Rodrigo Bueno de Oliveira

Impacto do uso dos quelantes do fósforo, acetato de cálcio e hidrocloreto de sevelamer, sobre os níveis séricos de paratormônio e FGF-23 de pacientes portadores de doença renal crônica

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

Programa de Nefrologia
Orientadora: Profª. Drª. Vanda Jorgetti

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Rodrigo Bueno de
Impacto do uso dos quelantes do fósforo, acetato de cálcio e hidrocloreto de sevelamer, sobre os níveis séricos de paratormônio e FGF-23 de pacientes portadores de doença renal crônica / Rodrigo Bueno de Oliveira. -- São Paulo, 2010.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Nefrologia.
Orientadora: Vanda Jorgetti.

Descritores: 1.Fator de crescimento de fibroblasto 23 2.Hormônio paratireóideo 3.Fósforo 4.Insuficiência renal crônica

USP/FM/DBD-288/10

Esta tese é dedicada aos Professores Dr. Jenner Cruz e Dr. Vicente César Massola. O primeiro me mostrou a Nefrologia. O segundo ensinou-me a exercê-la.

Agradecimentos

Aos meus pais, Ricardo e Verali, que não pouparam esforços e cuidados com a minha formação em todos os aspectos. São os meus verdadeiros anjos da guarda. Sempre me deram amor para percorrer todos os caminhos que escolhi, e sem a presença deles na minha vida este caminho não existiria.

A minha Orientadora Rosa Maria Affonso Moysés, por me mostrar com maestria os caminhos da ciência. O convívio com sua pessoa pode me apresentar valores imensuráveis, fortes e perenes, dignos do maior respeito entre os seres humanos. Agradeço por sua paciência com as minhas limitações, corrigindo os meus defeitos e estimulando meu potencial.

A Vanda Jorgetti, por seu exemplo como médica, por nos mostrar a bondade no cuidado com o paciente, o amor à ciência, e por nossa amizade. Certamente, todos que desfrutam do seu convívio podem se aprimorar enquanto seres humanos.

Aos Professores Doutores Aluízio Barbosa de Carvalho, Maria Eugênia Canziani e Lílian Cuppari pelo apoio durante a realização deste trabalho.

Aos meus colegas Ana Ludimila Espada Cancela, Fabiana G. Graciolli, Luciene M. dos Reis, Kátia R. Neves, Rodrigo Azevedo, Luciene Pereira, Guaraciaba Ferrari, Juliana Cunha, Melani C. Ribeiro, Cristiane Villarta, Daniela Guimarães, Andréa O. Magalhães, Carolina L. Neves, Silvia Manfredi, Mariana D. Unger e Claudia Modesto Veludo e Claudia Papaiz. Sem a ajuda de todos eles este trabalho não seria possível.

Aos funcionários da carinhosamente chamada “casinha amarela” da EPM-UNIFESP, em especial a Maria Aparecida e Rodrigo Miranda pela ajuda durante o atendimento aos pacientes.

Ao Luiz Antonio Lucarelli, meu amigo e colega de trabalho que soube compreender e me ajudar nesta tese. Sua compreensão e suporte foram fundamentais.

A Genzyme Indústria Farmacêutica pelo apoio a esta pesquisa, por sua postura ética e profissional durante este processo, permitindo que os trabalhos se desenvolvessem tendo a ciência como único foco. Um agradecimento especial ao Dr. Robert Giberteau e a Soraia Cundari.

Aos pacientes que participaram desta tese, pela confiança na medicina e pelo ato de amor ao próximo demonstrado através da Ciência.

Ao meu Deus, Senhor de todas as coisas no universo, por permitir que eu percorresse caminhos tão nobres e conviver com pessoas tão especiais.

“A ciência tem as raízes amargas, porém os frutos são doces.”

Aristóteles

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. Serviço 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. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1 - Introdução 01

1.1 - FGF-23 e o metabolismo do fósforo 06

1.2 - FGF-23 e estudos clínicos e experimentais 13

2 - Objetivos 18

3 - Pacientes e Métodos 19

3.1 – Pacientes 19

3.2 – Avaliação clínica e laboratorial 21

3.3 – Avaliação nutricional 22

3.4 - Análise estatística 23

4 - Resultados 24

5 - Discussão 31

6 - Conclusões 37

7 - Referências Bibliográficas 38

Artigos publicados

Lista de figuras

Figura 1 20

Desenho do estudo.

Figura 2 22

Freqüência de coleta dos exames laboratoriais.

Figura 3 28

Variações absolutas nos níveis séricos de cálcio (Ca), fósforo (P), fósforo urinário (Pu), fração de excreção de fósforo (FeP), paratormônio (PTHi) e FGF-23, em pacientes tratados com hidrocloreto de sevelamer ou acetato de cálcio durante um período de 6 semanas, seguidos por um período de *washout* de 2 semanas.

Figura 4 29

Porcentagem de variação dos níveis séricos de FGF-23 e paratormônio (PTHi) em pacientes tratados com hidrocloreto de sevelamer ou acetato de cálcio durante um período de 6 semanas.

Lista de Tabelas

Tabela 1 06

Faixas de normalidade para o fósforo sérico de acordo com a faixa etária.

Tabela 2 25

Dados demográficos, clínicos e bioquímicos do início do estudo, divididos por população total e os dois subgrupos: acetato de cálcio e hidrocloreto de sevelamer.

Tabela 3 26

Parâmetros bioquímicos no início, 2ª, 4ª e 6ª semanas e após o período de *washout* em pacientes tratados com acetato de cálcio (N=19).

Tabela 4 27

Parâmetros bioquímicos no início, 2ª, 4ª e 6ª semanas e após o período de *washout* em pacientes tratados com hidrocloreto de sevelamer (N=21).

Oliveira RB. Impacto do uso dos quelantes do fósforo, acetato de cálcio e hidrocloreto de sevelamer, sobre os níveis séricos de paratormônio e FGF-23 de pacientes portadores de doença renal crônica [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 50p.

INTRODUÇÃO: O paratormônio (PTH) e o fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23) aumentam precocemente durante o curso da doença renal crônica (DRC) antes do desenvolvimento de hiperfosfatemia. Este estudo avaliou os efeitos de dois quelantes de fósforo, acetato de cálcio (Ca) e hidrocloreto de sevelamer (SEV), nos níveis de PTH e FGF-23 de pacientes com DRC. MÉTODOS: Quarenta e dois pacientes com DRC estágios III e IV foram randomizados em 2 grupos para receber durante 6 semanas, Ca ou Sev. Após este período os pacientes foram seguidos por mais 2 semanas (*washout*). Analisamos os efeitos destes quelantes sobre os parâmetros do metabolismo ósseo e mineral. RESULTADOS: No início do estudo, os pacientes apresentaram-se com fração de excreção do fósforo, PTH e FGF-23 séricos elevados. Durante o tratamento com quelantes de fósforo houve um declínio progressivo nos níveis de PTH e fósforo urinário, mas sem mudanças nos níveis séricos de cálcio e fósforo. Ocorreu uma mudança significativa nos níveis de FGF-23 no grupo de pacientes tratados com Sev. CONCLUSÕES: Este estudo confirmou os efeitos positivos da prescrição de quelantes de fósforo no controle do PTH, nos estágios III e IV da DRC. Estudos prospectivos e de longo seguimento são necessários para confirmar os efeitos do Sev sobre os níveis de FGF-23 e os benefícios de sua redução sobre parâmetros como mortalidade.

Descritores: Fator de crescimento de fibroblasto 23, hormônio paratireóideo, fósforo e insuficiência renal crônica.

Oliveira RB. Impact of the use of phosphate binders, calcium acetate or sevelamer hydrochloride, on serum parathormone and FGF-23 levels of chronic kidney disease patients [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 50p.

INTRODUCTION: Parathyroid hormone (PTH) and fibroblast growth factor (FGF-23) levels increase early in CKD before the occurrence of hyperphosphatemia. This study evaluated the effect of two phosphate binders, calcium carbonate or sevelamer hydrocloride, on PTH and FGF-23 levels in patients with CKD. METHODS: Forty two patients were randomized in two groups to receive calcium acetate or sevelamer hydrochloride, over a 6-wk period. After that, the patients were followed by more two weeks and effects of phosphate binders on mineral parameters were analyzed. RESULTS: At baseline, patients presented with elevated fractional excretion of phosphate, serum PTH and FGF-23 During treatment with both phosphate binders, there was a progressive decline in serum PTH and urinary phosphate, but no change in serum calcium or serum phosphate. Significant changes were observed for FGF-23 only in sevelamer-treated patients. CONCLUSIONS: This study confirms the positive effects of early prescription of phosphate binders on PTH control. Prospective and long-term studies are necessary to confirm the effects of sevelamer hydrocloride on serum FGF-23 and the benefits of this decrease on outcomes.

Descriptors: Fibroblast growth factor 23, parathyroid hormone, phosphorus and renal insufficiency, chronic.

1 – Introdução

A doença renal crônica (DRC), cuja prevalência é elevada em todo o mundo, é um importante problema de saúde pública. Sua evolução é desfavorável e complicações como doenças cardiovasculares e morte prematura são frequentemente observadas[1]. Nas últimas décadas, inúmeros avanços foram incorporados ao tratamento da DRC, porém, as taxas de mortalidade permanecem elevadas.

Os distúrbios do metabolismo ósseo e mineral são freqüentes nesses pacientes constituindo uma importante causa de mortalidade e morbidade. Esses distúrbios são conhecidos pela sigla DMO-DRC (distúrbios do metabolismo mineral e ósseo da doença renal crônica) e compreendem as alterações laboratoriais, como por exemplo, as variações nos níveis de paratormônio (PTH), cálcio (Ca) e fósforo (P), as doenças ósseas e a calcificação vascular[2].

Nos últimos anos, evidências apontam para uma associação entre DMO-DRC e mortalidade[3]. Comparativamente a outros fatores de risco modificáveis na DRC, aqueles dependentes das alterações do metabolismo mineral e ósseo são superiores à anemia ou a baixa dose de diálise (17,5% contra 11,3% e 5,1%, respectivamente)[4].

Nos pacientes em hemodiálise, níveis séricos elevados de Ca, P e PTH estão associados com aumento do risco relativo de morte por todas as causas, causas cardiovasculares e hospitalizações por fraturas ósseas[4]. Essa mesma associação vem sendo observada nos diversos estágios de DRC[5], e surpreendentemente, em pacientes com função renal normal[6-9].

Evidências sugerem que o PTH pode ser um fator de risco independente para mortalidade cardiovascular. Estudo com mais de 40.000 pacientes em hemodiálise encontrou associação entre mortalidade e níveis de PTH acima de 600 pg/ml[4]. Outro estudo com 958 pacientes, cujo ritmo de filtração glomerular médio era de 62 ± 14 ml/min/1,73 m^2, seguidos por um período médio de 9,7 anos, apontou o PTH como fator preditor de mortalidade por causas cardiovasculares, mesmo quando os níveis de PTH estavam dentro da faixa de referência[6].

Estudos sugerem que o excesso de PTH produza efeitos deletérios sobre o miocárdio induzindo hipertrofia do ventrículo esquerdo[10], fibrose e calcificação vascular[11]. Os mecanismos implicados são: (1) ação do PTH no processo de remodelação vascular, estimulando a expressão de marcadores pró-escleróticos e pró-inflamatórios no endotélio, além do aumento da expressão do fator de crescimento derivado de endotélio vascular[12], (2) a inibição da síntese de osteoprotegerina, um importante fator protetor na calcificação vascular[13], (3) e no controle do oxido nítrico, o que poderia ter implicações nos fenômenos de vasodilatação[14]. Além disso, o PTH pode contribuir para progressão da doença renal pela sua atuação nos podócitos e sobre a permeabilidade glomerular[15].

Especula-se que o controle dos níveis de PTH em estágios precoces da DRC possa ser benéfico reduzindo a mortalidade e a progressão da doença renal. No entanto, ainda não dispomos de estudos que confirmem esta hipótese.

Além das associações observadas em relação ao PTH, estudos apontam para associação entre níveis elevados de Ca e mortalidade. Acreditava-se que a calcificação vascular era um evento passivo, devido à precipitação do Ca e P, no entanto, sabe-se atualmente que é um complexo processo regulado por vários fatores.

Níveis elevados de Ca podem induzir a diferenciação das células do músculo liso dos vasos em células semelhantes aos osteoblastos, com capacidade de mineralização[16]. A sobrecarga de cálcio decorrente do uso de quelantes de fósforo contendo Ca associa-se com deposição deste elemento no tecido cardíaco e vasos, acelerando a calcificação vascular[17]. Estudo realizado em pacientes em hemodiálise mostrou associação entre níveis elevados de Ca e maior mortalidade por causas cardiovasculares, mesmo com níveis de P dentro dos valores de referência[4].

Em relação ao P, diversos estudos mostraram associação entre a carga de P e mortalidade de pacientes com DRC[3-5] e também em pacientes sem DRC, mesmo com níveis de P dentro da faixa de referência[7-9]. Os mecanismos pelos quais o P aumentaria a mortalidade desses pacientes não são totalmente conhecidos. Acredita-se que da mesma forma que o Ca, o P pode promover a transformação fenotípica das células musculares lisas arteriais em células semelhantes a osteoblastos[18-20]. Assim, isoladamente ou em conjunto, níveis elevados de Ca e P acelerariam o processo de calcificação vascular da camada média das artérias.

Entretanto, durante muitos anos acreditou-se que o P não seria um fator deletério nestes pacientes, pois se encontra dentro da faixa de referência durante longo período no curso da DRC[21]. O fato de a hiperfosfatemia ser encontrada principalmente nos estágios avançados da DRC colocou em dúvida a teoria do *trade-off*. Esta teoria descrita há mais de 40 anos, valia-se do fato que a perda da função renal levaria a retenção de P, seguida de hipocalcemia, e conseqüente elevação do PTH sérico. O PTH atuando nos néfrons residuais promoveria fosfatúria e retenção de cálcio, normalizando os níveis séricos dos dois íons, à custa da elevação do PTH[22, 23]. Os críticos desta teoria argumentavam que se a elevação do PTH

antecederia a hiperfosfatemia, não seria possível que este fenômeno fosse desencadeado devido à hiperfosfatemia. Porém, ao longo dos anos diversos estudos clínicos consolidaram a associação entre P e mortalidade, e a teoria do *trade off* provou-se correta.

Estudo com pacientes em hemodiálise demonstrou um aumento de 7% no risco de morte quando o P sérico era superior a 5 mg/dL elevando-se para 25% quando o P era maior que 6 mg/dL[4]. Em outro estudo com 6.730 pacientes com DRC estágio III demonstrou-se um aumento linear significativo da mortalidade associado a um nível de P superior a 3,5 mg/dL, mesmo após ajustes para idade, *clearance* de creatinina, presença de diabete ou insuficiência cardíaca, e cada incremento de 1 mg/dL de P esteve associado a um aumento de 35% no risco de infarto agudo do miocárdio[5].

Achados semelhantes foram observados em estudos na população geral sem DRC[7-9]. O Estudo *The Framingham Offspring* foi o primeiro que avaliou prospectivamente (15 anos de seguimento), demonstrando a associação entre níveis séricos de P, dentro da faixa de referência, e aumento do risco de doenças cardiovasculares. Pacientes com fósforo sérico superior ou igual a 3,5 mg/dL apresentavam um risco de evento cardiovascular 55% maior do que aqueles com valores de P sérico inferior ou igual a 2,8 mg/dL[8]. Uma análise *post hoc* do estudo CARE envolvendo 4127 pacientes com doença coronariana e *clearance* de creatinina maior que 60 ml/min, mostrou que níveis de P maiores ou iguais a 3,5 mg/dL tinham um risco de mortalidade 27% superior a aqueles com P inferior ou igual 3,5 mg/dL[9].

Além da associação entre P e mortalidade, acredita-se que o P é um fator de risco potencial para perda da função renal[24]. Estudo mostrou maior declínio da função renal em ratos com DRC alimentados com dieta rica em P quando

comparados ao grupo de animais alimentados com uma dieta pobre em P[20]. Outro estudo com 448 pacientes com DRC estágios IV e V pré-dialítico mostrou que o nível elevado de P foi um fator de risco independente para o declínio mais rápido da função renal. Este achado permaneceu mesmo após o ajuste para fatores importantes como proteinúria, função renal no início do estudo e pressão arterial[25].

Em que se pese a associação do P com mortalidade e progressão da DRC, parece que a análise isolada do P sérico não avalia adequadamente a carga desse elemento no organismo, especialmente na DRC. Como descrito nos diversos estudos acima[3-9, 24-25], desfechos clínicos negativos estiveram associados ao nível de P, mesmo quando dentro da faixa de referência[7-9], o que limita o uso isolado do P como marcador da sobrecarga deste elemento. Da mesma forma, o PTH também se mostra como um marcador falho. Com a perda da função renal, inúmeros fragmentos desse hormônio vão se acumulando no organismo e suas funções não são totalmente conhecidas, dificultando a interpretação dos fenômenos biológicos ligados a este hormônio. Além disso, os ensaios empregados para quantificar o PTH podem influenciar na interpretação dos efeitos deste hormônio nos diferentes tecidos[26]. Por exemplo, os ensaios de segunda geração, chamados de ensaios para dosagem de PTH intacto, superestimam o grau de hiperparatiroidismo secundário[26].

Dessa forma, não existe um marcador que isoladamente forneça uma avaliação do risco associado ao metabolismo anormal do P, com grau razoável de precisão, especialmente nas fases iniciais da DRC e na população sem DRC.

Recentemente, a identificação do *fibroblast growth factor* 23 (FGF-23), uma fosfatonina que participa da regulação do metabolismo do P, nos auxiliou na compreensão dos distúrbios do metabolismo ósseo e mineral na DRC.

1.1 - FGF-23 e o metabolismo do fósforo

O P desempenha papel importante em vários processos biológicos, tais como sinalização celular, síntese de ácidos nucléicos, geração e transferência de energia, função muscular e mineralização óssea. É importante para o desenvolvimento celular principalmente nas fases de maior crescimento dos seres humanos. Em crianças, a concentração é significativamente mais alta, estabilizando-se na vida adulta e apresentando declínio com o envelhecimento (Tabela 1)[27].

Tabela 1 **–** Faixas de normalidade para o fósforo sérico de acordo com a faixa etária.

Idade		Valores de referência
Recém-nascido		3,7 – 8,1 mg/dl
Crianças		4,5 – 5,5 mg/dl
Adulto		2,7 – 4,5 mg/dl
Acima de 60 anos	Homem	2,3 – 3,7 mg/dl
	Mulher	2,8 – 4,1 mg/dl

Adaptado de Barry C Kress, *in* Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism[27].

Na dieta habitual de um adulto o consumo de P situa-se ao redor de 20 mg/kg, obtido principalmente dos alimentos com alto conteúdo protéico como carnes vermelhas, peixes, frutos do mar, leite e derivados. Aproximadamente 80% do fósforo é absorvida pelo intestino proximal, predominantemente no jejuno, através dos co-transportadores sódio-fósforo (Na-P) tipo IIb localizados na borda apical dos enterócitos. Cerca de 200 mg de P por dia são eliminados através de secreções pancreáticas e intestinais, resultando na absorção de 13 mg/kg/dia (~ 900 mg por

dia). O P absorvido integra-se ao fluido extracelular e diariamente cerca de 200 mg são incorporados e reabsorvidos pelo tecido ósseo em função da remodelação óssea e das necessidades do organismo[28].

O P plasmático é quase que totalmente filtrado pelo glomérulo e entra no fluido tubular com aproximadamente a mesma concentração plasmática. Grande parte do P é reabsorvida pelas células do túbulo proximal, através dos co-transportadores Na-P tipo IIa e IIc localizados na borda apical destas células.

Diversos fatores estão envolvidos na homeostase do P. O PTH e a 1α,25 $(OH)_2D_3$ são os mais estudados. O PTH aumenta a excreção de P urinário e a síntese de 1α,25 $(OH)_2D_3$, que por sua vez, aumenta a eficiência da absorção intestinal de P. Na ausência do PTH a reabsorção de P altera-se, aumentando a concentração de P no túbulo proximal, o que resulta em baixa excreção urinária de P. Na presença do PTH, a reabsorção tubular de P é mínima, resultando em um aumento da sua excreção[29].

Além do PTH e da 1α,25$(OH)_2D_3$ outras substâncias, como as fosfatoninas, começaram a ser conhecidas por participar da regulação do metabolismo do P. As fosfatoninas inibem o transporte de P dependente de Na, levando a fosfatúria, e não são bloqueadas por antagonistas do receptor do PTH, atuando então, de maneira independente do AMP cíclico[30, 31-33]. O termo fosfatonina foi cunhado para descrever um fator circulante, observado em pacientes com osteomalácia induzida por tumor, que levava a inibição da reabsorção renal de P e redução da atividade da 1α hidroxilase, causando redução da produção de 1α,25$(OH)_2D_3$[31]. Ao contrário do PTH, as fosfatoninas não só aumentam a excreção de P urinário como também reduzem a síntese de 1α,25$(OH)_2D_3$, levando a um balanço negativo de P[28].

As primeiras descrições sobre as fosfatoninas datam de 1994[30, 31], em estudos de pacientes com osteomalácia induzida por tumor. Culturas de células tumorais revelaram a presença de um fator termo-sensível de 10 a 30 kDa que inibia o transporte tubular de P dependente de Na, mas não o de outras substâncias, tais como glicose e aminoácidos. O resultado deste fenômeno era o fenótipo bioquímico de hipofosfatemia, aumento da excreção renal de P e baixas concentrações de $1\alpha,25(OH)_2D_3$, consistentes com as alterações observadas em pacientes com raquitismo hipofosfatêmico autossômico dominante e osteomalácia induzida por tumor.

Passaram-se 6 anos até que este fator fosse identificado como sendo um membro da família dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGF). O primeiro membro desta família, FGF-1, foi identificado em 1989[34], isolado de fibroblastos do cérebro e glândula pituitária. Até o ano de 2000, 22 membros dessa família já haviam sido identificados e suas funções, incluíam: angiogênese, mitogênese, diferenciação celular, reparo tecidual e regulação metabólica[35, 36].

Em 2000, investigadores japoneses identificaram através da pesquisa por homologia entre o fator de crescimento de fibroblastos 15 (FGF-15) de um embrião de camundongo e uma base de dados genéticos (*GenBank Nucleotide Sequence Database*), um novo fator na família dos fatores de crescimento de fibroblastos, designado FGF-23. Também através de pesquisa por homologia entre a seqüência de aminoácidos do FGF-23 do camundongo e o DNA humano, foi possível localizar o FGF-23 humano. Nesta ocasião, demonstrou-se que o FGF-23 de camundongos era expresso principalmente no núcleo talâmico ventrolateral do cérebro. Não se sabia

quais eram as funções do FGF-23, mas acreditava-se que era importante para as funções do núcleo talâmico ventrolateral[37].

No mesmo ano, um grupo de investigadores demonstrou que pacientes com raquitismo hipofosfatêmico autossômico dominante possuíam uma mutação do gene que produzia o fator de crescimento de fibroblastos 23, sendo que esta mutação seria a provável causa da hipofosfatemia, aumento da excreção renal de P e das baixas concentrações de $1\alpha,25(OH)_2D_3$[38].

No ano seguinte, obteve a clonagem de seqüências de DNA que eram abundantemente expressas em pacientes com osteomalácia induzida por tumor. Essas seqüências foram comparadas com seqüências disponíveis em uma base de dados genéticos (*GenBank Nucleotide Sequence Database*). Uma seqüência de DNA, longa e bastante freqüente, codificava uma proteína constituída de 251 aminoácidos e peso molecular de 28 kDa que possuía a mesma homologia da família dos fatores de crescimento de fibroblastos, com uma região N-terminal e outra região C-terminal, idêntica ao FGF-23[37, 38]. Desta forma, o FGF-23 foi caracterizado como fator causal da osteomalácia induzida por tumor[39].

Uma das primeiras demonstrações *in vivo* das ações do FGF-23 se deu em camundongos que receberam esse hormônio por via intraperitoneal. Os animais apresentavam redução do P sérico e aumento da excreção renal de P, sem alteração na excreção urinária de aminoácidos ou Ca[39]. Portanto, o FGF-23 parecia atuar especificamente sobre o metabolismo do P. Evidência adicional revelou que camundongos que receberam implante de células tumorais produtoras de FGF-23, derivadas de ovário de *hamsters* chineses, apresentavam retardo do crescimento,

hipofosfatemia, aumento da excreção renal de P e redução dos níveis de $1\alpha,25(OH)_2D_3$, com redução da expressão de 1α hidroxilase[39].

Em 2002 o mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que a mutação do gene do FGF-23 resultava na modificação do sítio da proconvertase (176 *RHTR* 179) em uma região terminal COOH, codificadora do peptídeo. A troca de resíduos de arginina da posição 176 ou 179 eliminava o sítio de clivagem do peptídeo. A presença desta forma mutante de FGF-23 possuía uma meia-vida mais longa, persistindo por mais tempo na circulação, e resultava em hipofosfatemia, aumento da excreção renal de P e baixas concentrações de $1\alpha,25(OH)_2D_3$[40].

Demonstrou-se também que o aumento da excreção de P causado pelo FGF-23 estava ligado a inibição da reabsorção de P Na-dependente (co-transportador Na-P IIa e IIc) [41, 42], através da via da proteína quinase ativada[43].

O papel fisiológico do FGF-23 no metabolismo do P e da $1\alpha,25(OH)_2D_3$ ficou mais claro estudando-se camundongos com ablação do gene do FGF-23. Estes animais tinham retardo do crescimento, morriam com 10 a 14 semanas de vida e tinham níveis elevados de P sérico[44]. De maneira oposta, camundongos transgênicos que apresentavam aumento da expressão de FGF-23 tinham redução do P sérico, aumento da excreção de P urinário e redução dos co-transportadores Na-P[45, 46].

Posteriormente, estudos avaliaram o papel da sobrecarga de P na regulação dos níveis de FGF-23. Estudo *in vitro* com células *osteoblasto-like* demonstrou que a sobrecarga de P estimulava a síntese de FGF-23 por essas células [47]. Estudo com homens jovens saudáveis mostrou que os níveis séricos de FGF-23 são regulados não só pelo nível sérico de P, mas também pela carga de P proveniente da dieta[48]. Neste estudo, as mudanças nos níveis de FGF-23 correlacionaram-se positivamente com a

excreção renal de P e negativamente com os níveis de $1\alpha,25(OH)_2D_3$. O nível de P sérico não se alterou, provavelmente devido ao efeito fosfatúrico do FGF-23.

Baseado nestes resultados, concluiu-se que o FGF-23 possui função distinta dos outros membros da família dos FGF, agindo principalmente como fator fosfatúrico e supressor da atividade da 1α-hidroxilase.

Diversos tecidos expressam o FGF-23, tais como o tecido ósseo, vasos na medula óssea, núcleo talâmico ventrolateral, timo e linfonodos[49]. A contribuição relativa destes tecidos na expressão do FGF-23 não é conhecida, mas os altos níveis de expressão pelos osteócitos sugerem que o tecido ósseo é a principal fonte de FGF-23[50].

Para que o FGF-23 exerça seu efeito fosfatúrico e redução dos níveis de $1\alpha,25(OH)_2D_3$ é necessário que se ligue com um dos 4 receptores da família de receptores dos FGF (FGFR)[50]. Nesta ligação atuam como co-fatores os proteoglicanos heparan-sulfato e a proteína *Klotho*. A proteína *Klotho* é uma proteína de membrana tipo I que contém 1014 aminoácidos e que se expressa principalmente nos túbulos proximais renais, glândula paratireóide, e no plexo coróide do cérebro[51].

Após a ligação do *Klotho* com os FGFR, ocorre uma conversão destes receptores no sentido de aumentar a sua afinidade para a ligação com o FGF-23, em detrimento da ligação com outros membros da família dos FGF. Portanto, a interação do *Klotho* com os FGFR (FGFR1c, 3c, 4c) faz com que exista uma ação renotrópica do FGF-23 para com estes receptores, principalmente expressos no tecido renal. O complexo FGF-23/*Klotho*/FGFR leva a fosforilação da proteína quinase regulada por sinal extracelular (EKR) e a ativação do fator de resposta rápida ao crescimento 1

(Egr-1)[52]. Estes fenômenos reduzem a expressão dos co-transportadores Na-P, desencadeando fosfatúria.

A inativação da proteína *Klotho* está ligada a inúmeros fenômenos de senescência como atrofia do timo, esterilidade, enfisema pulmonar, ataxia, atrofia da pele, perda muscular, osteopenia, entre outros[53]. Dados recentes também apontam para uma relação entre a proteína *Klotho* e o metabolismo mineral, vitamina D, insulina/glicose, estresse oxidativo e calcificações vasculares[54]. Sabe-se que a proteína *Klotho* inibe a sinalização insulina/fator de crescimento derivado da insulina (I/IGF1)[55] e aumenta a resistência ao estresse oxidativo através do aumento da superóxido desmutase, enzima que facilita a remoção de espécies reativas do oxigênio[55]. Na última década, inúmeros trabalhos têm mostrado que o FGF-23, mais especificamente o eixo *Klotho*-FGF-23, está profundamente envolvido nos sistemas regulatórios do metabolismo de P, assumindo um papel central na sua regulação. Paralelamente a este sistema principal, foram descritas outras fosfatoninas, tais como, o FGF-7, a *secreted frizzled related protein-4* (sFRP-4) e a *matrix extracellular phosphoglycoprotein* (MEPE), cujas funções ainda não foram completamente esclarecidas[28].

1.2 - FGF-23 e estudos clínicos e experimentais

Há algum tempo especula-se sobre os mecanismos pelos quais o FGF-23 atuaria no metabolismo do P na DRC. Assim, a hipótese de que a síntese de FGF-23 fosse induzida pela retenção de P é bastante atraente[57].

Diversos estudos mostram correlações entre os níveis de FGF-23 e creatinina, P e PTH séricos em pacientes com DRC não-dialítica[58-61]. Os níveis desse hormônio aumentam conforme a função renal diminui[59]. Mesmo em pacientes com ritmo de filtração glomerular maior do que 80 ml/min, níveis de FGF-23 correlacionam-se negativamente com a $1\alpha,25(OH)_2D_3$ e a reabsorção tubular de P.

Estudo em 80 pacientes com DRC não dialítica revelou que o FGF-23 e o PTH correlacionavam-se inversamente com o ritmo de filtração glomerular, sendo que os níveis de FGF-23 elevaram-se precocemente, independentemente dos níveis de P, da fração de excreção de P e da deficiência de $1\alpha,25(OH)_2D_3$. Além disso, o FGF-23 foi um forte preditor da redução dos níveis de $1\alpha,25(OH)_2D_3$. Os autores concluíram que o aumento do FGF-23 pode contribuir para manter os níveis de P dentro da faixa de referência mesmo em fases avançadas da DRC, mas pode piorar a deficiência de $1\alpha,25(OH)_2D_3$, fenômeno que pode ser o evento central na patogênese do hiperparatiroidismo secundário. Outro resultado interessante é que hiperfosfatemia ocorreu somente em 12% dos pacientes, todos com ritmo de filtração glomerular inferior a 30 ml/min[62].

Estudos clínicos mostraram associação dos níveis elevados de FGF-23 e progressão de DRC[63, 64], desenvolvimento de hiperparatiroidismo secundário grave[65], hipertrofia de ventrículo esquerdo[66] e mortalidade[67].

Recentemente estudo com 177 pacientes não diabéticos, com creatinina variando de 0,9 mg/dl a 4,9 mg/dl, seguidos por um tempo médio de 53 meses, mostrou que o FGF-23 foi um preditor de progressão de doença renal tão importante quanto o ritmo de filtração glomerular[63]. Em outro estudo com 55 pacientes com nefropatia diabética estágio III com macroalbuminúria seguidos por um período médio de 30,7 meses, o nível de FGF-23 também foi um fator preditivo isolado para pior evolução da nefropatia diabética, independente dos níveis de P, Ca, PTH e $25(OH)_2D_3$[64].

A hipótese de que níveis elevados de FGF-23 estão associados com hiperparatiroidismo secundário foi demonstrada em um estudo com 103 pacientes em hemodiálise. Ao final de 2 anos, observou-se que os pacientes que no inicio do estudo tinham níveis elevados de FGF-23, desenvolviam formas mais graves de hiperparatiroidismo secundário, independentemente dos níveis iniciais de PTH[65].

Gutierrez e colaboradores demonstraram que os níveis de FGF-23 foram independentemente associados com o índice de massa do ventrículo esquerdo e hipertrofia do ventrículo esquerdo em um grupo de 162 pacientes com DRC não dialítica[66]. No entanto, mais estudos parecem ser necessários para esclarecer se o aumento do FGF-23 é apenas um marcador de hipertrofia ventricular ou se é deletério para o tecido cardíaco.

Investigadores examinando prospectivamente uma coorte de 10.044 pacientes incidentes em hemodiálise observaram que o aumento dos níveis de FGF-23 no início da diálise associava-se com maior taxa de mortalidade, independente do nível sérico de P e de outros fatores de risco conhecidos. A magnitude do risco de

mortalidade associado ao FGF-23 foi superior quando comparada ao risco atribuído ao P sérico[67].

Além das possíveis relações entre FGF-23, progressão de DRC, hiperparatiroidismo, hipertrofia ventricular e mortalidade, acredita-se que níveis elevados de FGF-23 correlacionam-se com calcificação vascular[68, 69]. Nosso grupo estudou, durante 1 ano, 72 pacientes em hemodiálise e encontrou uma correlação positiva entre os níveis de FGF-23 e o escore de calcificação vascular avaliado por tomografia de coronária, no grupo de pacientes tratado com hidrocloreto de sevelamer[70].

Entretanto, uma questão que permanece sem resposta até o momento é saber qual seria o mecanismo de ação do FGF-23, se seria somente um marcador indireto da toxicidade de outros fatores, como o P, ou se teria efeito tóxico direto no endotélio vascular ou no tecido renal. É possível que níveis persistentemente elevados de FGF-23 propiciem uma ligação de alta afinidade com o receptor de FGF, de maneira independente do co-fator *Klotho*, estimulando a produção de fatores implicados no desenvolvimento de doença vascular. Talvez, o aumento dos níveis de FGF-23 reflita somente à exposição prolongada a dietas com alto conteúdo de P. Além do excesso dos níveis de FGF-23, parece que sua combinação com a deficiência de $1,25(OH)_2D_3$ teria um maior efeito adverso e estaria associada com uma maior mortalidade nos seres humanos[67].

Retornando a teoria do *trade off*, se substituíssemos o termo hiperfosfatemia por retenção de P, essa teoria seria mais plausível do ponto de vista biológico. A evolução dos processos biológicos relacionados as metabolismo do P parece ter criado dois sistemas para evitar o acúmulo de P no organismo, o eixo FGF-23/*Klotho*

e o eixo PTH, sendo este último claramente demonstrado pela teoria do *trade off*. Dessa forma, no decorrer da DRC, os níveis de P seriam mantidos dentro da faixa de referência por longos períodos devido à ação do PTH e do FGF-23. O gatilho para desencadear os dois sistemas e evitar a retenção de P seria a própria carga de P.

Até o momento não se sabe qual marcador dos distúrbios do metabolismo mineral e ósseo seria o melhor para analisar desfechos clínicos, como progressão da DRC e mortalidade. Provavelmente PTH, a vitamina D, o *Klotho* e o FGF-23 são marcadores distintos da sobrecarga de P no organismo, prestando-se, portanto, como marcadores do metabolismo ósseo e mineral.

No caso do FGF-23, uma característica especial poderia favorecer o seu uso como marcador dos DMO-DRC: o fato do mesmo ter as suas concentrações estáveis ao longo do dia nos pacientes com DRC[71, 72], ao contrário do que ocorre com o PTH que varia no período pós-prandial[71] e sofre influencia dos níveis séricos de $25(OH)_2D_3$[73].

Outra questão que até o momento não tem resposta é se os níveis de FGF-23 são modulados por quelantes de P como o acetato de cálcio ou o hidrocloreto de sevelamer. Caso esta estratégica terapêutica se revele factível, provavelmente traria benefícios aos pacientes com DRC, principalmente em estágios mais precoces.

Até o momento, apenas quatro estudos, um em animal e outros três em humanos, mostraram os efeitos de quelantes de fósforo nos níveis séricos de FGF-23. O primeiro estudo mostrou uma redução nos níveis de FGF-23, P e PTH com o uso de hidrocloreto de sevelamer em animais com DRC. Esta redução era revertida com a suspensão da droga[74].

Outro estudo envolvendo 6 pacientes em diálise demonstrou que a suspensão de quelantes de P aumentava os níveis de FGF-23, embora de maneira não significativa[75]. Nosso grupo estudou prospectivamente os efeitos de quelantes de P, acetato de cálcio e hidrocloreto de sevelamer, em pacientes em hemodiálise e observou que houve redução significativa dos níveis de FGF-23 após 1 ano de tratamento, sendo que os pacientes tratados com hidrocloreto de sevelamer tiveram redução mais importante que os tratados com acetato de cálcio[70]. O quarto estudo avaliou os efeitos do carbonato de cálcio associado ao hidrocloreto de sevelamer comparado ao uso isolado de carbonato de cálcio, em 46 pacientes de hemodiálise seguidos por 4 semanas. Os resultados demonstraram redução do P e do FGF-23 somente nos pacientes tratados com a associação de drogas[76].

Considerando-se que o PTH e o FGF-23 têm um papel importante nos DMO-DRC faltam estudos prospectivos que avaliem o efeito de quelantes de P sobre esses hormônios em pacientes nos estágios iniciais da DRC.

2 - Objetivos

Os objetivos desse estudo foram:

Estudar prospectivamente o uso de quelantes de P - acetato de cálcio ou hidrocloreto de sevelamer - nos os níveis séricos de PTH e FGF-23 em pacientes com doença renal crônica estágios III e IV, normofosfatêmicos.

3 - Pacientes e Métodos

3.1 - Pacientes

O estudo incluiu pacientes adultos clinicamente estáveis com DRC em estágios III e IV, provenientes do ambulatório de uremia da Disciplina de Nefrologia da Universidade Federal de São Paulo EPM-UNIFESP. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP (CAPPesq - HC-FMUSP) e registrado no Sistema Nacional de Informação sobre Ética em Pesquisa (SISNEP) sob o número CAAE-0714.0.015.000-07. Todos os pacientes do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Os critérios de inclusão foram: pacientes com DRC estágios III e IV, clinicamente estáveis e com níveis de fósforo dentro da faixa de referência (2,7 – 4,5 mg/dl).

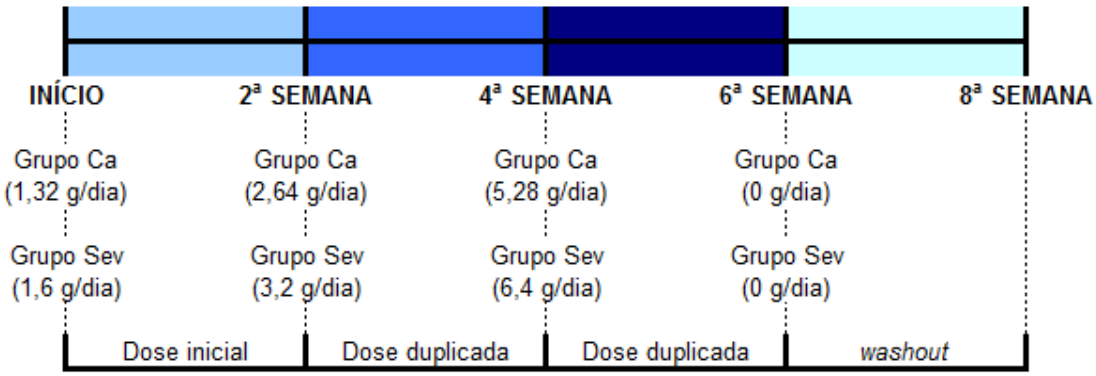
Os critérios de exclusão foram: índice de massa corpórea <17 ou >37 kg/m^2, proteinúria >3,5 g/24 h, diabete melito, PTH intacto >500 pg/ml, ou uso de drogas que interferem no metabolismo mineral.

O estudo foi conduzido por um período de 8 semanas, sendo que durante as 6 primeiras semanas receberam doses crescentes de acetato de cálcio ou hidrocloreto de sevelamer, seguidos por um período de 2 semanas de suspensão dos medicamentos (*washout*).

Quarenta e dois pacientes foram selecionados e randomizados para receber hidrocloreto de sevelamer (Renagel, 800-mg *tablets*; Genzyme Co, Cambridge,

MA, USA) ou acetato de cálcio (PhosLo, 667-mg *tablets*; Fresenius Medical Care, Waltham, MA, USA). A randomização foi gerada por computador em blocos de 4, e o quelante de P que o paciente receberia foi informado aos investigadores em envelope lacrado. Depois da randomização, os pacientes receberam acetato de cálcio na dose inicial de 1,32 g/dia, dobrada a cada 2 semanas (2,64 e 5,28 g/dia) ou hidrocloreto de sevelamer na dose inicial de 1,6 g/dia, também dobrada a cada 2 semanas (3,2 e 6,4 g/dia). Utilizamos o método de contagem de pílulas para avaliar a adesão à medicação. O período de *washout* foi incluído como controle de tratamento, uma vez que não estudamos um grupo controle tratado com placebo. A figura 1 descreve o desenho do estudo.

Figura 1 – Desenho do estudo.



Grupo Ca: acetato de cálcio; **Grupo Sev**: hidrocloreto de sevelamer.

3.2 - Avaliação clínica e laboratorial

Todos os pacientes passaram por consulta médica no início e a cada 2 semanas durante todo o estudo. Nestas consultas eram colhidas amostras de sangue para análise de (figura 2): cálcio total, fósforo, gasometria venosa, fosfatase alcalina, PTH intacto (substrato de quimioluminescência, DPC; Medlab, USA; valores de referência: 10 – 65 pg/ml), FGF-23 intacto (ensaio por método Elisa, Kainos, Japan; valores de referência: 8,2 – 54,3 pg/ml), albumina, 1,25-dihidroxi-vitamina D (radioimmunoensaio, Dia-Sorin™, USA; valores de referência: 15,9 - 55,6 pg/ml), proteína c reativa (PCR) (imunoturbidimétrico, valores de referência: <5,0 mg/L), uréia e creatinina. O *clearance* de creatinina foi calculado pelo método de Cockroft-Gault e corrigido pela superfície corpórea.

No início e após 6 semanas amostras foram colhidas para dosagem de 25-hidroxivitamina D (ensaio quimioluminescente, Dia-Sorin™, USA, valores de referência: >30 ng/ml), fosfatase alcalina óssea (método imunoenzimático, Metra Biosystem Inc., USA; valores de referência 11,6 – 42,7 U/l) e deoxipiridinolina (método imunoenzimático, Quidel Corporation, USA; valores de referência: 3,25 ± 0,66 nmol/l). Amostras de urina foram obtidas para análise da concentração de cálcio e fósforo a cada 2 semanas.

Figura 2 – Freqüência de coleta dos exames laboratoriais.

Sangue	Início	2ª semana	4ª semana	6ª semana	*Washout*
Cálcio total					
Cálcio ionizável					
Fósforo					
Fosfatase alcalina					
Gasometria venosa					
Albumina					
Proteína C reativa					
Uréia					
Creatinina					
Paratormônio					
1,25 Vitamina D					
FGF-23					
25 Vitamina D					
Fosfatase alcalina óssea					
Deoxipiridinolina					
Urina 24h					
Cálcio (u)					
Fósforo (u)					
Proteinúria (u)					

: coleta realizada; : coleta não realizada.

3.3 - Avaliação nutricional

Para avaliar o estado nutricional dos pacientes utilizamos o método de avaliação nutricional subjetiva (SGA), adaptado para DRC[77]. A prescrição do conteúdo de proteína da dieta para todos os pacientes foi de 0,8 g/kg/dia, o que resultou em uma quantidade média de P de 615 ± 63 mg/dia. Os pacientes foram orientados a não modificar o tipo de alimentos consumidos durante as 8 semanas do estudo, e a cada consulta estas orientações eram reforçadas. A cada consulta um interrogatório sobre o consumo de alimentos era realizado para estimar a quantidade de proteína e fósforo consumidos.

3.4 - Análise estatística

Os parâmetros bioquímicos foram expressos como média e desvio padrão (exceto o PTH e o FGF-23, que foram expressos em mediana e percentil 25-75). As variáveis analisadas no início e final do estudo foram comparadas usando o Teste de Soma de Postos (*Wilcoxon Rank Sum Test*). Mudanças entre o início e final do estudo foram comparadas dentro do mesmo grupo usando o Teste de Postos com Sinais (*Wilcoxon Signed Rank Test*).

As análises estatísticas foram realizadas com auxilio do *software Graph Pad Prism* versão 4.0 e do *software* SPSS versão 10.0 para *Windows*. O valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

4 - Resultados

Os pacientes (23 homens e 19 mulheres) foram randomizados em dois grupos para receber acetato de cálcio ou hidrocloreto de sevelamer. No grupo acetato de cálcio, dois pacientes foram excluídos na primeira semana devido a palpitações e a diarréia, respectivamente.

A principal causa de DRC foi hipertensão arterial sistêmica (N=25; 62,5%), seguido por nefrite intersticial crônica (N=4; 10%), doença renal policística do adulto (N=3; 7,5%) e glomerulonefrite crônica (N=3; 7,5%). Em 5 pacientes (12,5%) a etiologia da DRC foi indeterminada. De acordo com a fórmula de Cockroft-Gault, 22 pacientes foram classificados como portadores de DRC estágio III (12 no grupo acetato de cálcio e 10 no grupo hidrocloreto de sevelamer) e 18 pacientes como DRC estágio IV (7 no grupo acetato de cálcio e 11 no grupo hidrocloreto de sevelamer). Todos os pacientes foram considerados nutridos, após a avaliação nutricional subjetiva (SGA)[77].

A tabela 2 mostra as características clínicas e bioquímicas dos pacientes no início do estudo. Não houve diferenças significativas entre os parâmetros analisados nos dois grupos no início do estudo.

No início do estudo, o nível médio de P dos pacientes foi semelhante aos níveis médios de 102 indivíduos com função renal normal, doadores de rim do ambulatório de transplante renal do HC-FMUSP (3,53 ± 0,60 *versus* 3,42 ± 0,58, NS). Apesar da baixa ingestão de P na dieta (739 ± 253 mg/dia), níveis séricos normais de P, e fosfatúria (Pu) relativamente baixa, a fração de excreção de P (FEP) e os níveis de PTH dos pacientes eram mais elevados que o normal. Os níveis médios de 25-hidroxivitamina D foram 34,8 ± 20,6 ng/ml, sendo que 18 pacientes apresentavam níveis de 25-hidroxivitamina D inferior a 30 ng/ml (8 no grupo acetato de cálcio e 10 no grupo hidrocloreto de sevelamer). Em relação aos níveis de FGF-23, 35 dos 40 pacientes apresentavam níveis elevados.

Tabela 2 – Dados demográficos, clínicos e bioquímicos do início do estudo, divididos por população total e os dois subgrupos, acetato de cálcio e hidrocloreto de sevelamer.

	População total	**Acetato de Cálcio**	**Hidrocloreto de Sevelamer**	**Valores de referência**
N	40	19	21	
Idade (anos)	50,38 ± 11,40	51,21 ± 9,98	49,62 ± 12,75	-
IMC (kg/m^2)	26,28 ± 4,58	26,95 ± 4,16	25,67 ± 4,95	18-25
Gênero (H/M)	21/19	9/10	12/9	-
Creatinina (mg/dl; H/M)	2,55 ± 0,78	2,52 ± 0,76	2,59 ± 0,82	0,8-1,2/0,6-1,0
Clcr (ml/min/1.73m^2; H/M)	34,55 ± 15,89	32,07 ± 9,92	36,9 ± 20	85-125/75-115
Bicarbonato (mmol/L)	21,63 ± 3,79	20,82 ± 2,97	22,37 ± 4,34	23-30
Albumina (g/dl)	4,35 ± 0,30	4,35 ± 0,21	4,36 ± 0,37	3,5-5
Cálcio (mg/dl)	9,29 ± 0,50	9,34 ± 0,56	9,24 ± 0,45	8,6-10,2
Fósforo (mg/dl)	3,53 ± 0,60	3,61 ± 0,54	3,45 ± 0,65	2,7-4,5
Fosfatase alcalina total (U/L)	81,20 ± 21,72	84,42 ± 25,32	78,29 ± 18,01	35-104
Fosfatase alcalina óssea (U/L)	35,10 ± 11,46	36,91 ± 12,62	33,46 ± 10,35	11,6–42,7
Deoxipiridinolina (nmol/L)	10,32 ± 3,38	9,81 ± 3,25	10,80 ± 3,52	3,25 ± 0,66
25-hidroxivitamina D (ng/ml)	34,75 ± 20,65	35,71 ± 18,66	33,88 ± 22,73	> 30
1,25-hidroxivitamina D (pg/ml)	31,27 ± 21,18	32,82 ± 16,67	29,79 ± 25,08	15,9-55,6
PTH (pg/ml)	101 (70-130)	89 (52-141)	107 (76-130)	10-65
FGF-23 (pg/ml)	97 (64-142)	97 (62-148)	103 (62-142)	8,2-54,3
PCR (mg/L)	0,63 ± 0,75	0,63 ± 0,74	0,63 ± 0,77	< 5,0
Cálcio urinário (mg/24h)	24,27 ± 25,61	23,39 ± 24,49	25,11 ± 27,27	100-320
Fósforo urinário (mg/24h)	490,5 ± 150,9	444,5 ± 154,6	534,1 ± 137,3	400-1300
FeP (%)	59,7 ± 32,4	58,2 ± 37,2	61,0 ± 28,4	5-18
Proteinúria (g/24h)	0,45 ± 0,75	0,35 ± 0,67	0,55 ± 0,82	<0,1

Clcr = *clearance de creatinina*; PTH = paratormônio; FeP = fração de excreção de fósforo; PCR = proteína c reativa.

Nas tabelas 3 e 4 estão descritos os valores médios dos parâmetros bioquímicos, no início do estudo, a cada 2 semanas e na fase de *washout* nos dois grupos de pacientes. Após o tratamento com quelantes de P, houve um declínio progressivo do PTH, Pu, e da FeP, sem mudanças significativas nos níveis de cálcio e fósforo séricos nos dois grupos de pacientes.

Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos no início, 2ª, 4ª e 6ª semanas e após o período de *washout* em pacientes tratados com acetato de cálcio (N=19).

	Grupo acetato de cálcio				
Exame	**Início**	**2ª semana**	**4ª semana**	**6ª semana**	***Washout***
P (mg/dl)	3,61 ± 0,54	3,52 ± 0,52	3,54 ± 0,72	3,50 ± 0,64	3,68 ± 0,62
Ca (mg/dl)	9,34 ± 0,56	9,29 ± 0,55	9,45 ± 0,50	9,38 ± 0,52	9,33 ± 0,56
Cr (mg/dl)	2,52 ± 0,76	2,39 ± 0,71	2,44 ± 0,70	2,56 ± 0,69	2,47 ± 0,69
FAT (U/l)	84,42 ± 25,32	81,95 ± 22,61	88,11 ± 26,33	89,05 ± 32,87	80,58 ± 24,73
FAO (U/l)	36,91 ± 12,62	-	-	37,94 ± 13,79[2]	-
DPD (nmol/l)	9,81 ± 3,25	-	-	9,62 ± 3,69[2]	-
25 vit D (ng/ml)	35,71 ± 18,66	-	-	33,27 ± 13,60[2]	-
1,25 vit D (pg/ml)	32,82 ± 16,67	34,59 ± 18,56	31,26 ± 11,04	28,55 ± 13,50	43,72 ± 34,20
PTH (pg/ml)	89 (52-141)	95 (64-110)	76 (43-105)	75 (40-110)[1]	108 (63-146)
FGF-23 (pg/ml)	97 (62-148)	60 (39-91)	90 (46-135)	77 (56-120)[2]	87 (65-144)
Cau (mg/24h)	23,39 ± 24,49	23,47 ± 17,58	30,11 ± 21,68	35,93 ± 14,73	24,28 ± 14,79
Pu (mg/24h)	445 ± 155	400 ± 182	380 ± 144 [1]	244 ± 121[1]	478 ± 152
FeP (%)	58,2 ± 37,2	42,3 ± 30,8	35,5 ± 22,1[1]	27,1 ± 13,3[1]	47,5 ± 25,0

[1]Variação intra-grupo comparativamente ao início do estudo; $P < 0,05$; [2]Variação entre-grupos (em relação a tabela 4); $P < 0,05$; P = fósforo sérico; Ca = cálcio sérico; Cr = creatinina; FAT = fosfatase alcalina total; FAO = Fosfatase alcalina óssea; DPD = deoxipiridinolina; PTH = paratormônio; Cau = cálcio urinário; Pu = fósforo urinário; FeP = fração de excreção de fósforo.

Tabela 4 - Parâmetros bioquímicos no início, 2ª, 4ª e 6ª semanas e após o período de *washout* em pacientes tratados com hidrocloreto de sevelamer (N=21).

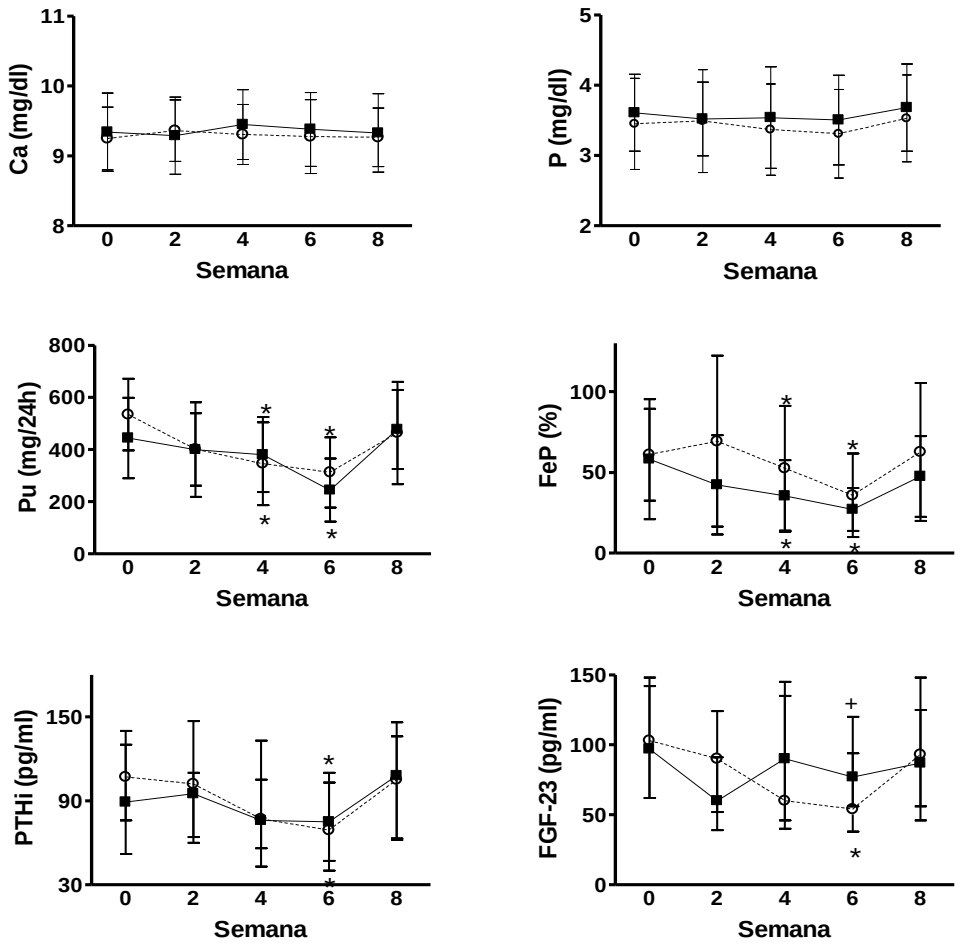
	Grupo hidrocloreto de sevelamer				
Exame	**Início**	**2ª semana**	**4ª semana**	**6ª semana**	***Washout***
P (mg/dl)	3,45 ± 0,65	3,49 ± 0,73	3,37 ± 0,65	3,31 ± 0,63	3,53 ± 0,61
Ca (mg/dl)	9,24 ± 0,45	9,36 ± 0,44	9,30 ± 0,43	9,27 ± 0,53	9,26 ± 0,42
Cr (mg/dl)	2,59 ± 0,82	2,43 ± 0,68	2,48 ± 0,72	2,42 ± 0,72	2,37 ± 0,75
FAT (U/l)	78,29 ± 18,01	80,71 ± 19,76	92,57 ± 56,64	102,6 ± 76,22[1]	83,95 ± 25,41
FAO (U/l)	33,46 ± 10,35	-	-	38,56 ± 16,41[1,2]	-
DPD (nmol/l)	10,8 ± 3,52	-	-	10,25 ± 3,06[1,2]	-
25 vit D (ng/ml)	33,88 ± 22,73	-	-	28,64 ± 19,76[1,2]	-
1,25 vit D (pg/ml)	29,79 ± 25,08	29,70 ± 17,26	32,26 ± 21,88	30,42 ± 14,97	32,92 ± 16,16
PTH (pg/ml)	107 (76-130)	102 (60-147)	77 (51-126)	69 (47-94)[1]	105 (63-146)[1]
FGF-23 (pg/ml)	103 (62-142)	90 (52-124)	60 (41-145)	54 (38-94) [1,2]	93 (46-125)
Cau (mg/24h)	25,11 ± 27,27	31,8 ± 27,61	29,71 ± 30,56	36,71 ± 30,58	35,24 ± 42,19
Pu (mg/24h)	534 ± 137	401 ± 139	346 ± 160[1]	313 ± 135[1]	464 ± 197
FeP (%)	61,0 ± 28,4	69,3 ± 52,9	52,6 ± 38,7[1]	35,8 ± 25,9[1]	62,7 ± 42,7

[1]Variação intra-grupo comparativamente ao início do estudo; $P < 0,05$; [2]Variação entre-grupos (em relação a tabela 3); $P < 0,05$; P = fósforo sérico; Ca = cálcio sérico; Cr = creatinina; FAT = fosfatase alcalina total; FAO = Fosfatase alcalina óssea; DPD = deoxipiridinolina; PTH = paratormônio; Cau = cálcio urinário; Pu = fósforo urinário; FeP = fração de excreção de fósforo.

Pacientes tratados com hidrocloreto de sevelamer apresentaram aumento significativo da fosfatase alcalina fração óssea e redução da deoxipiridinolina séricas, o que não ocorreu no grupo tratado com acetato de cálcio. Pacientes tratados com hidrocloreto de sevelamer também apresentaram redução significativa dos níveis de 25-vitamina D. Não foi observada mudança significativa no cálcio urinário ou na 1,25-vitamina D em ambos os grupos. Contudo, 60% (N=13) dos pacientes tratados com hidrocloreto de sevelamer apresentaram aumento significativo dos níveis de 1,25-vitamina D (elevação >10%), enquanto no grupo de pacientes tratados com acetato de cálcio, somente 31,6% (N=6) dos pacientes apresentaram aumento dos níveis de 1,25 vitamina D (p=0,07).

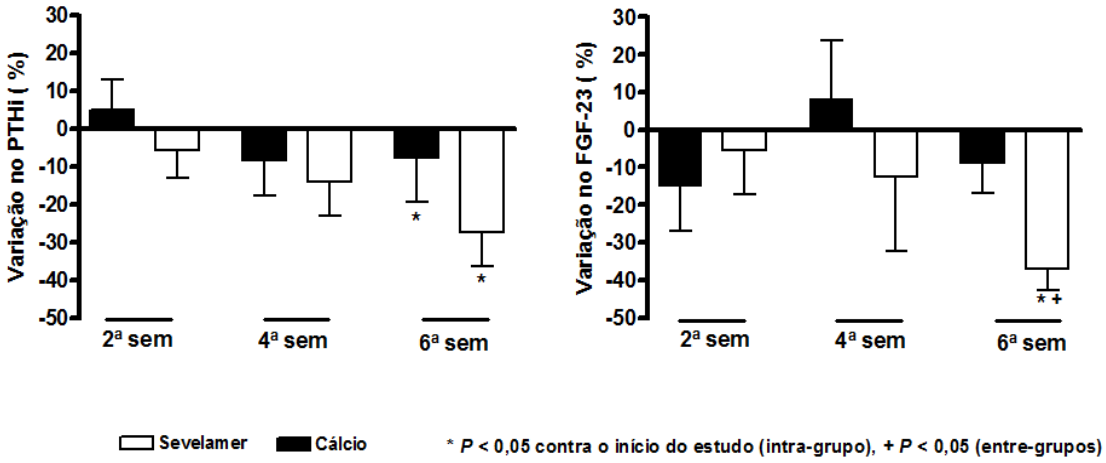
A figura 3 mostra as mudanças em valores absolutos nos níveis séricos de Ca, P, Pu, FeP, PTH e FGF-23, em pacientes tratados com hidrocloreto de sevelamer ou acetato de cálcio durante um período de 6 semanas, seguidos por um período de *washout* de 2 semanas.

Figura 3. Variações absolutas nos níveis séricos de cálcio (Ca), fósforo (P), fósforo urinário (Pu), fração de excreção de fósforo (FeP), paratormônio (PTHi) e FGF-23, em pacientes tratados com hidrocloreto de sevelamer (o) ou acetato de cálcio (■) durante um período de 6 semanas, seguidos por um período de *washout* de 2 semanas.



A figura 4 mostra as mudanças percentuais dos níveis séricos de PTH e FGF-23 ao longo de 6 semanas do estudo.

Figura 4. Porcentagem de variação dos níveis séricos de paratormônio (PTHi) e FGF-23 em pacientes tratados com hidrocloreto de sevelamer (□) ou acetato de cálcio (■) durante um período de 6 semanas.



Na 4ª semana do estudo, os pacientes do grupo hidrocloreto de sevelamer apresentaram uma tendência para redução dos níveis de FGF-23 (p=0,06), o que não ocorreu no grupo tratado com acetato de cálcio. Na 6ª semana, os pacientes do grupo hidrocloreto de sevelamer apresentaram uma redução significativa nos níveis de FGF-23 (103 pg/ml *versus* 54 pg/ml na 6ª semana; P<0,05), fato não observado no grupo acetato de cálcio (97 pg/ml *versus* 77 pg/ml na 6ª semana do estudo; NS). Uma comparação entre os grupos também mostrou uma diferença significativa entre as mudanças percentuais nos níveis de FGF-23 observadas ao longo das 6 semanas de tratamento (-53,6 ± 64,7 pg/ml no grupo hidrocloreto de sevelamer *versus* -16 ± 49,1 pg/ml no grupo acetato de cálcio; P<0,05).

Quando os pacientes foram divididos de acordo com o estágio da DRC, no estágio III, observamos uma redução significativa nos níveis de FGF-23 no grupo tratado com hidrocloreto de sevelamer (78 pg/ml no início *versus* 51 pg/ml na 6ª semana do estudo; P<0,05), mas não no tratado com acetato de cálcio (93 pg/ml no início *versus* 70 pg/ml na 6ª semana do estudo; NS). Da mesma maneira, no

estágio IV da DRC, o grupo tratado com hidrocloreto de sevelamer apresentou uma redução significativa nos níveis de FGF-23 (109 pg/ml no início *versus* 63 pg/ml na 6ª semana do estudo; P<0,05), fato não observado nos pacientes tratados com acetato de cálcio (130 pg/ml no início *versus* 87 pg/ml na 6ª semana do estudo; NS).

Depois do período de *washout*, todos os parâmetros foram semelhantes aos encontrados no início do estudo nos dois grupos.

5 - Discussão

Estudos prévios demonstraram que o aumento da concentração de PTH ocorre em pacientes com DRC estágio III, cujos níveis de Ca e P séricos são normais[61, 78]. O *SEEK study*[21], uma análise de 1814 pacientes com DRC estágios III a V, revelou que alterações significativas dos níveis de Ca e P são observadas apenas quando o ritmo de filtração glomerular diminui abaixo de 40 ml/min. Contudo, cerca de 60% dos pacientes com ritmo de filtração glomerular abaixo de 60 ml/min apresentavam elevação do PTH sérico. Apesar destes resultados, a recomendação atual para pacientes nesses estágios de insuficiência renal é restringir P na dieta, somente se houver hiperfosfatemia.

Nosso estudo demonstrou pela primeira vez que o uso de quelantes de P em pacientes com DRC estágios III e IV com níveis normais de P reduziu a excreção urinária e a fração de excreção de P, e os níveis de PTH, sem modificar os níveis séricos de Ca e P. Portanto, o uso de quelantes de P em fases iniciais da DRC pode contribuir para o controle dos níveis de PTH.

O controle dos níveis de PTH, desde os estágios iniciais da DRC, provavelmente é benéfico para os pacientes uma vez que estudos demonstraram associação entre níveis elevados PTH e doença óssea, além de doença cardiovascular, uma das principais causas de morte nesta população. Estudo com indivíduos normais mostrou que a infusão contínua de 1-34 PTH por 12 dias associou-se com aumento da pressão arterial[79]. Outro estudo com 1784 indivíduos seguidos por 7 anos, revelou que os níveis de PTH foram preditores de hipertensão arterial sistólica em homens, mesmo após correção para fatores

como idade, índice de massa corporal e tabagismo[80]. Em uma análise de 2040 indivíduos para se examinar a relação entre PTH e hipertrofia do ventrículo esquerdo, observou-se que em homens com mais de 59 anos e mulheres com menos de 60 anos, o PTH foi um preditor significativo de hipertrofia do ventrículo esquerdo[81]. Estudo com uma população de 958 indivíduos, sendo 617 deles sem doença cardiovascular prévia, com média de idade de 71 anos, o nível sérico de PTH foi preditor de mortalidade cardiovascular, mesmo naqueles com valores de PTH dentro da faixa de referência[6]. Alem desses efeitos sobre o sistema cardiovascular o PTH contribui para o desenvolvimento de calcificação vascular. Estudo experimental mostrou que células endoteliais vasculares quando estimuladas com PTH apresentavam redução da expressão do RNA mensageiro de osteoprotegerina, um conhecido fator de proteção do endotélio vascular[82].

Outro resultado interessante no nosso estudo foi que os pacientes tratados com hidrocloreto de sevelamer apresentaram redução efetiva dos níveis de FGF-23. Este resultado tem importantes implicações clínicas. De maneira similar a teoria do *trade off* [22, 23] proposta para o PTH, pequenas elevações de FGF-23 poderiam prevenir a hiperfosfatemia nos estágios iniciais da DRC. Porém, em longo prazo, o excesso de FGF-23 poderia favorecer desfechos clínicos negativos, como o desenvolvimento de hiperparatiroidismo secundário, progressão rápida da DRC e maior taxa de mortalidade[63-68]. Dessa forma, modular os níveis séricos de FGF-23 pode ser benéfico aos pacientes, reduzindo eventos adversos especialmente os relacionados aos distúrbios do metabolismo ósseo e mineral.

Não sabemos qual o mecanismo envolvido na redução dos níveis de FGF-23 pelo sevelamer, uma vez que esta redução não pode ser atribuída à modulação do P sérico ou da 1,25 vitamina D, dois conhecidos reguladores do FGF-23. Acredita-se que o sevelamer diminua o estresse oxidativo e marcadores inflamatórios pelos seus efeitos pleotróficos sobre o endotélio vascular de pacientes com DRC[83, 84]. Tal efeito poderia dar-se através da propriedade do sevelamer de quelar endotoxinas no intestino, prevenindo assim a absorção intestinal de substâncias estimulantes da resposta inflamatória[83]. Um estudo com 31 pacientes em hemodiálise observou redução nos parâmetros de estresse oxidativo e marcadores inflamatórios em pacientes tratados por um ano com sevelamer quando comparados ao grupo de pacientes que recebeu acetato de cálcio[84]. Achado semelhante foi observado em outro estudo com 23 pacientes em hemodiálise. Após a troca de carbonato de cálcio por sevelamer, estes pacientes foram seguidos por 6 meses e os níveis de PCR e endotoxinas reduziram significativamente, com queda do PCR de 4,8 ± 1,2 mg/L para 0,44 ± 0,12 mg/L e de endotoxinas de 3.6±0.8mg/L para 1,2 ± 0,6 EU/mL[85]. No nosso estudo não observamos alterações significativas nos níveis de PCR, porém nosso tempo de seguimento foi de apenas 8 semanas.

Especula-se que o Ca tenha um papel na regulação do FGF-23. Estudo realizado em pacientes com hiperparatiroidismo primário submetidos à paratiroidectomias revelou que os níveis séricos de FGF-23 correlacionavam-se com os de Ca, independente do P sérico[86]. Outro estudo em camundongos sem receptores para vitamina D mostrou que o cálcio pode ser um outro determinante da produção de FGF-23. Nestes animais os níveis de FGF-23 eram praticamente

indetectáveis. A administração intravenosa de FGF-23 recombinante reduziu o nível sérico de P, por mecanismos independentes da via calcitriol/receptor de vitamina D. Quando esses animais receberam dieta suplementada com Ca observou-se aumento significativo da expressão do RNA mensageiro de FGF-23 no tecido ósseo, indicando, assim, que o Ca pode ser um outro determinante da produção de FGF-23[87]. Recentemente, nosso grupo estudou 72 pacientes em hemodiálise nos quais avaliamos a remodelação óssea e os efeitos da carga de Ca no organismo desses pacientes. No início do estudo, após um período sem o uso de quelantes de P ou uso de calcitriol, os pacientes foram submetidos à biópsia óssea, tomografia computadorizada de coronárias para avaliação do escore de Ca, além da dosagem de marcadores bioquímicos da remodelação óssea. Os pacientes foram então randomizados em dois grupos, tratados com acetato de cálcio ou hidrocloreto de sevelamer. Após 1 ano realizaram nova biópsia óssea e a tomografia computadorizada de coronárias. Durante o seguimento, a prescrição de calcitriol e a concentração de Ca no banho de diálise foram ajustadas de acordo com os níveis de Ca, P, PTH e de acordo com o tipo de remodelação óssea detectada na biópsia óssea do início do estudo. Os resultados revelaram que os pacientes tratados com calcitriol, ou acetato de cálcio, e cujo banho do dialisato continha mais Ca (Ca^{++} = 3,5 mEq/L) apresentavam níveis mais elevados de FGF-23 ao final de 1 ano[70]. A constatação de que a sobrecarga de Ca influencia os níveis de FGF-23 pode ter implicações com desfechos clínicos importantes como mortalidade e doença cardiovascular, uma vez que diversos estudos mostraram a associação entre níveis elevados de FGF-23 e esses desfechos clínicos[63-68].

No nosso estudo, o aumento significativo dos níveis séricos de fosfatase alcalina fração óssea e a redução da deoxipiridinolina observados nos pacientes tratados com sevelamer sugerem melhora da remodelação óssea. Estudo em cultura de células de animais revelou que o aumento de expressão de FGF-23 suprime não somente a diferenciação dos osteoblastos, mas também a mineralização, independente dos efeitos do P[88]. Portanto, é possível inferir que o tratamento com sevelamer melhorou a remodelação óssea dos pacientes uma vez que diminuiu os níveis de FGF-23 e de deoxipiridinolina, e aumentou os níveis séricos da fosfatase alcalina fração óssea. Contudo, necessitaríamos de biópsia óssea para confirmar esse resultado.

Quanto aos níveis séricos de 1,25 vitamina D, não observamos diferenças entre os dois tratamentos, apesar de uma maior proporção de pacientes tratados com sevelamer apresentar elevação dos níveis deste hormônio (60% *versus* 31,6%, NS). Acreditamos que o tempo de estudo e o pequeno número de pacientes estudados tenham impedido a detecção do aumento dos níveis de 1,25 vitamina D, secundário a queda dos níveis de FGF-23. Da mesma maneira, a redução significativa dos níveis de 25 vitamina D deve ser analisada com cautela, pois nenhum outro estudo observou efeitos nos níveis deste hormônio relacionados ao tratamento com sevelamer.

Até o presente momento esse foi o primeiro estudo que avaliou os efeitos de quelantes de P nos níveis séricos de FGF-23 em pacientes com DRC estágios III e IV. Nossos resultados demonstraram que a redução dos níveis séricos de FGF-23 não se acompanha de mudanças nos níveis séricos de P, sugerindo que o P

sérico não reflete adequadamente a sobrecarga de P nos pacientes com DRC. O mesmo pode afirmar-se quanto ao Ca sérico[89].

Nosso estudo apresenta limitações. Apesar de a nefropatia diabética ser uma das principais causas de DRC, excluímos pacientes com diabete melito e também aqueles pacientes com proteinúria significativa, devido à associação entre proteinúria e deficiência de vitamina D. A população estudada e a duração do estudo são pequenos. Certamente, no futuro serão necessários estudos de longo prazo para confirmar os nossos resultados.

Contudo, considerando o conhecimento atual em relação ao controle do P na DRC nos sentimos motivados a propor uma mudança de paradigma: alterar as recomendações atuais, as quais propõem o uso de quelantes de P nas fases II a IV da DRC somente para pacientes com níveis de P acima de 4,6 mg/dl, para uma abordagem mais agressiva, ou seja, usar quelantes de P em pacientes com DRC mesmo quando seus níveis séricos de P são normais.

Uma recente revisão sobre o tema[90] chama atenção para a melhor compreensão do papel do P e do FGF-23 na DRC, propondo a comunidade nefrológica um estudo randomizado, controlado e de longa duração com uso de quelantes de P em fases iniciais da DRC, analisando desfechos clínicos como calcificação vascular, saúde óssea e progressão da DRC. Nosso estudo demonstrou que o uso de quelantes de P em curto prazo não se associou a eventos adversos. O estudo também oferece informações preliminares sobre o controle do PTH, e surpreendentemente mostrou que os níveis de FGF-23 podem ser influenciados por determinado tipo de quelante de P.

6 - Conclusões

Em conclusão, o uso de quelantes de P em pacientes com DRC estágios III e IV com nível de P sérico normal associou-se com diminuição dos níveis séricos de PTH sem mudanças nos níveis séricos de Ca e P.

O hidrocloreto de sevelamer foi capaz de reduzir os níveis séricos de FGF-23, o que não foi observado nos pacientes tratados com acetato de cálcio.

Os benefícios destes achados precisam ser confirmados em estudos de longo prazo, avaliando desfechos clínicos, tais como, progressão da DRC e mortalidade.

7 - Referências bibliográficas

1. Eknoyan G, Lameire N, Barsoum R, Eckardt KU, Levin A, Levin N, Locatelli F, MacLeod A, Vanholder R, Walker R, Wang H. The burden of kidney disease: improving global outcomes. *Kidney Int*. 2004;66:1310-4.
2. Moe S, Drueke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, Ott S, Sprague S, Lameire N, Eknoyan G. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy. A position statement from Kidney disease: improving global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2006;69:1945-53.
3. Block GA, Cunningham J. Morbidity and mortality associated with abnormalities in bone and mineral metabolism in CKD. *In*: Olgard K (ed). Clinical guidelines to the basics of Bone and mineral metabolism in CKD. Chapter 4, National kidney foundation: New York, 2006, pp 77-92.
4. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:2208-18.
5. Kestenbaum B, Sampson JN, Rudser KD, Patterson DJ, Seliger SL, Young B, Sherrard DJ, Andress DL. Serum phosphate levels and mortality risk among people with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:520-8.
6. Hagstrom E, Hellman P, Larsson TE, Ingelsson E, Berglund L, Sundström J, Melhus H, Held C, Lind L, Michaëlsson K, Arnlöv J. Plasma parathyroid hormone and the risk of cardiovascular mortality in the community. Circulation. 2009;119:2765-71.

7. Foley RN. Phosphate levels and cardiovascular disease in the general population. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4:1136-9.
8. Dhingra R, Sullivan LM, Fox CS, Wang TJ, D'Agostino RB Sr, Gaziano JM, Vasan RS. Relations of serum phosphorus and calcium levels to the incidence of cardiovascular disease in the community. *Arch Intern Med.* 2007;167:879-85.
9. Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M, Gao Z, Curhan G. Relation between serum phosphate level and cardiovascular event rate in people with coronary disease. Circulation. 2005;112:2627-33.
10. Saleh FN, Schirmer H, Sindsfjord J, Jorde R. Serum parathyroid hormone and left ventricular hypertrophy. Eur Heart J. 2003;24:2054-60.
11. Schluter KD, Millar BC, McDermott BJ, Piper HM. Regulation of protein synthesis and degradation in adult ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol*. 1995; 269:C1347-55.
12. Rashid G, Bernheim J, Green J, Benchetrit S. Parathyroid hormone stimulates the endothelial expression of vascular endothelial growth factor. *Eur J Clin Invest*. 2008;38:798-803.
13. Rashid G, Plotkin E, Klein O, Green J, Bernheim J, Benchetrit S. Parathyroid hormone decreases endothelial osteoprotegerin secretion: role of protein kinase A and C. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;296:60-6.
14. Rashid G, Bernheim J, Green J, Benchetrit S. Parathyroid hormone stimulates the endothelial nitric oxide synthase through protein kinase A and C pathways. *Nephrol Dial Tranplant*. 2007;22:2831-7.

15. Ritz E, Gross ML, Dikow R. Role of calcium-phosphorus disorders in the progression of renal failure. *Kidney Int*. 2005;68:S66-S70.
16. Keteller M, Giachelli C. Novel insights into vascular calcification. *Kidney Int*. 2006;105:S5-S9.
17. Klemmer PJ. Calcium loading, calcium accumulation, and associated cardiovascular risks in dialysis patients. Blood Purif. 2005;23:S12-9.
18. Jono S, McKee MD, Murry CE, Shioi A, Nishizawa Y, Mori K, Morii H, Giachelli CM. Phosphate regulation of vascular smooth muscle cell calcification. *Cir Res.* 2000;87:E10-17.
19. Moe SM, Duan D, Doehle BP, O'Neill KD, Chen NX. Uremia induces the osteoblast differentiation factor Cbfa1 in human blood vessels. *Kidney int.* 2003;63:1003-11.
20. Neves KR, Graciolli FG, dos Reis LM, Pasqualucci CA, Moysés RM, Jorgetti V. Adverse effects of hyperphosphatemia on myocardial hypertrophy, renal function and bone in rats with renal failure. *Kidney Int.* 2004;66:2237-44.
21. Levin A, Bakris GL, Molitch M, Smulders M, Tian J, Williams LA, Andress DL. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int*. 2007;71:31-8.
22. Slatopolsky E, Gradwska A, Kashemsant C, Keltner R, Manley C, Bricker NS. The control of phosphate excretion in uremia. J Clin Invest. 1966;45:672-7.

23. Slatopolsky E, Caglar S, Pennell JP, Taggart DD, Canterbury JM, Reiss E, Bricker NS: On the pathogenesis of hyperparathyroidism in chronic experimental renal insufficiency in the dog. J Clin Invest. 1971;50: 492–499.
24. Barsotti G, Giannoni A, Morelli E, Lazzeri M, Vlamis I, Baldi R, Giovannetti S. The decline of renal function slowed by very low phosphorus intake in chronic renal patients following a low nitrogen diet. *Clin Nephrol*. 1984;21:54-9.
25. Voormolen N, Noordzij M, Grootendorst DC, Beetz I, Sijpkens YW, van Manen JG, Boeschoten EW, Huisman RM, Krediet RT, Dekker FW . High plasma phosphate as a risk factor for decline in renal function and mortality in pre-dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;2909-16.
26. Souberbielle JCP, Roth H, Fouque DP. Parathyroid hormone measurement in CKD. *Kidney International*. 2010; 77:93-100.
27. Barry C Kress, *in* Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 6th ed, Murray J Favus, ASBMR, 2006, pp 492.
28. Berndt T, Schiavi S, Kumar R. "Phosphatonins" and the regulation of phosphorus homeostasis. *Am J Renal Physiol*. 2005;289:F1170-82.
29. Murer H, Biber J. Renal tubular phosphate transport. *In* The Kidney: Physiology and Pathophysiology, edited by Seldin DW and Giebisch G. New York: Raven, 1992, pp 2481-2509.
30. Cai Q, Hodgson SF, Kao PC, Lennon VA, Klee GG, Zinsmiester AR, Kumar R. Brief report: inhibition of renal phosphate transport by a tumor product in a patient with oncogenic osteomalácia. *N Engl J Med*. 1994;330:1645-9.

31. Econs MJ, Drezner MK. Tumor-induced osteomalácia – unveiling a new hormone. *New Engl J Med.* 1994;330:1679-81.
32. Kumar R. Phosphatonin – a new phosphaturetic hormone? (lessons from tumor- induced osteomalacia and X-linked hipophosphataemia). *Nephrol Dial transplant.* 1997;12:11-13.
33. Kumar R. Tumor-induced osteomalacia and the regulation of phosphate homeostasis. *Bone.* 2000;27:333-8.
34. Burgess WH, Maciag T. The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu Rev Biochem.* 1989;58:575-606.
35. Mckeehan WL, Wang F, Kan M. The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1998;59:135-76.
36. Martin GR. The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes Dev.* 1998;12:1571-86.
37. Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventro-lateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem Biophy Res Comm.* 2000;277:494-8.
38. ADHR Consortium. Autossomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF-23. *Nat Genet.* 2000;26:345-8.
39. Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. Cloning and characterization of FGF-23 as a causative factor of tumor-induced osteomalácia. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98:6500-5.

40. Shimada T, Muto T, Urakawa I, Yoneya T, Yamazaki Y, Okawa K, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. Mutant FGF-23 responsible for autossomal dominant hipophosphatemic rickets is resistante to proteolytic cleavage and causes hypophosphatemia in vivo. *Endocrinology*. 2002;143:3179-82.

41. Bowe AE, Finnegan R, Jan de Beur SM, Cho J, Levine MA, Kumar R, Schiavi SC. FGF-23 inhibits renal tubular phosphate transport and is a PHEX substrate. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;284:977-81.

42. Murer H, Hernando N, Foster I, Biber J. Regulation of Na/Pi transporter in the proximal tubule. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:531-42.

43. Yamashita T, Konishi M, Miyake A, Inui K, Itoh N. Fibroblast growth factor (FGF)-23 inhibits renal phosphate reabsorption by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem.* 2002;277:28265-70.

44. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Tomizuka K, Yamashita T. Targeted ablation of FGF-23 demonstrates an essential physiological role of FGF-23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest.* 2004;113:561-8.

45. Larsson T, Marsell R, Schipani E, Ohlsson C, Ljunggren O, Tenenhouse HS, Jüppner H, Jonsson KB. Transgenic mice expressing fibroblast growth factor 23 under the control of the α(I) collagen promoter exhibit growth retardation, osteomalácia, and disturbed phosphate homeostasis. *Endocrinology*. 2004;145:3087-94.

46. Shimada T, Urakawa I, Yamazaki Y, Hasegawa H, Hino R, Yoneya T, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. FGF-23 transgenic mice

demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;314:409-14.

47. Mirams M, Robinson BG, Mason RS, Nelson AE. Bone as a source of FGF-23: regulation by phosphate? *Bone.* 2004;35:1192-9.
48. Ferrari SL, Bonjour JP, Rizzoli R. Fibroblast growth factor 23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:1519-24.
49. Liu S, Guo R, Simpson LG, Xiao ZS, Burnham CE, Quarles LD. Regulation of fibroblast growth factor 23 expression but not degradation by PHEX. *J Biol Chem*. 2003;278:37419-26.
50. Liu S, Quarles LD. How fibroblast growth factor 23 works. *J Am Soc Nephrol*. 2007.18:1637-47.
51. Matsumara Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y. Identification of the human *Klotho* gene and its two transcripts encoding membrane and secreted *Klotho* protein. *Biochem and Biophys Res Commun*. 1998;242:626-30.
52. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF-23. *Nature*. 2006;444:770-4.
53. Kuro-o M, Matsumara Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI. Mutation of the mouse *Klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997;390:45-51.

54. Torres PU, Prié D, Molina-Blétry V, Beck L, Silve C, Friedlander G. Klotho: an antiaging protein involved in mineral and vitamin D metabolism. *Kidney Int*. 2007;71:730-7.

55. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP, Kuro-o M. Supression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science*. 2005;309:1829-33.

56. Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Gurnani P, Nandi A, Kurosu H, Miyoshi M, Ogawa Y, Castrillon DH, Rosenblatt KP, Kuro-o M. Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone Klotho. *J Biol Chem*. 2005;280:38029-34.

57. Fukagawa M, Nii-Kono T, Kazama JJ. Role of fibroblast growth factor 23 in health and in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypert*. 2005;14:325-9.

58. Weber TJ, Liu S, Indridason OS, Quarles LD. Serum FGF-23 levels in normal and disordered phosphorus homeostasis. *J Bone Min Res*. 2003;18:1227-34.

59. Larsson T, Nisbeth U, Ljunggren O, Jüppner H, Jonsson KB. Circulating concentration of FGF-23 increases as a renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers. *Kidney Int.* 2003;64:2272-9.

60. Imanishi Y, Inaba M, Nakatsuka K, Nagasue K, Okuno S, Yoshihara A, Miura M, Miyauchi A, Kobayashi K, Miki T, Shoji T, Ishimura E, Nishizawa

Y. FGF-23 in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. *Kidney Int.* 2004;65:1943-6.

61. Shigematsu T, Kazama JJ, Yamashita T, Fukumoto S, Hosoya T, Gejyo F, Fukagawa M. Possible involvement of circulating fibroblast growth factor 23 in the development of secondary hyperparathyroidism associated with renal insufficiency. *Am J Kidney Dis.* 2004;44:250-6.
62. Gutierrez O, Isakova T, Rhee E, Shah A, Holmes J, Collerone G, Jüppner H, Wolf M. Fibroblast growth factor 23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16:2205-15.
63. Fliser D, Kollerits B, Neyer U, Ankerst DP, Lhotta K, Lingenhel A, Ritz E, Kronenberg F; MMKD Study Group, Kuen E, König P, Kraatz G, Mann JF, Müller GA, Köhler H, Riegler P. Fibroblast growth factor 23 (FGF-23) predicts progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18:2600-8.
64. Titan SM, Zatz R, Jorgetti V, Graciolli FG, dos Reis LM, Moysés RMA. FGF-23 as a predictor of renal outcome in diabetic nephropathy [abstract]. *J Am Soc Nephrol.* 2009; PO1872.
65. Nakanishi S, Kazama JJ, Nii-Kono T, Omori K, Yamashita T, Fukumoto S, Gejyo F, Shigematsu T, Fukagawa M. Serum fibroblast growth factor-23 levels predict the future refractory hyperparathyroidism in dialysis patients. *Kidney Int.* 2005;67:1171-8.
66. Gutiérrez OM, Januzzi JL, Isakova T, Laliberte K, Smith K, Collerone G, Sarwar A, Hoffmann U, Coglianese E, Christenson R, Wang TJ, deFilippi C,

Wolf M. Fibroblast Growth Factor 23 and Left Ventricular Hypertrophy in Chronic Kidney Disease. *Circulation.* 2009;119:2545-52.

67. Gutiérrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, Smith K, Lee H, Thadhani R, Jüppner H, Wolf M. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med.* 2008;359:584-92.
68. Jean G, Terrat JC, Vanel T, Hurot JM, Lorriaux C, Mayor B, Chazot C. High levels of serum fibroblast growth factor (FGF)-23 are associated with increased mortality in long hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24:2792-6.
69. Jean G, Bresson E, Terrat JC, Vanel T, Hurot JM, Lorriaux C, Mayor B, Chazot C. Peripheral vascular calcification in long-haemodialysis patients: associated factors and survival consequences. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24:948-55.
70. Cancela ALE, Oliveira RB, Graciolli FG, Dos Reis LM, Barreto F, Barreto DV, Cuppari L, Jorgetti V, Carvalho AB, Canziani ME, Moysés RMA. Fibroblast growth factor 23 in hemodialysis patients: effects of phosphate binder, calcitriol and calcium concentration in the dialysate. *Nephron Clin Pract, in press*.
71. Isakova T, Guitierrez O, Shah A, Castaldo L, Holmes J, Lee H, Wolf M. Postprandial mineral metabolism and secondary hyperparathyroidism in early CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:615-23.
72. Nishida Y, Taketani Y, Yamanaka-Okumura H, Imamura F, Taniguchi A, Sato T, Shuto E, Nashiki K, Arai H, Yamamoto H, Takeda E. Acute effect of

oral phosphate loading on serum fibroblast growth factor 23 levels in healthy men. *Kidney Int*. 2006;70:2141-7.

73. Gonzalez EA, Sachdeva A, Oliver DA, Martin KJ. Vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease. A single center observational study. *Am J Nephrol.* 2004;24:503-10.
74. Nagano N, Miyata S, Abe M, Kobayashi N, Wakita S, Yamashita T, Wada M. Effect of manipulating serum phosphorus with phosphate binder on circulating PTH and FGF12 in renal failure rats. *Kidney Int.* 2006;69:531-7.
75. Pande S, Ritter CS, Rothstein M, Wiesen K, Vassiliadis J, Kumar R, Schiavi SC, Slatapolsky E, Brown AJ. FGF-23 and sFRP in chronic kidney disease and post-renal transplantation. *Nephron Physiol.* 2006;104:23-32.
76. Koiwa F, Kazama J, Tokumoto A, Onoda N, Kato H, Okada T, Nii-Kono T, Fukagawa M, Shigematsu T. Sevelamer hydrocloride and calcium bicarbonate reduce serum fibroblast growth factor 23 levels in dialysis patients. *Ther Apher Dial*. 2005;9:336-9.
77. Canada - USA (CANUSA) Peritoneal Dialysis Study Group: Adequacy of dialysis and nutrition in continuous peritoneal dialysis: Association with clinical outcomes. *J Am Soc Nephrol*. 1996;7:198–207.
78. Vassalotti JA, Uribarri J, Chen SC, Li S, Wang C, Collins AJ, Calvo MS, Whaley-Connell AT, McCullough PA, Norris KC. Kidney Early Evaluation Program (KEEP) and the National Health and Nutrition Examination survey (NHANES). *Am J Kidney Dis*. 2008; 51:S56-S68.

79. Hulter HN, Melby JC, Peterson JC, Cooke CR. Chronic continuous PTH infusion results in hypertension in normal subjects. *J Clin Hypertens.* 1986; 2:360-70.

80. Jorde R, Svartberg J, Sundsfjord J. Serum parathyroid hormone as a predictor of increase in systolic blood pressure in men. *J Hypertens*. 2005; 23:1639-44.

81. Saleh FN, Schirmer H, Sundsfjord J, Jorde R. Parathyroid hormone and left ventricular hypertrophy. *Eur Heart J*. 2003; 24:2054-60.

82. Rashid G, Plotkin E, Klein O, Green J, Bernheim J, Benchetrit S. Parathyroid hormone decreases endothelial osteoprotegerin secretion: role of protein kinase A and C. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009 296:F60-6.

83. Peres AT, Dalboni MA, Canziani ME, Manfredi SR, Carvalho JTG, Batista MC, Cuppari L, Carvalho AB, Moyses RMA, Guimarães N, Jorgetti V, Andreolli MC, Draibe AS, Cendoroglo M. Effect of phosphate binders on oxidative stress and inflammation markers in hemodialysis patients. *Hemodial Int*. 2009; 13:271-77.

84. Sun PP, Perianayagam MC, Jaber BL. Endotoxin-binding affinity of sevelamer: apotential novel anti-inflammatory mechanism. *Kidney Int*. 2009; 76:S20-5.

85. Stinghen AEM, Gonçalves SM, Hauser, AB, Branco F, Gruber B, Pecoits-filho R. Sevelamer decreases systemic inflammation in dialysis patients through its endotoxin binding effects [abstract]. *In Renal Week* 2009. *Am Soc Nephrol.* 2009; 20:FC384.

86. Kobayashi K, Imanishi Y, MiyauchinA, Onoda N, Kawata T, Tahara H, Goto H, Miki T, Ishimura E, Sugimoto T, Ishikawa T, Inaba M, Nishizawa Y.

Regulation of plasma fibroblast growth factor 23 by calcium in primary hyperparathyroidism. Eur J Endocrinol. 2006; 154:93-99.

87. Shimada T, Yamazaki Y, Takahashi M, Hasegawa H, Urakawa I, Oshima T, Ono K, Kakitani M, Tomizuka K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T: Vitamin D receptor independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism. Am J Physiol Renal Physiol. 2005; 289:F1088–F1095.
88. Wang H, Yoshiko Y, Yamamoto R, Minamizaki T, Kozai K, Tanne K, Aubin JE, Maeda N. Overexpression of fibroblast growth factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. J Bone Miner Res. 2008; 23:939-948.
89. Houillier P, Froissart M, Maruani G, Blanchard A: What serum calcium can tell us and what it can’t. Nephrol Dial Transplant. 2006; 21:29–32.
90. Isakova T, Gutiérrez OM, Wolf M: A blueprint for randomized trials targeting phosphorus metabolism in chronic kidney disease. Kidney Int. 2009; 76:705–716.