L1-L4 comparados aos seus respectivos controles ($p=0,03$) – gráfico 3 e tabela 5 do ANEXO C. Após a estratificação dos pacientes por faixa etária, esta diferença desapareceu na faixa pediátrica ($p=0,14$) enquanto os adultos mantiveram maior DMOa comparados aos seus controles ($p<0,01$) – gráfico 4 e tabela 6 do ANEXO C.

Gráfico 3 – Comparação da DMOa de L1-L4 obtida por DXA entre o grupo de pacientes com XLHR e o grupo controle

Gráfico 4 – Comparação da DMOa de L1-L4 obtida por DXA entre os pacientes com XLHR estratificados por faixa etária e seus respectivos controles

Em colo de fêmur e fêmur total, não houve diferenças quanto à DMOa entre os grupos ($p=0,58$ e $p=0,83$, respectivamente) - tabela 5 do ANEXO C.

Quanto ao rádio distal total, não houve diferenças na DMOa entre os grupos estudados ($p=0,19$). Ao analisarmos as diferentes regiões do rádio, os pacientes tiveram menor DMOa em 1/3 distal do rádio comparados aos seus respectivos controles ($p<0,01$) sem alterações no rádio ultradistal ($p=0,38$) - gráfico 5 e tabela 5 do ANEXO C. Esta menor DMOa em 1/3 distal do rádio esteve presente nas crianças e nos adultos - tabela 6 do ANEXO C.

Gráfico 5 – Comparação da DMOa de 1/3 distal do rádio obtida por DXA entre o grupo de pacientes com XLHR e o grupo controle

A DMOa de corpo inteiro subtotal foi avaliada na faixa etária pediátrica e não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,39$) - tabela 6 do ANEXO C.

4.3.2. Avaliação dos parâmetros geométricos, da DMOv e da microarquitetura óssea obtidos por HR-pQCT

Os parâmetros geométricos, dados de DMOv e parâmetros referentes à microarquitetura óssea dos grupos de pacientes com XLHR e controles obtidos por HR-pQCT, bem como as análises estratificadas por faixa etária e compensação metabólica, estão apresentados nas tabelas 7-9 do ANEXO C.

Quanto aos parâmetros geométricos (área óssea total, perímetro médio, área trabecular e área cortical), não houve diferenças significativas entre os grupos no rádio ($p=0,22$; $p=0,63$; $p=0,20$ e $p=0,55$ respectivamente)

e na tíbia distais ($p=0,27$; $p=0,33$; $p=0,32$ e $p=0,18$ respectivamente) – tabela 7 do ANEXO C.

No rádio distal, não houve diferenças entre os grupos quanto à densidade volumétrica total (Total vBMD; $p=0,89$) ou aos seus compartimentos trabecular (Tb vBMD; $p=0,31$) e cortical (Ct vBMD; $p=0,65$) - gráfico 6 e tabela 7 do ANEXO C. Entretanto, ao dividirmos o grupo de pacientes por faixa etária, o grupo pediátrico apresentou maior Tb vBMD ($p<0,01$) do que seus controles, sem diferenças no Total vBMD ($p=0,12$) e no Ct vBMD ($p=0,62$). Por sua vez, os adultos não diferiram quanto ao Total vBMD ($p=0,36$), à Tb vBMD ($p=0,70$) e à Ct vBMD ($p=0,52$) – gráfico 7 e tabela 8 do ANEXO C.

Gráfico 6 – Comparação da DMOv total de rádio distal obtida por HR-pQCT entre os pacientes com XLHR e seus respectivos controles

Gráfico 7 – Comparação da DMOv trabecular e cortical de rádio distal obtidas por HR-pQCT entre os pacientes com XLHR estratificados por faixa etária e seus respectivos controles

Na tíbia distal, os pacientes apresentaram menor Total vBMD ($p=0,02$) do que os controles e a análise compartimental mostrou que esta diferença ocorreu às custas de um déficit do Tb vBMD ($p<0,01$) uma vez que não houve diferença da Ct vBMD ($p=0,27$) entre os grupos – gráficos 8 e 9 e tabela 7 do ANEXO C.

Gráfico 8 – Comparação da DMOv total de tíbia distal obtida por HR-pQCT entre os pacientes com XLHR e seus respectivos controles

Gráfico 9 – Comparação das DMOv trabecular e cortical de tíbia distal obtidas por HR-pQCT entre os pacientes com XLHR e seus respectivos controles

Ainda em relação à tíbia distal, na divisão por faixa etária, ambos os grupos etários mantiveram menor Tb vBMD ($p<0,01$), sem alterações na Ct vBMD nas crianças ($p=0,64$) e nos adultos ($p=0,49$) - tabela 8 do ANEXO C.

Quanto às alterações da microarquitetura óssea do rádio distal, o grupo de pacientes apresentou: menor número de trabéculas (Tb.N; $p=0,01$), maior espessura das trabéculas (Tb.Th; $p<0,01$) e maior falta da homogeneidade trabecular (SD.1/Tb.N; $p=0,02$) - tabela 7 do ANEXO C. Não houve diferenças quanto à relação entre o volume ósseo e o volume total (BV/TV; $p=0,31$), ao espaço médio entre as trabéculas (Tb.Sp; $p=0,24$) e à espessura cortical (Ct.Th; $p=0,70$) – tabela 7 do ANEXO C.

A análise da microarquitetura do rádio de crianças e adultos revelou algumas particularidades. Enquanto o grupo pediátrico teve maior BV/TV ($p<0,01$) e maior Tb.Th ($p<0,01$) do que os seus controles sem outras alterações, o grupo adulto apresentou déficits mais significativos: menor Tb.N ($p<0,01$), maior Tb.Sp ($p<0,01$) e maior SD.1/Tb.N ($p<0,01$) – gráficos 10 a 12 e tabela 8 do ANEXO C.

Gráfico 10 – Comparação da Tb.N de rádio distal obtida por HR-pQCT entre os pacientes com XLHR estratificados por faixa etária e seus respectivos controles

Gráfico 11 – Comparação da Tb.Sp de rádio distal obtida por HR-pQCT entre os pacientes com XLHR estratificados por faixa etária e seus respectivos controles

Gráfico 12 – Comparação da SD.1/Tb.N de rádio distal obtida por HR-pQCT entre os pacientes com XLHR estratificados por faixa etária e seus respectivos controles

As alterações da microarquitetura óssea da tíbia distal foram mais evidentes do que no rádio. Os pacientes com XLHR mostraram menor BV/TV ($p<0,01$), menor Tb.N ($p<0,01$), maior Tb.Sp ($p<0,01$) e maior

SD.1/Tb.N ($p<0,01$) com preservação das espessuras das trabéculas (Tb.Th; $p=0,52$) e da cortical (Ct.Th; $p=0,77$) - tabela 7 do ANEXO C. Estas mesmas diferenças se mantiveram com a estratificação nos grupos pediátrico e adulto: menor BV/TV ($p<0,01$), menor Tb.N ($p=0,04$ nas crianças e $p<0,01$ nos adultos), maior Tb.Sp ($p=0,03$ nas crianças e $p<0,01$ nos adultos) e maior SD.1/Tb.N ($p=0,01$ nas crianças e $p<0,01$ nos adultos) – tabela 8 do ANEXO C.

Por último, foi realizada a estratificação quanto ao *status* metabólico apenas para os pacientes adultos com XLHR, pois a maioria dos pacientes pediátricos estava descompensada metabolicamente. Após análise das DMOv, dos parâmetros geométricos e microestruturais de rádio e tíbia distais, não houve diferenças entre os resultados dos pacientes compensados e os dos pacientes descompensados com exceção da Ct.vBMD de tíbia distal – tabela 9 do ANEXO C.

Curiosamente, os pacientes descompensados apresentaram menor Ct vBMD do que os seus controles ($p=0,02$), enquanto esta diferença não foi observada no grupo de pacientes compensados ($p=0,49$) – gráfico 13 e tabela 9 do ANEXO C.

Gráfico 13 – Comparação das DMOv trabecular e cortical de tíbia distal obtidas por HR-pQCT entre os pacientes com XLHR estratificados por *status* metabólico e seus respectivos controles

4.4. Avaliação de nefrocalcinose e nefrolitíase

Cinco pacientes foram excluídos da análise por não apresentarem mutações inativadoras no gene *PHEX*. Outros três indivíduos não realizaram a US de rins e vias urinárias e foram retirados da avaliação também. Portanto, 39 pacientes (30 mulheres e 9 homens; 16 crianças e 23 adultos) com XLHR, confirmados com mutação no *PHEX*, foram selecionados para a avaliação renal.

A US constatou que 37 (94,9%) indivíduos com XLHR (16 crianças e 21 adultos) apresentavam NC: 36 (97%) como grau 1 e um (3%) como grau 2 - gráfico 14. Apenas dois homens adultos, ambos com 30 anos de idade, não apresentaram sinais de NC vistos pela US. Eles não tinham outras alterações metabólicas exceto a hiperfosfatúria inerente ao XLHR. Além disso, iniciaram o tratamento com fosfato tardiamente e irregularmente conforme atestado pela baixa estatura e deformidades importantes em membros inferiores apresentadas por ambos.

Em contrapartida, a TC identificou NC medular em 15 (38,5%) pacientes (nove crianças e seis adultos): 10 (66,7%) como grau 1 e cinco (33,3%) como grau 2. Nenhum paciente apresentou NC cortical nem NC grau 3. Vinte e dois pacientes com TC normal tiveram NC diagnosticada pela US como grau 1 principalmente. Todos os casos de NC detectados pela TC também tinham alterações na US - gráfico 14.

Gráfico 14 - Distribuição dos graus de NC de acordo com a US e a TC de rins e vias urinárias nos pacientes com XLHR estratificados por faixa etária

Quinze pacientes (38,5%) com XLHR foram diagnosticados com NC considerando sua presença confirmada conjuntamente pela US e TC de rins e vias urinárias alteradas. Curiosamente, a estratificação por faixa etária mostrou maior prevalência de NC nas crianças ($9/16 = 56,3\%$) em relação aos adultos ($6/23 = 26,1\%$), mas os graus de NC foram similares entre os grupos.

Os dois grupos etários diferiram particularmente quanto ao tratamento com fosfato. No momento do estudo, todas as crianças estavam em uso intensivo de fosfato, enquanto nenhum adulto fazia uso desta medicação. Isto explica a média da fosfatúria maior no grupo pediátrico comparado ao grupo adulto ($p < 0,01$). Esta diferença persistiu após a correção da fosfatúria pela creatinina urinária ($p < 0,01$), descartando possíveis problemas na coleta das amostras urinárias – tabela 5.

Tabela 5 – Avaliação da função renal e dos fatores de risco para NC e NL nos pacientes com XLHR estratificados por faixa etária

Parâmetros analisados	XLHR (n=39)	Crianças (n=16)	Adultos (n=23)	<i>p</i>
RFG (ml/min/1,73 m ²)	152±46	186±43	128±31	<0,01*
P _u (mg/kg/d)	14,7±11,5	24,1±12,9	8,2±2,5	<0,01*
Relação P _u /Cr _u	1,02±0,72	1,66±0,70	0,55±0,19	<0,01*
Pacientes com hipocitratúria	11 (28,2%)	5 (31,3%)	6 (26,1%)	0,73
Pacientes com hipercalcúria	2 (5,1%)	1 (6,3%)	1 (4,3%)	1,0

P_u: fósforo urinário; Cr_u: creatinina urinária. Valores expressos em média±DP; **p* <0,05 foi considerado estatisticamente significante.

É importante saber que parte dos adultos não fez tratamento com fosfato na infância e adolescência (9/23 = 39,1%). Entre os adultos que usaram fosfato na infância (14/23 = 60,9%), o início do seu tratamento foi mais tardio do que nas crianças (8,0±3,2 vs 2,8±2,3 anos; *p*<0,01). Adicionalmente, a dose de fosfato utilizada pelos adultos quando crianças foi menor do que a utilizada na faixa pediátrica atualmente, mas ela não pôde ser estimada em mg/kg/peso por falta de informações nos prontuários e pelas diferentes durações de tratamento.

Em contraste, quatro pacientes adultos sem uso de fosfato na infância e adolescência desenvolveram NC; dos quais dois nunca utilizaram esta medicação mesmo na fase adulta. Nenhum deles teve evidências de hipocitratúria e/ou hipercalcúria - tabela 4 do ANEXO B.

Quanto aos fatores de risco metabólico, 12 dos 39 (30,8%) indivíduos estudados possuíam alterações em mais de uma amostra de urina de 24 horas – tabela 5 e tabela 4 do ANEXO B. Nenhum paciente apresentou hiperoxalúria.

A hipocitratúria foi o fator de risco mais comum (28,2%), enquanto a hipercalcúria foi detectada em apenas uma criança sem evidências de NC e em uma adulta (paciente 16). Hipercalcúria e hipocitratúria foram identificadas conjuntamente somente na paciente 16. Não houve diferença

quanto à presença de hipercalciúria e hipocitratúria entre os grupos com e sem NC ($p=1,0$ em ambas as comparações).

Duas famílias estudadas (famílias I e VI – tabela 3 do ANEXO B) tiveram mais de um membro com diagnóstico de NC. Na família I, o pai tinha NC grau 1 e as duas filhas foram detectadas com NC grau 2 (pacientes 2, 3 e 4 – tabela 3 do ANEXO B). Nenhum deles tinha outras alterações metabólicas com exceção da hiperfosfatúria. Na família VI, a mãe e o seu filho (pacientes 16 e 17 - tabela 3 do ANEXO B) foram diagnosticados com NC grau 2 e ambos apresentavam hipocitratúria. A mãe também apresentava NL diagnosticada pela TC e, teve diagnóstico de hiperparatireoidismo terciário no decorrer do estudo, aos 29 anos. Ela foi tratada cirurgicamente com sucesso e consequente normalização da calciúria.

Além deste caso, outra mulher (paciente 47 - tabela 3 do ANEXO B) tinha antecedente de hiperparatireoidismo terciário tratado cirurgicamente antes do estudo. Ela não apresentou hipercalciúria no decorrer da avaliação, mas teve o diagnóstico de NC grau 1.

Em relação à pesquisa de NL, quatro adultos (10,3%) foram identificados pela TC, dos quais duas tinham NC associada (pacientes 16 e 18 – tabela 3 do ANEXO B). Somente a paciente 16 tinha histórico de cólica nefrética, enquanto os demais eram assintomáticos. Além dessa paciente com alterações metabólicas urinárias, apenas uma adulta foi detectada com hipocitratúria. Nenhuma criança foi diagnosticada com NL - tabela 4 do ANEXO B.

Apesar da presença de NC e NL, a maioria dos indivíduos tinha função renal normal. Somente uma idosa (paciente 1 - tabela 3 do ANEXO B) possuía diminuição da RFG - estágio 3 de acordo com o *National Kidney Foundation* (54). Ela apresentou NC grau 1 apenas pela US, nunca fez uso de fosfato e era hipertensa mal controlada.

5. DISCUSSÃO

5.1. Estatura nos RQ/OM hipofosfatêmicos de origem genética mediados por FGF23

A baixa estatura foi uma característica fenotípica marcante nos nossos pacientes com RQ/OM hipofosfatêmicos. Após a estratificação dos pacientes por faixa etária e uso de fosfato na infância e adolescência, o grupo de pacientes pediátricos, em uso intensivo de fosfato, apresentou a maior média do Z de estatura ($-2,4 \pm 1,4$). Além disso, observou-se menor média do Z de estatura no grupo de adultos que não fizeram uso de fosfato em comparação aos que utilizaram esta medicação ($-4,2 \pm 1,5$ vs $-3,0 \pm 1,3$). Estes dados demonstram o impacto positivo do emprego do fosfato durante a infância e adolescência na melhora da estatura dos pacientes com RQ/OM hipofosfatêmicos de origem genética. Dados similares já haviam sido descritos por Reusz *et al* (59).

A diferença entre as médias do Z de estatura dos adultos que fizeram uso de fosfato durante a infância e adolescência e dos pacientes pediátricos pode estar relacionada à dose, início e/ou duração de tratamento com fosfato. Apesar disso, não foi possível confirmar esta hipótese devido à falta de informações em alguns prontuários e à imprecisão nos relatos dos adultos sobre o uso de fosfato.

Neste sentido, em seus relatos, tanto Makitie *et al* como Vaisbich *et al* alertam para a importância da precocidade no início do tratamento (60, 61). No entanto, em nossa casuística pediátrica, não encontramos correlações entre o Z de estatura e o início do tratamento com fosfato, nem com sua duração. Os principais motivos para estes resultados devem estar relacionados à casuística pequena e ao fato de não conseguirmos estimar a aderência do paciente ao uso do fosfato. Segundo Makitie *et al*, a falta de

vigilância dos pais, o gosto ruim das soluções de fosfato e a falta de sintomas exuberantes contribui para a baixa adesão em jovens (60). A estes fatores, acrescentamos a posologia da medicação em quatro tomadas diárias longe das refeições preferencialmente.

Apesar do ganho estatural com melhora da velocidade de crescimento e dos sinais de raquitismo (dados não mostrados) durante o tratamento com fosfato de sódio e potássio, a normalização estatural não aconteceu na maioria dos casos à semelhança do relato de Cho *et al* (62). Segundo Verge *et al*, estes pacientes não atingem seu potencial estatural total, pois o tratamento aparentemente não promove a cura histológica da doença (63).

Quanto à relação Es/E, a maior parte dos pacientes estudados com baixa estatura (88,5%) apresentou desproporção corporal devido às deformidades em membros inferiores, principalmente os adultos que não fizeram uso de fosfato na infância e tinham a menor média do Z de estatura. À semelhança dos nossos resultados, Zivcnjak *et al* comprovaram maior desproporção corporal com maiores valores do Z da relação Es/E em pacientes com menor estatura (64). Estas alterações antropométricas ocorrem por um maior comprometimento da doença nos ossos longos dos membros inferiores e superiores em comparação ao esqueleto axial, mesmo em pacientes com estatura normal (12, 65).

A desproporção corporal foi identificada em parte da nossa casuística pediátrica, particularmente em adolescentes com menor estatura. Aparentemente, esta desproporção entre os segmentos corpóreos em pacientes com RQ/OM hipofosfatêmicos tem piora progressiva com o avançar da idade e persiste apesar do controle metabólico com o tratamento intensivo com fosfato e calcitriol (64).

5.2. Etiologia molecular dos pacientes com RQ/OM hipofosfatêmicos de origem genética mediados por FGF23

Ao limitarmos a população estudada aos casos de origem genética mediados por FGF23, com base em dados clínicos e laboratoriais, houve a constituição de um grupo relativamente homogêneo que aumentou a probabilidade de determinação da sua etiologia molecular.

Em nossa casuística, a principal forma hereditária encontrada em casos familiares e esporádicos foi o XLHR devido à presença de mutações inativadoras no *PHEX* em 87,2% dos pacientes. Este resultado é consistente com o percentual de mutações detectadas neste gene, 25-87%, em relatos prévios, confirmando o XLHR como a forma mais comum de RQ/OM hipofosfatêmico de origem genética (66-68). Portanto, neste grupo de pacientes, o início do estudo molecular pelo *PHEX* constitui uma estratégia racional.

Através da PCR e do sequenciamento automático, foram detectadas 24 mutações no *PHEX* dispersas ao longo de toda sua região codificadora e sítios de *splicing*, sinalizando a importância de cada éxon na função do gene e a necessidade de investigação de toda a sua extensão. Apesar de existirem, aproximadamente, mais de 300 diferentes mutações no *PHEX* descritas, os principais mecanismos envolvidos incluem mutações de ponto, microdeleções e microinserções facilmente detectáveis pelo método de Sanger (66, 68, 69). Desta forma, estes devem ser os primeiros tipos de mutações a serem investigadas no gene *PHEX*.

Devido à localização deste gene no cromossomo X e à sua herança dominante, pacientes do sexo feminino com deleções e/ou duplicações em um único ou vários éxons podem não ser identificadas pelo método de Sanger. Portanto, evidencia-se a importância de técnicas, como o MLPA, na identificação das alterações do número de cópias em heterozigose do *PHEX* no XLHR. Nesta casuística, o emprego do MLPA contribuiu para o aumento do percentual de mutações detectadas ao identificar cinco mutações

(12,1%): quatro deleções e uma duplicação. Este percentual foi semelhante ao relatado por Beck-Nielsen *et al* (70).

Apesar dos diferentes tipos de mutações encontradas, todos os pacientes estudados apresentaram o fenótipo clássico do XLHR, visto que o *PHEX* apresenta alta penetrância (66). Variações fenotípicas foram preferencialmente influenciadas pelo tratamento com fosfato e calcitriol. Entretanto, há raros relatos da literatura que descrevem discordância genótipo-fenótipo. Por exemplo, em um trabalho, enquanto o caso índice apresentava o fenótipo evidente de XLHR, seus familiares com o mesmo genótipo tinham apenas alterações laboratoriais (66). Diante deste fato, o envolvimento de genes moduladores e de elementos regulatórios do *PHEX* não pode ser descartado na patogênese do XLHR e no desfecho clínico das mutações. (9, 66, 71).

5.3.DMO e os parâmetros estruturais ósseos nos XLHR

Nossos resultados mostraram maior DMOa em L1-L4 nos pacientes com XLHR em relação a controles saudáveis à semelhança dos relatos de Beck Nielsen *et al* (12, 65). Ao estratificarmos os pacientes por faixa etária, este achado se manteve apenas no grupo adulto da nossa casuística. Tipicamente, este aumento de DMOa é justificado pela presença de calcificações extra-esqueléticas (12), particularmente representadas por entesopatias ligamentares. Estas foram confirmadas na maioria dos pacientes adultos estudados por meio do RX de coluna lombar (dados não mostrados).

Geralmente, as crianças e adolescentes não apresentam estas alterações extra-esqueléticas. Rauch explica este padrão baseado na teoria do mecanostato, na qual o aumento da DMOa é uma consequência do aumento da formação de osso trabecular pelo estímulo dos osteócitos como adaptação às maiores cargas mecânicas (72).

Por sua vez, a DMOa no colo de fêmur e fêmur total não diferiu entre os grupos, como relatado por Beck Nielsen *et al.* (12). O aumento da DMOa consequente à formação de osso trabecular contrabalança a subestimação da DMOa pelo menor tamanho dos ossos dos pacientes com XLHR, resultando em valores normais nestes sítios (65).

Finalmente, no rádio distal total, não houve diferenças entre os grupos quanto à DMOa. Shore *et al* também relataram valores normais de DMOa no rádio distal total de pacientes com XLHR (73), embora outros estudos tenham demonstrado menor DMOa neste sítio (74, 75).

Apesar da ausência de alterações em rádio distal total, os pacientes com XLHR apresentaram menor DMOa em 1/3 distal de rádio, sem alterações da DMOa em rádio ultradistal, comparados aos controles. Dados referentes à DMOa em 1/3 distal do rádio e rádio ultradistal no XLHR são escassos na literatura. Considerando que a composição do 1/3 distal de rádio é de 13% de osso trabecular e 87% de osso cortical e que a composição do rádio ultradistal é de 55% de osso trabecular e 45% de osso cortical (76), esse achado pode ser um reflexo dos diferentes efeitos da doença nos componentes trabecular e cortical (77).

Diante destes fatos, a interpretação dos resultados de DXA deve ser feita com cautela devido à interferência de fatores anatômicos e antropométricos (78). Por outro lado, a HR-pQCT avalia a DMOv em áreas distais e sofre menor influência do tamanho do ossos longos e da presença de alterações extra-esqueléticas (33).

Apesar de não termos encontrado alterações geométricas na análise da HR-pQCT de rádio e tíbia distais dos pacientes com XLHR, estudos prévios relatam maior área total no rádio distal decorrente do aumento da área trabecular como uma adequação para a preservação da resistência óssea (77, 79).

No rádio distal dos nossos pacientes com XLHR, não foram encontradas alterações na DMOv total nem nos seus componentes trabecular e cortical. Após a estratificação dos pacientes por faixa etária, as

crianças apresentaram maior DMOv trabecular em comparação aos seus controles, enquanto esta alteração não foi observada nos adultos. Não foi identificada alteração da DMOv cortical em ambos os grupos etários.

Resultados similares foram relatados por Cheung *et al* que identificaram maior DMOv trabecular no rádio distal de pacientes com XLHR, particularmente naqueles em uso de fosfato e calcitriol comparados aos que não usaram as medicações (79). Estes dados assemelham-se aos observados em nossa casuística, visto que as crianças estudadas estavam em uso intensivo de fosfato e que os adultos não usavam a medicação. Segundo Cheung *et al*, o aumento da DMOv trabecular seria um reflexo do aumento da mineralização deste compartimento estimulado pelo uso de fosfato e calcitriol e este mecanismo estaria perdido com a descontinuação das medicações (79).

Na tíbia distal, os pacientes com XLHR apresentaram menor DMOv total do que seus controles às custas do componente trabecular sem alterações do componente cortical. Este déficit foi observado nas crianças e nos adultos com XLHR. Diferentemente, Veilleux *et al* referem redução da DMOv cortical sem comprometimento da DMOv trabecular em tíbia distal de pacientes com XLHR (58).

Estas diferenças na DMOv de rádio e tíbia distais podem ser atribuídas às cargas mecânicas distintas presentes nestes sítios. Ossos em regiões de maior carga mecânica, como a tíbia, apresentam um maior impacto das alterações ósseas do que as regiões com menor carga mecânica, como o antebraço (78). Além disso, as deformidades em membros inferiores, presentes no XLHR, modificam os pontos de tensão e resultam na distribuição heterogênea da carga mecânica com consequente formação óssea heterogênea e assimétrica. Desta forma, elas contribuem para um maior déficit na aquisição de massa óssea na tíbia.

Quanto à análise da microarquitetura óssea, alterações estruturais trabeculares foram encontradas em ambos os sítios dos pacientes com XLHR. No rádio, os pacientes apresentaram menor número de trabéculas e

maior perda da homogeneidade da rede trabecular; na tíbia, foram demonstrados menor número de trabéculas, maior separação das trabéculas e maior perda da homogeneidade trabecular. Estes achados são consistentes com um estudo prévio com microTC de alta resolução em *Hyp mouse* (modelo murino equivalente ao PHEX humano deficiente) (80) e *in vivo* (77) e reforçam o efeito deletério da doença no componente trabecular nos diferentes sítios no XLHR.

Ao separarmos os pacientes com XLHR por faixa etária, as alterações de microarquitetura no rádio foram predominantes nos adultos, os quais não estavam em vigência de fosfato. Ao contrário, as crianças, em tratamento intensivo com fosfato, não apresentaram os mesmos déficits. Na tíbia, as alterações na estrutura trabecular estiveram presentes nos dois grupos. Estes achados podem sugerir o efeito benéfico do tratamento com fosfato na microarquitetura óssea, sendo mais evidente no rádio pelo menor impacto das cargas mecânicas.

Após a estratificação dos adultos pelo *status* metabólico, não houve diferenças entre os pacientes com XLHR compensados e os não compensados quanto às alterações na DMOv trabecular e aos parâmetros estruturais encontrados em rádio e tíbia distais.

Curiosamente, na tíbia distal, os pacientes descompensados apresentaram menor DMOv cortical do que os controles, enquanto os pacientes compensados tiveram resultados similares aos controles. Cheung *et al* comentam sobre o efeito positivo da aderência ao tratamento na melhoria da mineralização dos componentes ósseos (79). Desta forma, em nossa casuística, este achado indica que o tratamento efetivo pode recuperar a mineralização nos pacientes com XLHR. Além disso, a região óssea cortical seria restabelecida primariamente pelo tratamento, ao mesmo tempo em que o componente trabecular teria menor capacidade de regeneração por sofrer maior efeito deletério da doença.

Um diferencial deste estudo é a avaliação de parâmetros ósseos com o uso conjunto de duas técnicas de imagem diferentes em uma casuística de

pacientes com mutações no *PHEX* confirmadas por técnicas de biologia molecular. Além do mais, a estratificação por grupos etários e *status* metabólico trouxe novas informações sobre o XLHR. Entretanto, é importante notar algumas limitações. Por exemplo, o tamanho da amostra e a falta de um número maior de homens não permitiu a análise de possíveis diferenças de gênero. Além disso, o desenho transversal do estudo limita a interpretação das alterações a longo prazo com o manejo do tratamento.

5.4. Nefrocalcinose e nefrolitíase nos XLHR

Neste trabalho, a prevalência de NC confirmada pelos dois métodos de imagem (US e TC) foi de 38,5% e, após a estratificação por faixa etária, o grupo pediátrico teve maior prevalência de NC que o grupo adulto (56,3% vs 26,1%).

Na literatura médica, a prevalência de NC variou de 17 a 80% em séries de pacientes com diagnóstico clínico de XLHR (61, 63, 81). Nestes trabalhos, o diagnóstico de NC foi baseado apenas nos resultados da US, o que confere menores sensibilidade e especificidade para o diagnóstico comparada à utilização de duas técnicas radiológicas conjuntamente (43).

Ao analisar os resultados fornecidos por cada método de imagem, notou-se que a US diagnosticou majoritariamente a NC em estágios mais precoces (grau 1), enquanto a TC identificou maior proporção de casos mais avançados (grau 2). Esta diferença se deve à maior sensibilidade da US e à maior especificidade da TC no diagnóstico da NC (35, 43, 50).

Boyce *et al* explicam que pequenas agregações de cálcio e fosfato atuam como fortes refletores de ondas sonoras, sendo assim detectadas mais facilmente pelo US. Apesar disso, elas não possuem densidade suficiente para absorver a radiação emitida pela TC e serem identificadas neste estágio inicial de NC (35).

Embora o uso de ambos os métodos de imagem forneça maior

acurácia no diagnóstico da NC (43), uma vantagem da US, particularmente na faixa pediátrica, é a ausência dos efeitos deletérios a longo prazo causados pela radiação empregada na TC (82). Assim, acreditamos que a US é importante para a triagem e avaliação evolutiva dos casos de NC, enquanto a TC tem papel fundamental na confirmação do diagnóstico.

Em relatos prévios, um dos principais fatores de risco considerados para o desenvolvimento de NC é a hipercalcúria (61-63, 83). Entretanto, nestes estudos, a maior parte dos pacientes teve o diagnóstico baseado somente em dados clínicos e laboratoriais, podendo ter incluído outros tipos de tubulopatias perdedoras de fósforo que cursam naturalmente com hipercalcúria.

Diferentemente destes trabalhos, em nossa coorte, a hipercalcúria foi encontrada em apenas uma paciente com NC durante o período no qual ela desenvolveu hiperparatireoidismo terciário. Além disso, esta paciente apresentava hipocitratúria e NL.

O baixo consumo de cálcio na dieta, a irregularidade no uso de carbonato de cálcio e calcitriol pelos pacientes e o monitoramento constante (medidas frequentes de calcemia, PTH e calcúria com ajustes das doses de calcitriol e/ou sais de cálcio quando necessários) devem explicar este resultado.

Embora a hipocitratúria seja considerada fator de risco para a formação de NC (84), esta alteração metabólica não tem sido pesquisada em indivíduos com XLHR. Apesar da detecção em um terço dos nossos pacientes, a hipocitratúria esteve igualmente presente nos grupos com e sem NC.

Nesta série, o principal fator de risco metabólico para a formação de NC foi a sobrecarga renal de fosfato agravada pelo tratamento. Este dado é realçado pela diferença da prevalência de NC entre o grupo pediátrico e o grupo adulto (56,3% vs 26,1%). Além do mais, parte dos adultos não usaram fosfato na infância e adolescência (39,1%) e aqueles que tomaram fosfato

tiveram o início de tratamento mais tardio com o uso de doses menores que as utilizadas atualmente e com menor regularidade.

Dados experimentais em coelhos, nos quais a gravidade da NC foi diretamente proporcional às doses de fosfato ingeridas, confirmam *in vivo* o efeito deletério da hiperfosfatúria sobre o tecido renal (85). Como em nossos resultados, casuísticas menores e mais antigas sem o diagnóstico molecular de XLHR também sugerem as repercussões danosas do uso do fosfato *in vivo* (63, 83).

Apesar da importância da hiperfosfatúria na gênese da NC, não foi possível estabelecer um valor de corte para a fosfatúria, a partir do qual houvesse um maior risco de desenvolvimento de NC, particularmente nas crianças em tratamento intensivo com fosfato. Isto deve ter ocorrido pelo número limitado de pacientes e pelo desenho transversal do estudo, no qual a análise da fosfatúria por um curto período de tempo não permite a avaliação do efeito cumulativo desta.

O uso de fosfato agrava a hiperfosfatúria ao estimular a produção de FGF23, mas é fundamental para a melhora da estatura final e atenuação das deformidades esqueléticas dos pacientes com XLHR. Nossa paciente mais jovem detectada com NC tinha três anos de idade. Nesse e em outros casos de crianças com NC, consideramos a redução das doses do fosfato, mas a manutenção das dosagens foram necessárias para a preservação da velocidade de crescimento adequada, manutenção dos níveis dos marcadores de formação óssea próximos aos valores de normalidade e ausência de sinais radiológicos de raquitismo. A continuidade deste estudo, por meio da avaliação evolutiva da US renal destas crianças, deve revelar mais informações da história natural da NC em pacientes com XLHR.

Quatro pacientes adultos (4/15 = 26,7%), que não fizeram uso de fosfato na infância e adolescência, desenvolveram NC; dos quais dois nunca utilizaram esta medicação e não tinham hipocitratúria e/ou hipercalciúria. Estes dados sugerem a influência da doença *per si* na gênese da NC no XLHR pelo comprometimento da reabsorção de fosfato no túbulo proximal e

consequente maior exposição do tecido renal ao fosfato independente do tratamento.

Em contraste aos 38,5% de NC, 10,3% dos pacientes com XLHR estudados tiveram NL, frequência superior à prevalência de NL na população geral (37-39). Curiosamente, nenhuma criança foi diagnosticada com NL, o que sugere uma menor influência da hiperfosfatúria no desenvolvimento deste tipo de calcificação renal. Dos quatro pacientes com NL, uma exibia hipocitratúria e outra tinha hipocitratúria e hipercalcúria associadas. Apesar da amostra pequena, estes dados sugerem maior impacto da hipocitratúria e da hipercalcúria na gênese da NL do que na formação de NC em pacientes com XLHR. Adicionalmente, estudo recente mostrou maior frequência de NL (15,3%) em relação à NC (10,2%) associada à maior relação cálcio/creatina urinária em 177 pacientes com hiperparatireoidismo primário (86).

A despeito da presença de NC e NL, a maioria dos pacientes não teve alteração da função renal, o que indica um provável curso benigno dessas calcificações. Mesmo com dados sugestivos da influência da doença *per se* na gênese da NC e o agravamento desta complicação pelo tratamento, a história natural da NC e NL no XLHR ainda não está totalmente esclarecida.

Estudos longitudinais com o uso de anticorpo humano anti-FGF23 (KRN23) em pacientes com XLHR têm mostrado uma maior segurança e efetividade deste novo recurso terapêutico (16, 17). Assim, esta nova medicação deve mudar a história natural das calcificações renais encontradas no XLHR devido à correção da hiperfosfatúria.

Os pontos fortes deste estudo foram: o maior tamanho da amostra comparado a estudos prévios, o estudo de imagem realizado pela US e TC conjuntamente, a homogeneidade da casuística devido à análise molecular e o seguimento em um centro único. Entretanto, o desenho transversal limitou a avaliação dos efeitos a longo prazo das complicações renais encontradas.

6. CONCLUSÕES

Nos nossos pacientes com RQ/OM hipofosfatêmicos de origem genética mediados por FGF23:

- A baixa estatura desproporcionada foi uma característica fenotípica marcante e a falta do uso de fosfato na infância e adolescência foi determinante na sua ocorrência.
- O tratamento com fosfato na infância e adolescência teve um impacto positivo na estatura dos pacientes embora a normalização estatural não tenha sido atingida na maioria dos casos.
- A forma hereditária mais comum foi a XLHR devido à alta prevalência de mutações identificadas no *PHEX* e este deve ser o primeiro gene investigado neste grupo de pacientes.

Nos nossos pacientes com XLHR:

- Os valores de DMOa obtidos pela DXA devem ser analisados com cautela devido às interferências de alterações anatômicas e antropométricas.
- Segundo os dados obtidos por HR-pQCT, os comprometimentos da DMOv e da microarquitetura óssea ocorreram principalmente às custas do compartimento trabecular, sendo mais acentuados em tíbia em relação ao rádio. Estas diferenças devem estar relacionadas às distintas cargas mecânicas presentes nestes sítios.
- O tratamento intensivo com fosfato e/ou calcitriol parece ter um impacto positivo na mineralização óssea, principalmente no compartimento cortical.

- Apesar da prevalência de NC e de NL serem superiores às encontradas na população geral, seus portadores não cursam com prejuízo significativo da função renal.
- O principal fator de risco metabólico associado à formação de NC foi a hiperfosfatúria inerente à doença agravada pelo tratamento intensivo com fosfato.
- A hipercalcúria e a hipocitratúria devem ser consideradas na gênese da NL.

7. ANEXOS

ANEXO A - *Primers* para a avaliação da região codificadora dos genes *PHEX* e *FGF23* (tabelas 1 e 2)

Tabela 1 – Sequência dos *primers* para a avaliação da região codificadora do gene *PHEX*, éxons amplificados e tamanho dos *amplicons*

<i>Primers</i>	Sequência nucleotídea dos <i>primers</i>	Éxon	Tamanho dos <i>amplicons</i>
Phex 1F	5' TTTCCTGACGGCAGTTTCTT 3'	1	373 pb
Phex 1R	5' ACCTATGAACGCAGGCAAAC 3'		
Phex 2F	5' TGGGTTTTGGAATACCGTGT 3'	2	374 pb
Phex 2R	5' GCTCCACTGTTTCACACCAA 3'		
Phex 3F	5' AAGGCTTGGAAGTGGTTGA 3'	3	352 pb
Phex 3R	5' AGTCATGCTTCAAATCCCAA 3'		
Phex 4F	5' GTCTTTTCCAGGGTTGTCTGT 3'	4	364 pb
Phex 4R	5' TCCAGTCTTTCACAATCATTCC 3'		
Phex 5F	5' CCACCCACCTCTTTTACCT 3'	5	455 pb
Phex 5R	5' ATGAGTCTCTTCCCCAGGA 3'		
Phex 6F	5' AATATGGCTGGGATGCAGAC 3'	6	294 pb
Phex 6R	5' TCCTGCATTGGGAATATGGT 3'		
Phex 7F	5' GCACCATACTTTGAGTACAGAGTGA 3'	7	398 pb
Phex 7R	5' CAATGGGCAATGACACAAAA 3'		
Phex 8F	5' ATGCAGATGTTTTGGCACAT 3'	8	339 pb
Phex 8R	5' GGCATCCCAATACACAGACA 3'		
Phex 9F	5' GGATGGCAATGATCAGGAGT 3'	9	444 pb
Phex 9R	5' ACCGGGATTTTCCCTATGAC 3'		
Phex 10F	5' GGAGCTTTGCCAACTGTTTC 3'	10	340 pb
Phex 10R	5' GGCACACACACACACAAAA 3'		

continua

continuação

Primers	Sequência nucleotídea dos primers	Éxon	Tamanho dos amplicons
Phex 11F	5' GGGTTAGGGTGTGCAGTGTT 3'	11	355 pb
Phex 11R	5' GACAATACCCACAGGCCACT 3'		
Phex 12F	5' CAGAGCATGGAGTCAAGCTG 3'	12	366 pb
Phex 12R	5' TCTGGGGTCATTGAGAGTCA 3'		
Phex 13F	5' ATTTTGGCCCTTCACAGTGG 3'	13	378 pb
Phex 13R	5' CCTGGCATATTCAGGCTCAT 3'		
Phex 14F	5' CATGGCTTTGTGACTTCTGG 3'	14	372 pb
Phex 14R	5' AACTGGCAAGCCAGCTACTC 3'		
Phex 15F	5' GTCCAACATCCCCATTGTTC 3'	15	312 pb
Phex 15R	5' CAACCTTCCTTCACCAGCAT 3'		
Phex 16F	5' GAGGAGTGCCTTTCAGATGG 3'	16	278 pb
Phex 16R	5' TTCCATGGCTTCTTTCTGCT 3'		
Phex 17F	5' GCAGTTTATCTTGGCTTTCCA 3'	17	338 pb
Phex 17R	5' TTATTGCAAGCCATCACAGC 3'		
Phex 18F	5' TTTTGAAGGCTTGTCTGAGGT 3'	18	379 pb
Phex 18R	5' TTCAGCAGGTATGGGGTAGG 3'		
Phex 19F	5' GCTGAGGATAGTTTGCCATCTT 3'	19	398 pb
Phex 19R	5' GGTCAATGGGGAGACACACT 3'		
Phex 20F	5' GGTGTACCTGCCTCACTGGT 3'	20	391 pb
Phex 20R	5' TGCTGAAAATCAAAGTCATGC 3'		
Phex 21F	5' CTTCTACTCTGGGGATCAGA 3'	21	393 pb
Phex 21R	5' ATGGAAATCACACGTCCACA 3'		
Phex 22F	5' GGGCTTTAGTTGTCTCCCTGT 3'	22	332 pb
Phex 22R	5' TCTCCAGGCCTAAAGCAATG 3'		

Tabela 2 - Sequência dos *primers* para a amplificação do éxon 3 do gene *FGF23* e tamanho do *amplicon* gerado

Primers	Sequência nucleotídea dos primers	Éxon	Tamanho do amplicon
FGF23 3F	5' GCTCAACGCCCTAAGAACTG 3'	3	696 pb
FGF23 3R	5' CCCAGAGAAGCAGCAAATTC 3'		

ANEXO B – Dados clínicos, laboratoriais e de imagem dos pacientes com RQ/OM hipofosfatêmicos de origem genética mediados por FGF23 (figuras 1 e 2; tabelas 3 e 4)

Figura 1 - Heredograma da família I

Figura 2 - Heredograma da família II

Tabela 3 – Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com RQ/OM hipofosfatêmicos de origem genética mediados por FGF23

Família	Paciente	Sexo	Idade (anos)	Estatura (Z)	Es/E (Z)	FGF23 (pg/mL)	P (mg/dL)	TRP (%)	FA (UI/L)	P1NP (ng/mL)	OC (ng/mL)	CTx (ng/mL)	RFG (ml/min/1,73 m ²)	Ca (mg/dL)	Ca _i (mg/dL)	PTH (pg/mL)	25OHD (ng/mL)
I	1	F	76	-5,5	ND	152	2,3	70	110	88,7	24	0,29	60	10,0	5,6	90	43
	2	M	39	-2,8	5,6	64	1,9	89	75	57,2	15	0,41	119	9,7	5,1	58	31
	3	F	15	-2,2	1,5	81	2,8	76	213	292	49	2,06	142	9,3	4,8	83	28
	4	F	11	-2,2	3,1	92	3,2	83	716	1038	119	3,56	185	9,8	5,2	102	17
	5	F	7	-1,2	2,2	150	3,1	74	350	874	84	2,53	172	9,6	4,6	91	37
II	6	F	52	-3,6	4,6	58	2,2	84	78	31,2	17	0,25	112	9,0	4,7	105	26
	7	F	33	-2,8	2,3	113	2,6	94	67	34,3	14	0,21	131	9,6	5,3	19	41
	8	M	30	-4,0	8,9	64	2,1	80	180	92,3	50	0,75	149	9,6	5,1	111	23
III	9	F	4	0,8	1,4	68	3,0	94	403	1121	138	1,46	285	9,6	4,9	83	31
	10	M	57	-3,2	8,0	89	1,7	85	114	43,5	26	0,48	126	9,0	4,6	87	34
IV	11	M	51	-2,6	7,0	99	1,9	78	93	60,8	29	0,53	108	9,5	4,6	90	41
	12	F	56	-5,1	6,0	65	2,4	89	171	73,7	19	0,40	119	9,8	5,1	137	26
V	13	F	18	-3,9	3,7	98	2,2	86	209	143	53	0,91	138	9,2	4,8	88	24
	14	F	40	-2,4	3,7	72	2,5	94	69	35,1	13	0,18	133	9,4	5,2	43	30
VI	15	F	3	-2,3	1,2	79	3,0	90	533	1042	79	2,86	175	9,5	4,9	34	54
	16	F	32	-2,4	4,3	464	2,4	87	105	39,5	17	0,40	132	9,5	4,6	40	35
VII	17	M	12	-2,5	3,1	135	2,8	79	421	686	175	4,33	237	9,4	4,7	70	37
	18	F	41	-3,1	2,2	67	2,1	83	116	56,2	20	0,61	142	9,3	4,8	53	38
VIII	19	M	7	-4,7	3,0	149	2,7	80	332	777	72	3,02	205	9,3	4,9	23	32
	20	F	51	-3,7	3,7	53	1,9	62	107	48,4	29	0,68	117	9,4	4,8	118	12
IX	21	F	3	-2,3	1,0	178	2,9	79	588	3132	176	2,43	252	9,7	5,2	72	59
	22	M	9	-2,2	2,4	129	3,1	82	400	1116	143	3,10	149	9,8	5,0	26	41
Esporádico	23	F	10	-1,5	6,3	129	2,8	69	434	928	99	3,23	212	9,4	4,9	157	39
	24	F	12	-0,4	2,1	197	2,8	64	416	821	103	2,11	167	9,8	4,6	46	40
	25	F	15	-4,3	4,7	60	2,9	86	436	988	116	5,01	149	9,2	5,0	141	42
	26	M	15	-2,8	7,6	108	2,0	64	733	1089	221	3,45	199	9,3	5,1	101	27
	27	F	17	-3,6	5,4	257	2,0	79	129	89,1	35	0,93	156	9,0	4,9	66	36
	28	F	17	-3,3	4,0	182	1,9	77	271	291	70	1,64	149	9,5	5,1	72	20
	29	F	21	-3,6	4,3	58	2,2	87	68	48,9	25	0,45	161	8,9	4,8	39	25
	30	F	23	-0,8	0,4	67	2,1	93	162	95,9	52	0,96	176	9,6	5,1	73	21
	31	M	23	-4,9	6,7	87	1,9	87	152	178	44	1,45	165	9,9	5,1	28	39
	32	F	25	-1,9	2,7	62	2,3	81	85	85,8	25	0,87	141	8,6	4,7	57	29
	33	F	27	-4,5	4,7	107	2,4	89	133	90,8	30	0,74	189	8,9	4,8	48	24
	34	F	29	-3,0	4,0	86	2,4	93	65	52,8	16	0,29	132	9,0	5,1	28	33
	35	F	29	-1,4	1,4	113	2,1	69	146	187	46	1,27	129	8,7	5,0	46	46
	36	M	30	-3,6	3,9	128	1,6	61	87	82,9	33	0,81	171	9,8	4,8	63	45
	37	F	31	-0,7	2,4	68	2,0	75	51	27,4	9	0,34	173	8,6	4,8	98	34
	38	F	32	-2,2	3,0	80	2,3	90	110	59,9	36	0,52	114	10,1	5,1	56	29
	39	F	37	-5,1	ND	89	2,5	93	193	59,7	17	0,32	158	8,5	5,3	40	24
	40	F	40	-5,2	3,7	77	2,2	91	45	28,4	11	0,26	115	9,2	4,6	54	27
	41	F	43	-6,2	ND	120	1,7	89	96	34,1	10	0,26	142	9,3	5,1	41	20
	42	F	45	-1,3	4,4	63	2,1	80	72	23,9	16	0,17	114	9,1	4,9	85	22
	43	M	54	-5,9	3,7	1241	1,4	76	164	91,2	13	0,30	140	10,1	5,2	86	23
	44	F	57	-5,8	7,2	800	1,5	61	58	30,0	20	0,30	92	9,6	4,9	42	57
	45	F	58	-5,2	4,5	107	2,3	87	67	41,5	15	0,38	115	9,4	4,9	30	29
	46	F	63	-3,4	0,1	94	2,8	74	43	30,6	11	0,35	39	8,6	4,9	77	37
	47	F	71	-4,5	4,2	487	2,7	76	100	40,0	24	0,43	77	9,8	5,1	18	40
Valores de referência:						10-50	1-12a: 3,4-6,2 >12a: 2,7-4,5	>95	4-6a: < 269 7-12a: < 300 13-17a: < 187 (F) e < 390 (M) >18a: 35-104 (F) e 40-129 (M)	Para adultos: F: 15,1-58,6 M: 13,9-85,5	Para adultos: F: 11-43 M: 14-42	Para adultos: F: <0,57 M: <0,70	>90	2 a 12 a: 8,8-10,8 13 a 60 a: 8,4-10,2 61 a 90 a: 8,8-10,2	< 12a: 4,8-5,5 > 12a: 4,6-5,3	15-65	>30

Tabela 4 - Avaliação dos pacientes com XLHR e diagnóstico de NC e/ou NL e seus fatores de risco metabólicos

Nome	NC	NL	Hipercalciúria	Hipocitratúria	Tratamento com fosfato		
					Na infância e adolescência	Idade de início (anos)	Duração (anos)
Crianças e adolescentes (n=9 de um total de 16)							
Paciente 3	Presente	Não	Não	Não	Presente	1	12
Paciente 4	Presente	Não	Não	Não	Presente	1	10
Paciente 9	Presente	Não	Não	Presente	Presente	1	3
Paciente 17	Presente	Não	Não	Presente	Presente	9	3
Paciente 21	Presente	Não	Não	Não	Presente	1	2
Paciente 22	Presente	Não	Não	Presente	Presente	2	7
Paciente 24	Presente	Não	Não	Não	Presente	5	7
Paciente 27	Presente	Não	Não	Não	Presente	3	15
Paciente 28	Presente	Não	Não	Não	Presente	4	13
Adultos (n=8 de um total de 23)							
Paciente 2	Presente	Não	Não	Não	Não	0	0
Paciente 11	Não	Presente	Não	Não	Presente	13	21
Paciente 16	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	3	9
Paciente 18	Presente	Presente	Não	Não	Não	0	0
Paciente 30	Presente	Não	Não	Não	Presente	5	15
Paciente 32	Não	Presente	Não	Presente	Presente	5	14
Paciente 44	Presente	Não	Não	Não	Não	49	6
Paciente 47	Presente	Não	Não	Não	Não	42	4

ANEXO C – DMO, parâmetros geométricos e dados de microarquitetura óssea obtidos por DXA e HR-pQCT: comparação entre pacientes com XLHR e controles saudáveis (tabelas 5 a 9)

Tabela 5 – DMOa obtida por DXA: comparação entre pacientes com XLHR e controles saudáveis

Sítios	Pacientes (n)/Controles (n)	DMOa (g/cm ²) XLHR	DMOa (g/cm ²) Controles	p
L1-L4	38/38	1,17 [0,56;1,96]	0,99 [0,47;1,69]	0,03*
Colo de fêmur	33/33	0,79±0,19	0,81±0,12	0,58
Fêmur total	33/33	0,91±0,17	0,90±0,13	0,83
Rádio ultradistal	37/37	0,44±0,10	0,42±0,09	0,38
1/3 distal de rádio	37/37	0,55±0,11	0,65±0,10	<0,01*
Rádio distal total	37/37	0,50±0,11	0,54±0,09	0,19

Valores expressos em média±DP ou mediana [mínimo;máximo]; *p <0,05 foi considerado estatisticamente significante.

Tabela 6 – DMOa obtida por DXA: comparação entre pacientes com XLHR estratificados por faixa etária e controles saudáveis

Sítios	Crianças				Adultos			
	XLHR (n)/ Controles (n)	DMOa (g/cm ²) XLHR	DMOa (g/cm ²) Controles	p	XLHR (n)/ Controles (n)	DMOa (g/cm ²) XLHR	DMOa (g/cm ²) Controles	p
L1-L4	13/13	0,89±0,20	0,77±0,18	0,14	25/25	1,29 [0,76;1,96]	1,03 [0,82;1,69]	<0,01*
Colo de fêmur	11/11	0,72±0,12	0,73±0,11	0,74	22/22	0,83±0,20	0,85±0,11	0,63
Fêmur total	11/11	0,84±0,14	0,79±0,12	0,36	22/22	0,94±0,18	0,96±0,09	0,74
Rádio UD	12/12	0,38±0,08	0,33±0,07	0,14	25/25	0,46±0,10	0,46±0,06	0,81
1/3 distal de rádio	12/12	0,44±0,07	0,57±0,10	<0,01*	25/25	0,62 [0,33;0,82]	0,67 [0,55;0,86]	<0,01*
Rádio distal total	12/12	0,41±0,07	0,45±0,09	0,27	25/25	0,46±0,10	0,46±0,06	0,81
Corpo inteiro subtotal	12/12	0,73±0,12	0,78±0,14	0,39	-	-	-	-

Valores expressos em média±DP ou mediana [mínimo;máximo]; *p <0,05 foi considerado estatisticamente significante.

Tabela 7 – Parâmetros geométricos, DMOv e dados de microarquitetura óssea de rádio e tíbia distais obtidos por HR-pQCT: comparação entre pacientes com XLHR e controles saudáveis

Parâmetros	XLHR	Controles	p
Rádio distal	n=38	n=38	
Área óssea total (mm ²)	293,4 [116,4;741,5]	281,3 [102,4;415,7]	0,22
Perímetro médio (mm)	72,8±13,9	71,4±10,7	0,63
Tb.area (mm ²)	250,6 [83,4;661,4]	233,1 [82,2;356,6]	0,20
Ct.area (mm ²)	46,8±25,1	43,6±22,8	0,55
Total vBMD (mg HA/cm ³)	297,3±89,5	299,6±65,8	0,89
Tb vBMD (mg HA/cm ³)	186,1±67,5	174,2±24,6	0,31
Ct vBMD (mg HA/cm ³)	840,1 [401,7;1004,8]	850,0 [406,7;977,6]	0,65
BV/TV	0,15±0,05	0,14±0,02	0,31
Tb.N (mm ⁻¹)	1,90±0,51	2,13±0,26	0,01*
Tb.Th (mm)	0,07 [0,03;0,14]	0,06 [0,05;0,10]	<0,01*
Tb.Sp (mm)	0,42 [0,26;0,97]	0,40 [0,29;0,51]	0,24
SD.1/Tb.N (mm)	0,21 [0,09;0,68]	0,16 [0,09;0,23]	0,02*
Ct.Th (mm)	0,62±0,32	0,60±0,30	0,70
Tíbia distal	n=34	n=34	
Área óssea total (mm ²)	630,7±170,5	685,5±184,3	0,27
Perímetro médio (mm)	98,5±13,7	101,8±13,7	0,33
Tb.area (mm ²)	524,6±168,9	566±169,5	0,32
Ct.area (mm ²)	103,7±33,4	115,6±38,2	0,18
Total vBMD (mg HA/cm ³)	261,4±78,9	297,4±43,2	0,02*
Tb vBMD (mg HA/cm ³)	126,9±49,9	174,3±26,3	<0,01*
Ct vBMD (mg HA/cm ³)	869,6 [649,6;1035,4]	895,7 [548,4;977]	0,27
BV/TV	0,10±0,04	0,14±0,02	<0,01*
Tb.N (mm ⁻¹)	1,31±0,50	1,86±0,39	<0,01*
Tb.Th (mm)	0,08 [0,04;0,12]	0,08 [0,06;0,11]	0,52
Tb.Sp (mm)	0,63 [0,33;1,94]	0,44 [0,30;0,74]	<0,01*
SD.1/Tb.N (mm)	0,34 [0,13;1,99]	0,20 [0,11;0,43]	<0,01*
Ct.Th (mm)	1,06±0,33	1,09±0,34	0,77

Valores expressos em média±DP ou mediana [mínimo;máximo];*p <0,05 foi considerado estatisticamente significante.

Tabela 8 – Parâmetros geométricos, DMOv e dados de microarquitetura óssea de rádio e tíbia distais obtidos por HR-pQCT: comparação entre pacientes com XLHR estratificados por faixa etária e controles saudáveis

Parâmetros	Crianças XLHR	Controles	<i>p</i>	Adultos XLHR	Controles	<i>p</i>
	(n=13)	(n=13)		(n=25)	(n=25)	
Rádio distal						
Área óssea total (mm ²)	272,7±130,8	248,5±80,3	0,59	326 [192,8;741,5]	297,6 [202,9;415,7]	0,21
Perímetro médio (mm)	66,9±17,1	64,9±11,1	0,74	75,6±11,4	74,5±9,1	0,71
Tb.area (mm ²)	234,5±124,6	213,8±73,0	0,62	274,6 [125,8;661,4]	239,7 [140,2;356,6]	0,12
Ct.area (mm ²)	12,5 [1,7;57,7]	15,1 [3,1;45,1]	1	59,1±17	55,1±15,7	0,39
Total vBMD (mg HA/cm ³)	282,8±61,1	248,1±47,7	0,12	304,8±101,5	326,3±57,9	0,36
Tb vBMD (mg HA/cm ³)	218,1±48,6	172,3±30,2	<0,01*	169,4±70,8	175,2±21,7	0,70
Ct vBMD (mg HA/cm ³)	600,2±166,5	632,2±160,9	0,62	870,8 [678,5;1004,8]	885,1 [631,7;977,6]	0,52
BV/TV	0,18±0,04	0,14±0,02	<0,01*	0,14±0,59	0,14±0,01	0,70
Tb.N (mm ⁻¹)	2,32±0,32	2,24±0,30	0,49	1,68±0,45	2,08±0,22	<0,01*
Tb.Th (mm)	0,07±0,01	0,06±0,01	<0,01*	0,08 [0,03;0,14]	0,06 [0,05;0,10]	0,02*
Tb.Sp (mm)	0,36±0,07	0,38±0,06	0,28	0,55±0,18	0,41±0,04	<0,01*
SD.1/Tb.N (mm)	0,13 [0,09;0,25]	0,14 [0,09;0,19]	0,65	0,24 [0,12;0,68]	0,16 [0,12;0,23]	<0,01*
Ct.Th (mm)	0,34±0,28	0,33±0,26	0,95	0,77±0,23	0,73±0,23	0,56
Tíbia distal						
Área óssea total (mm ²)	622±160,8	626,2±197,2	0,96	634,7±178,8	715,2±174,5	0,13
Perímetro médio (mm)	97,6±13,7	96,5±15,0	0,85	98,9±13,9	104,4±12,5	0,17
Tb.area (mm ²)	538,3 [283;750,4]	500,6 [307,3;1031,1]	0,65	522,2±180,4	581±158,4	0,25
Ct.area (mm ²)	83,4±28,7	82,4±25,5	0,92	113,8±31,4	132,2±32,3	0,06
Total vBMD (mg HA/cm ³)	250,7±47,7	273,1±32,7	0,19	267,2±92,2	310,7±43	<0,01*
Tb vBMD (mg HA/cm ³)	155,1±29,0	184,5±18,8	<0,01*	117 [32,1;236,4]	161,9 [131;246,9]	<0,01*
Ct vBMD (mg HA/cm ³)	761,0±87	780,0±108,3	0,64	895±61,6	906,5±47,3	0,49
BV/TV	0,12±0,02	0,15±0,01	<0,01*	0,09±0,04	0,14±0,02	<0,01*
Tb.N (mm ⁻¹)	1,67±0,39	2,02±0,39	0,04*	1,11±0,45	1,78±0,37	<0,01*
Tb.Th (mm)	0,07±0,01	0,07±0,01	0,83	0,08 [0,04;0,12]	0,07 [0,06;0,11]	0,60
Tb.Sp (mm)	0,55±0,15	0,43±0,09	0,03*	0,89 [0,38;1,94]	0,48 [0,31;0,74]	<0,01*
SD.1/Tb.N (mm)	0,26 [0,13;0,57]	0,18 [0,11;0,27]	0,01*	0,49 [0,17;1,99]	0,22 [0,13;0,43]	<0,01*
Ct.Th (mm)	0,860,43±0,090,27	0,800,43±0,090,29	0,62	1,17±0,32	1,24±0,26	0,44

Valores expressos em média±DP ou mediana [mínimo;máximo];**p* <0,05 foi considerado estatisticamente significante.

Tabela 9 – Parâmetros geométricos, DMOv e dados microarquitetura óssea de rádio e tíbia distais obtidos por HR-pQCT: comparação entre pacientes com XLHR estratificados por *status* metabólico e controles saudáveis

Parâmetros	XLHR não compensados	Controles	<i>p</i>	XLHR compensados	Controles	<i>p</i>
Rádio distal	(n=8)	(n=8)		(n=17)	(n=17)	
Área óssea total (mm ²)	375,6 [218,6;741,5]	275,5 [208,7;376,8]	0,23	334,3±96,2	304,2±70,0	0,3
Perímetro médio (mm)	77,8±13,5	71,5±7,56	0,26	74,6±10,6	75,9±9,74	0,7
Tb.area (mm ²)	287,8 [153,6;661,4]	217,7 [151,8;300,3]	0,13	272,7±92,1	242,5±66,3	0,28
Ct.area (mm ²)	60,8±20,2	56,4±16,6	0,64	53,6 [35,8;107,6]	55 [20,8;88,5]	0,7
Total vBMD (mg HA/cm ³)	287,1±116,5	337,1±47,8	0,28	313,1±96,4	321,3±62,8	0,77
Tb vBMD (mg HA/cm ³)	157,5±75,1	179,3±14,3	0,44	175,1±70,3	173,2±24,6	0,91
Ct vBMD (mg HA/cm ³)	834,6±88,6	895±68,8	0,15	880,8 [805,5;1004,8]	870,3 [631,7;977,6]	0,83
BV/TV	0,13±0,06	0,14±0,01	0,44	0,14±0,05	0,14±0,02	0,91
Tb.N (mm ⁻¹)	1,62±0,49	2,2±0,17	0,01*	1,71±0,44	2,03±0,22	0,01*
Tb.Th (mm)	0,07±0,02	0,06±0,01	0,33	0,08 [0,05;0,14]	0,07 [0,05;0,1]	0,07
Tb.Sp (mm)	0,58±0,21	0,38±0,03	0,02*	0,54±0,17	0,42±0,05	0,02*
SD.1/Tb.N (mm)	0,31±0,16	0,15±0,01	0,01*	0,24 [0,12;0,68]	0,17 [0,13;0,23]	0,01*
Ct.Th (mm)	0,74±0,27	0,78±0,19	0,72	0,79±0,22	0,71±0,24	0,35
Tíbia distal	(n=6)	(n=6)		(n=16)	(n=16)	
Área óssea total (mm ²)	516,5±150,6	697,8±203,9	0,11	679,0±171,8	721,7±169,1	0,48
Perímetro médio (mm)	91,5±13	102,5±14,1	0,19	102,1 [66,5;117,1]	104,0[86,9;130,1]	0,78
Tb.area (mm ²)	406,7±152,2	564,5±181,0	0,13	565,6±174,7	587,2±155,1	0,71
Ct.area (mm ²)	103,3±48,8	131,0±35,5	0,28	114,5 [79,0;185,3]	125,1 [91,5;205,3]	0,18
Total vBMD (mg HA/cm ³)	244,9±113,6	327,7±40,6	0,14	275,6±85,6	304,3±43,3	0,24
Tb vBMD (mg HA/cm ³)	74,2±35,8	183,4±35,5	<0,01*	125,5±51,8	163,3±24,6	0,01*
Ct vBMD (mg HA/cm ³)	840,5±59,3	916,3±33,8	0,02*	915,4±50,1	902,9±52,0	0,49
BV/TV	0,06±0,02	0,15±0,02	<0,01*	0,10±0,04	0,13±0,02	0,01*
Tb.N (mm ⁻¹)	0,62 [0,50;1,49]	2,01 [1,66;2,49]	<0,01*	1,21±0,43	1,68±0,36	<0,01*
Tb.Th (mm)	0,07±0,01	0,07±0,01	0,77	0,08±0,02	0,08±0,01	0,55
Tb.Sp (mm)	1,31±0,54	0,42±0,07	0,01*	0,76 [0,38;1,94]	0,55 [0,35;0,74]	<0,01*
SD.1/Tb.N (mm)	1,02±0,61	0,19±0,04	0,02*	0,42 [0,17;1,99]	0,26 [0,14;0,43]	<0,01*
Ct.Th (mm)	1,18±0,47	1,26±0,26	0,7	1,17±0,26	1,24±0,27	0,51

Valores expressos em média±DP ou mediana [mínimo;máximo];**p* <0,05 foi considerado estatisticamente significante.

8. REFERÊNCIAS

1. Carpenter TO. Primary disorders of phosphate metabolism. 2010.
2. Tiosano D, Hochberg Z. Hypophosphatemia: the common denominator of all rickets. *Journal of bone and mineral metabolism* 2009;27(4):392-401.
3. Bergwitz C, Juppner H. Regulation of phosphate homeostasis by PTH, vitamin D, and FGF23. *Annual review of medicine* 2010;61:91-104.
4. Yu X, White KE. FGF23 and disorders of phosphate homeostasis. *Cytokine & growth factor reviews* 2005 Apr;16(2):221-32.
5. Weber TJ, Liu S, Indridason OS, Quarles LD. Serum FGF23 levels in normal and disordered phosphorus homeostasis. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2003 Jul;18(7):1227-34.
6. Bielez B, Klaushofer K, Oberbauer R. Renal phosphate loss in hereditary and acquired disorders of bone mineralization. *Bone* 2004 Dec;35(6):1229-39.
7. Pettifor JM. What's new in hypophosphataemic rickets? *European journal of pediatrics* 2008 May;167(5):493-9.
8. Quarles LD. Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *The Journal of clinical investigation* 2008 Dec;118(12):3820-8.
9. David V, Martin A, Hedge AM, Drezner MK, Rowe PS. ASARM peptides: PHEX-dependent and -independent regulation of serum phosphate. *American journal of physiology Renal physiology* 2011 Mar;300(3):F783-91.
10. Kiela PR, Ghishan FK. Recent advances in the renal-skeletal-gut axis that controls phosphate homeostasis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2009 Jan;89(1):7-14.

11. Foster BL, Nociti FH, Jr., Somerman MJ. The rachitic tooth. *Endocr Rev* 2014 Feb;35(1):1-34.
12. Beck-Nielsen SS, Brusgaard K, Rasmussen LM, Brixen K, Brock-Jacobsen B, Poulsen MR, et al. Phenotype presentation of hypophosphatemic rickets in adults. *Calcified tissue international* 2010 Aug;87(2):108-19.
13. Carpenter TO, Imel EA, Holm IA, Jan de Beur SM, Insogna KL. A clinician's guide to X-linked hypophosphatemia. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2011 Jul;26(7):1381-8.
14. Ivanova E, De Leo MG, De Matteis MA, Levtchenko E. Cystinosis: clinical presentation, pathogenesis and treatment. *Pediatric endocrinology reviews: PER* 2014 Sep;12 Suppl 1:176-84.
15. Leaf DE, Pereira RC, Bazari H, Juppner H. Oncogenic osteomalacia due to FGF23-expressing colon adenocarcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2013 Mar;98(3):887-91.
16. Imel EA, Zhang X, Ruppe MD, Weber TJ, Klausner MA, Ito T, et al. Prolonged correction of serum phosphorus in adults with X-linked hypophosphatemia using monthly doses of KRN23. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2015 Apr 28;jc20151551.
17. Carpenter TO, Imel EA, Ruppe MD, Weber TJ, Klausner MA, Wooddell MM, et al. Randomized trial of the anti-FGF23 antibody KRN23 in X-linked hypophosphatemia. *The Journal of clinical investigation* 2014 Apr;124(4):1587-97.
18. Econs MJ, McEnery PT. Autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia: clinical characterization of a novel renal phosphate-wasting disorder. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1997 Feb;82(2):674-81.
19. Consortium A. Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nature genetics* 2000 Nov;26(3):345-8.

20. Gribaa M, Younes M, Bouyacoub Y, Korbaa W, Ben Charfeddine I, Touzi M, et al. An autosomal dominant hypophosphatemic rickets phenotype in a Tunisian family caused by a new FGF23 missense mutation. *Journal of bone and mineral metabolism* 2010;28(1):111-5.
21. White KE, Carn G, Lorenz-Depiereux B, Benet-Pages A, Strom TM, Econs MJ. Autosomal-dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) mutations stabilize FGF-23. *Kidney international* 2001 Dec;60(6):2079-86.
22. Imel EA, Hui SL, Econs MJ. FGF23 concentrations vary with disease status in autosomal dominant hypophosphatemic rickets. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2007 Apr;22(4):520-6.
23. Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, et al. Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nature genetics* 2006 Nov;38(11):1310-5.
24. Lorenz-Depiereux B, Bastepe M, Benet-Pages A, Amyere M, Wagenstaller J, Muller-Barth U, et al. DMP1 mutations in autosomal recessive hypophosphatemia implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis. *Nature genetics* 2006 Nov;38(11):1248-50.
25. Makitie O, Pereira RC, Kaitila I, Turan S, Bastepe M, Laine T, et al. Long-term clinical outcome and carrier phenotype in autosomal recessive hypophosphatemia caused by a novel DMP1 mutation. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2010 Oct;25(10):2165-74.
26. Turan S, Aydin C, Bereket A, Akcay T, Guran T, Yaralioglu BA, et al. Identification of a novel dentin matrix protein-1 (DMP-1) mutation and dental anomalies in a kindred with autosomal recessive hypophosphatemia. *Bone* 2010 Feb;46(2):402-9.
27. Razali NN, Hwu TT, Thilakavathy K. Phosphate homeostasis and genetic mutations of familial hypophosphatemic rickets. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism: JPEM* 2015 Apr 18.

28. Brachet C, Mansbach AL, Clerckx A, Deltenre P, Heinrichs C. Hearing loss is part of the clinical picture of ENPP1 loss of function mutation. *Hormone research in paediatrics* 2014;81(1):63-6.
29. Levy-Litan V, HersHKovitz E, Avizov L, Leventhal N, Bercovich D, Chalifa-Caspi V, et al. Autosomal-recessive hypophosphatemic rickets is associated with an inactivation mutation in the ENPP1 gene. *American journal of human genetics* 2010 Feb 12;86(2):273-8.
30. Steichen-Gersdorf E, Lorenz-Depiereux B, Strom TM, Shaw NJ. Early onset hearing loss in autosomal recessive hypophosphatemic rickets caused by loss of function mutation in ENPP1. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism: JPEM* 2015 Mar 4.
31. Stagi S, Cavalli L, Iurato C, Seminara S, Brandi ML, de Martino M. Bone health in children and adolescents: the available imaging techniques. *Clinical cases in mineral and bone metabolism: the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases* 2013 Sep;10(3):166-71.
32. Lian JB. Biology of bone mineralization. *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes* 2006;13:1–9.
33. Cheung AM, Adachi JD, Hanley DA, Kendler DL, Davison KS, Josse R, et al. High-resolution peripheral quantitative computed tomography for the assessment of bone strength and structure: a review by the Canadian Bone Strength Working Group. *Current osteoporosis reports* 2013 Jun;11(2):136-46.
34. Cohen A, Dempster DW, Muller R, Guo XE, Nickolas TL, Liu XS, et al. Assessment of trabecular and cortical architecture and mechanical competence of bone by high-resolution peripheral computed tomography: comparison with transiliac bone biopsy. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2010 Feb;21(2):263-73.

35. Boyce AM, Shawker TH, Hill SC, Choyke PL, Hill MC, James R, et al. Ultrasound is superior to computed tomography for assessment of medullary nephrocalcinosis in hypoparathyroidism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2013 Mar;98(3):989-94.
36. Hoppe B, Kemper MJ. Diagnostic examination of the child with urolithiasis or nephrocalcinosis. *Pediatric nephrology* 2010 Mar;25(3):403-13.
37. Piccoli GB, De Pascale A, Randone O, Vigotti FN, Priola AM, Naretto C, et al. Revisiting nephrocalcinosis: A single-center perspective. *Nephrology* 2015 Jun 8.
38. Stamatelou KK, Francis ME, Jones CA, Nyberg LM, Curhan GC. Time trends in reported prevalence of kidney stones in the United States: 1976-1994. *Kidney international* 2003 May;63(5):1817-23.
39. Park S, Pearle MS. Pathophysiology and management of calcium stones. *The Urologic clinics of North America* 2007 Aug;34(3):323-34.
40. Trapote RA, Garagorri MAU, Arrieta MU, Monge TM, Lizarraga DA. Evaluacion de la enfermedad renal litiasica. Estudio metabólico. *An Pediatr (Barc)* 2004;61(5):418-27.
41. Patzer L, van't Hoff W, Shah V, Hallson P, Kasidas GP, Samuell C, et al. Urinary supersaturation of calcium oxalate and phosphate in patients with X-linked hypophosphatemic rickets and in healthy schoolchildren. *The Journal of pediatrics* 1999 Nov;135(5):611-7.
42. Ronnefarth G, Misselwitz J. Nephrocalcinosis in children: a retrospective survey. Members of the Arbeitsgemeinschaft fur padiatrische Nephrologie. *Pediatric nephrology* 2000 Sep;14(10-11):1016-21.
43. Cheidde L, Ajzen SA, Tamer Langen CH, Christophalo D, Heilberg IP. A critical appraisal of the radiological evaluation of nephrocalcinosis. *Nephron Clinical practice* 2007;106(3):c119-24.
44. Stechman MJ, Loh NY, Thakker RV. Genetic causes of hypercalciuric nephrolithiasis. *Pediatric nephrology* 2009 Dec;24(12):2321-32.

45. Mantan M, Bagga A, Viridi VS, Menon S, Hari P. Etiology of nephrocalcinosis in northern Indian children. *Pediatric nephrology* 2007 Jun;22(6):829-33.
46. Copelovitch L. Urolithiasis in children: medical approach. *Pediatric clinics of North America* 2012 Aug;59(4):881-96.
47. Sakhaee K, Maalouf NM, Sinnott B. Clinical review. Kidney stones 2012: pathogenesis, diagnosis, and management. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2012 Jun;97(6):1847-60.
48. Rendina D, Mossetti G, De Filippo G, Cioffi M, Strazzullo P. Fibroblast growth factor 23 is increased in calcium nephrolithiasis with hypophosphatemia and renal phosphate leak. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2006 Mar;91(3):959-63.
49. Prie D, Friedlander G. Genetic disorders of renal phosphate transport. *The New England journal of medicine* 2010 Jun 24;362(25):2399-409.
50. Cramer B, Husa L, Pushpanathan C. Nephrocalcinosis in rabbits--correlation of ultrasound, computed tomography, pathology and renal function. *Pediatr Radiol* 1998 Jan;28(1):9-13.
51. Gerver WJ BR. Paediatric morphometrics - a reference manual. 2nd edition ed: Universitaire Pers Maastricht, Maastricht; 2001.
52. Malaquias AC, Scalco RC, Fontenele EG, Costalonga EF, Baldin AD, Braz AF, et al. The sitting height/height ratio for age in healthy and short individuals and its potential role in selecting short children for SHOX analysis. *Hormone research in paediatrics* 2013;80(6):449-56.
53. Imel EA, Peacock M, Pitukcheewanont P, Heller HJ, Ward LM, Shulman D, et al. Sensitivity of fibroblast growth factor 23 measurements in tumor-induced osteomalacia. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. [Research Support, N.I.H., Extramural]. 2006 Jun;91(6):2055-61.

54. National Kidney F. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation* 2002 Feb;39(2 Suppl 1):S1-266.
55. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research* 1988 Feb 11;16(3):1215.
56. Knollmann F, Coakley F, editors. *Multislice CT: Principles and Protocols*. First edition ed: Hardcover; 2005.
57. Gaucher C, Walrant-Debray O, Nguyen TM, Esterle L, Garabedian M, Jehan F. PHEX analysis in 118 pedigrees reveals new genetic clues in hypophosphatemic rickets. *Human genetics* 2009 May;125(4):401-11.
58. Veilleux LN, Cheung MS, Glorieux FH, Rauch F. The muscle-bone relationship in X-linked hypophosphatemic rickets. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2013 May;98(5):E990-5.
59. Reusz GS, Hoyer PF, Lucas M, Krohn HP, Ehrich JH, Brodehl J. X linked hypophosphataemia: treatment, height gain, and nephrocalcinosis. *Archives of disease in childhood* 1990 Oct;65(10):1125-8.
60. Makitie O, Doria A, Kooh SW, Cole WG, Daneman A, Sochett E. Early treatment improves growth and biochemical and radiographic outcome in X-linked hypophosphatemic rickets. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2003 Aug;88(8):3591-7.
61. Vaisbich MH, Koch VH. Hypophosphatemic rickets: results of a long-term follow-up. *Pediatric nephrology* 2006 Feb;21(2):230-4.
62. Cho HY, Lee BH, Kang JH, Ha IS, Cheong HI, Choi Y. A clinical and molecular genetic study of hypophosphatemic rickets in children. *Pediatric research* 2005 Aug;58(2):329-33.
63. Verge CF, Lam A, Simpson JM, Cowell CT, Howard NJ, Silink M. Effects of therapy in X-linked hypophosphatemic rickets. *The New England journal of medicine* 1991 Dec 26;325(26):1843-8.

64. Zivicnjak M, Schnabel D, Billing H, Staude H, Filler G, Querfeld U, et al. Age-related stature and linear body segments in children with X-linked hypophosphatemic rickets. *Pediatric nephrology* 2011 Feb;26(2):223-31.
65. Beck-Nielsen SS, Brixen K, Gram J, Molgaard C. High bone mineral apparent density in children with X-linked hypophosphatemia. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2013 Aug;24(8):2215-21.
66. Ruppe MD, Brosnan PG, Au KS, Tran PX, Dominguez BW, Northrup H. Mutational analysis of PHEX, FGF23 and DMP1 in a cohort of patients with hypophosphatemic rickets. *Clinical endocrinology* 2011 Mar;74(3):312-8.
67. Rowe PS, Oudet CL, Francis F, Sinding C, Pannetier S, Econs MJ, et al. Distribution of mutations in the PEX gene in families with X-linked hypophosphatemic rickets (HYP). *Human molecular genetics* 1997 Apr;6(4):539-49.
68. Francis F, Strom TM, Hennig S, Boddreich A, Lorenz B, Brandau O, et al. Genomic organization of the human PEX gene mutated in X-linked dominant hypophosphatemic rickets. *Genome research* 1997 Jun;7(6):573-85.
69. Kinoshita Y, Saito T, Shimizu Y, Hori M, Taguchi M, Igarashi T, et al. Mutational analysis of patients with FGF23-related hypophosphatemic rickets. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 2012 Aug;167(2):165-72.
70. Beck-Nielsen SS, Brixen K, Gram J, Brusgaard K. Mutational analysis of PHEX, FGF23, DMP1, SLC34A3 and CLCN5 in patients with hypophosphatemic rickets. *Journal of human genetics* 2012 Jul;57(7):453-8.
71. Bastepe M, Juppner H. Inherited hypophosphatemic disorders in children and the evolving mechanisms of phosphate regulation. *Rev Endocr Metab Disord* 2008 Jun;9(2):171-80.

72. Rauch F. Material matters: a mechanostat-based perspective on bone development in osteogenesis imperfecta and hypophosphatemic rickets. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 2006 Apr-Jun;6(2):142-6.
73. Shore RM, Langman CB, Poznanski AK. Lumbar and radial bone mineral density in children and adolescents with X-linked hypophosphatemia: evaluation with dual X-ray absorptiometry. *Skeletal radiology* 2000 Feb;29(2):90-3.
74. Baroncelli GI, Bertelloni S, Ceccarelli C, Saggese G. Effect of growth hormone treatment on final height, phosphate metabolism, and bone mineral density in children with X-linked hypophosphatemic rickets. *The Journal of pediatrics* 2001 Feb;138(2):236-43.
75. Oliveri MB, Cassinelli H, Bergada C, Mautalen CA. Bone mineral density of the spine and radius shaft in children with X-linked hypophosphatemic rickets (XLH). *Bone and mineral* 1991 Feb;12(2):91-100.
76. Baroncelli GI, Federico G, Bertelloni S, Sodini F, De Terlizzi F, Cadossi R, et al. Assessment of bone quality by quantitative ultrasound of proximal phalanges of the hand and fracture rate in children and adolescents with bone and mineral disorders. *Pediatric research* 2003 Jul;54(1):125-36.
77. Shanbhogue VV, Hansen S, Folkestad L, Brixen K, Beck-Nielsen SS. Bone Geometry, Volumetric Density, Microarchitecture and Estimated Bone Strength Assessed by HR-pQCT in Adult Patients with Hypophosphatemic Rickets. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2014 Jul 10.
78. Reid IR, Murphy WA, Hardy DC, Teitelbaum SL, Bergfeld MA, Whyte MP. X-linked hypophosphatemia: skeletal mass in adults assessed by histomorphometry, computed tomography, and absorptiometry. *The American journal of medicine* 1991 Jan;90(1):63-9.

79. Cheung M, Roschger P, Klaushofer K, Veilleux LN, Roughley P, Glorieux FH, et al. Cortical and trabecular bone density in X-linked hypophosphatemic rickets. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2013 May;98(5):E954-61.
80. Li H, Martin A, David V, Quarles LD. Compound deletion of Fgfr3 and Fgfr4 partially rescues the Hyp mouse phenotype. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 2011 Mar;300(3):E508-17.
81. Kooh SW, Binet A, Daneman A. Nephrocalcinosis in X-linked hypophosphatemic rickets: its relationship to treatment, kidney function, and growth. *Clinical and investigative medicine Medecine clinique et experimentale* 1994 Apr;17(2):123-30.
82. Colagrande S, Origgi D, Zatelli G, Giovagnoni A, Salerno S. CT exposure in adult and paediatric patients: a review of the mechanisms of damage, relative dose and consequent possible risks. *La Radiologia medica* 2014 Oct;119(10):803-10.
83. Taylor A, Sherman NH, Norman ME. Nephrocalcinosis in X-linked hypophosphatemia: effect of treatment versus disease. *Pediatric nephrology* 1995 Apr;9(2):173-5.
84. Sikora P, Roth B, Kribs A, Michalk DV, Hesse A, Hoppe B. Hypocitraturia is one of the major risk factors for nephrocalcinosis in very low birth weight (VLBW) infants. *Kidney international* 2003 Jun;63(6):2194-9.
85. Cramer B, Husa L, Pushpanathan C. Pattern and permanence of phosphate-induced nephrocalcinosis in rabbits. *Pediatr Radiol* 1998 Jan;28(1):14-9.
86. Starup-Linde J, Waldhauer E, Rolighed L, Mosekilde L, Vestergaard P. Renal stones and calcifications in patients with primary hyperparathyroidism: associations with biochemical variables. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 2012 Jun;166(6):1093-100.