Geovanna Oliveira Pires

**Efeitos da paratireoidectomia na biologia do tecido
ósseo de pacientes com doença renal crônica e
hiperparatireoidismo secundário**

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

Programa de Nefrologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Vanda Jorgetti

SÃO PAULO

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pires, Geovanna Oliveira

Efeitos da paratireoidectomia na biologia do
tecido ósseo de pacientes com doença renal crônica e
hiperparatireoidismo secundário / Geovanna Oliveira
Pires. -- São Paulo, 2018.

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

Programa de Nefrologia.

Orientadora: Vanda Jorgetti.

Descritores: 1.Distúrbio mineral e ósseo na doença
renal crônica 2.Insuficiência renal crônica
3.Hiperparatireoidismo secundário
4.Paratireoidectomia 5.Fatores de crescimento de
fibroblastos 23 6.Proteína DMP1 7.Fosfoglicoproteína
de matriz extracelular 8.Esclerostina 9.Fator
nuclear kappa beta ligante 10.Osteoprotegerina

USP/FM/DBD-008/18

Dedicatória

Aos meus amados pais, José de Arimatea e Maria de Fátima, que sempre me incentivaram a estudar e são exemplos de ética, companheirismo e dedicação, sendo um porto seguro e fontes de amor, força e crescimento

Aos meus irmãos Ary e Julyana e sobrinhos Isabela, Arthur e Eric, tão amados, e que mesmo à distância me dão forças para continuar seguindo em frente

Ao meu amado esposo, André, pelo apoio, companhia, paciência e compreensão nessa jornada e por trilhar seus caminhos ao meu lado

À minha pequena e amada Sophia, que mesmo antes de nascer, já traz tanta felicidade para toda a família

Agradecimentos

A Deus, pela vida e por todas as bênçãos, graças e oportunidades concedidas.

À minha orientadora, Dra. Vanda Jorgetti, a quem admiro por ser referência como pesquisadora e médica, e, especialmente, como um ser humano inspirador, sempre disposta a ajudar e que nos ensina, através de seu exemplo, valores como a integridade, determinação e princípios morais e éticos, que nos aprimoram enquanto pessoas. Muito obrigada!!

À Dra. Rosa Moysés, pelo apoio, conhecimento, valiosas instruções, ensinamentos e considerações compartilhadas.

À Dra. Melani, pelo incentivo e conhecimento transmitidos.

À Meire, Ivone, Luciene e Wagner pela paciência, ensinamentos e por toda ajuda, fundamental para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos do ambulatório de Doença Mineral Óssea, pelo apoio, parceria e por todo o conhecimento dividido.

À toda a minha família, pais, irmãos, esposo, sobrinhos, avôs, tios, primos, cunhados... É um grande presente fazer parte dessa grande, linda e amada família!!

Aos meus queridos sogros Virgínia e Walter Félix, pelo companheirismo e por transmitirem conhecimento e virtudes através de seus atos e ensinamentos espirituais.

Aos amigos do Instituto de Hemodiálise de Sorocaba pela compreensão, apoio e incentivo.

A todos os meus amigos, que não consigo citar todos os nomes, por fazerem parte de quem eu sou.

“Se quiseres acordar toda a humanidade, então acorda-te a ti mesmo, se quiseres eliminar o sofrimento no mundo, então elimina a escuridão e negativismo em ti próprio. Na verdade, a maior dádiva que podes dar ao mundo é aquela da tua própria autotransformação.” (Lao Tse)

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. 3^a 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 figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Remodelação óssea e osteócitos	2
1.2. Proteínas produzidas pelos osteócitos.....	5
1.2.1. Esclerostina	5
1.2.2. RANK-RANKL-OPG.....	8
1.2.3. MEPE.....	11
1.2.4. DMP-1.....	12
1.2.5. PHEX	13
1.2.6. FGF23.....	14
1.3. Osteócitos e mineralização	16
1.4. PTH e as proteínas osteocíticas	18
2. OBJETIVOS.....	23
3. MÉTODOS	25
3.1. Seleção das biópsias	25
3.2. Biópsia óssea.....	27
3.3. Histomorfometria.....	27
3.3.1. Parâmetros estáticos	28
3.3.2. Parâmetros dinâmicos	29
3.3.3. Quantificação dos osteócitos	31
3.4. Imunohistoquímica	31
3.5. Análise estatística	33

4. RESULTADOS.....	36
4.1. Avaliação clínica e laboratorial.....	36
4.2. Avaliação histomorfométrica	36
4.3. Expressão óssea do DMP-1, MEPE, esclerostina, FGF23, OPG e RANKL	41
4.4. Correlações entre a expressão óssea das proteínas e os dados laboratoriais e histomorfométricos	46
4.5. Mineralização e expressão de proteínas no tecido ósseo.....	51
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES	67
7. REFERÊNCIAS.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Osteócitos e o sistema lacuno canalicular.....	4
Figura 2. Ação inibitória da esclerostina na via de sinalização Wnt e BMP	7
Figura 3. Sinalização RANK/RANKL/OPG e a remodelação óssea	10
Figura 4. A produção de FGF23 pelos osteócitos é regulada por fatores locais e sistêmicos	16
Figura 5. Regulação do metabolismo mineral por proteínas osteocíticas	17
Figura 6. Fluxograma de pacientes do estudo.....	26
Figura 7. Evolução do tipo de osteodistrofia renal após a paratireoidectomia (PTX).....	39
Figura 8. Classificação da osteodistrofia renal antes e após a PTX.....	40
Figura 9. Expressão da esclerostina antes e após a paratireoidectomia (PTX).....	42
Figura 10. Expressão da OPG antes e após da paratireoidectomia (PTX).....	43
Figura 11. Razão RANKL/OPG antes e após a paratireoidectomia (PTX).....	44
Figura 12. Expressão das proteínas: (A) DMP-1; (B) MEPE; (C) FGF23; (D) RANKL	45
Figura 13. Correlação entre a variação na expressão do DMP-1 e mudanças na FA (A) e expressão da OPG (B)	46
Figura 14. Correlação entre a variação na expressão do MEPE e mudança na superfície mineralizante (MS/BS) (A) e expressão do RANKL (B).....	47
Figura 15. Correlação entre a variação na expressão da esclerostina e mudanças nos parâmetros estruturais (A) e de formação óssea (B) da histomorfometria	48
Figura 16. Correlação entre a variação na expressão da OPG e mudança na superfície osteóide (OS/BS)	49

Figura 17. Correlação entre a variação na expressão do RANKL e mudanças nos parâmetros estruturais da histomorfometria óssea 50

Figura 18. Correlação entre a variação na razão RANKL/OPG e mudança na superfície osteoblástica (Ob.S/BS) 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos e diluições utilizadas para reação de imunohistoquímica	32
Tabela 2. Características clínico-laboratoriais dos pacientes antes e depois da PTX	36
Tabela 3. Análise dos parâmetros histomorfométricos das biópsias ósseas antes e depois da PTX.....	38
Tabela 4. Diferenças encontradas entre pacientes com Doença Óssea Adinâmica e Histologia óssea normal após a PTX	41
Tabela 5. Análise da expressão das proteínas DMP-1, MEPE, esclerostina, FGF23, OPG e RANKL e a relação RANKL/OPG antes e depois da PTX	41
Tabela 6. Análise da expressão das proteínas DMP-1, MEPE, esclerostina, FGF23, OPG e RANKL, dividindo os pacientes em grupos em função da presença ou não de defeito de mineralização, antes e depois da PTX	52

LISTA DE ABREVIATURAS

Aj.AR	Taxa de formação óssea corrigida
ASARM	<i>Acid serine aspartate-rich MEPE-associated motif</i>
BFR	Taxa de formação óssea
BFR/BS	Taxa de formação óssea/superfície óssea
BMP	Proteínas morfogenéticas do osso
BSP	<i>Bone Sialoprotein/Integrin-Binding Sialoprotein</i>
BV/TV	Volume ósseo/volume tissular
Ca	Cálcio
CKD-MBD	<i>Chronic Kidney Disease-Mineral Bone Disease</i>
DM	Doença Mista
DMP-1	<i>Dentin Matrix Protein 1</i>
DOA	Doença óssea adinâmica
DRC	Doença renal crônica
DSPP	<i>Dentin sialophosphoprotein</i>
ES/BS	Superfície de erosão/superfície óssea
et al.	e colaboradores
FA	Fosfatase alcalina
Fb.V/TV	Volume de fibrose/volume tissular
FGF23	Fator de crescimento de fibroblastos
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Fzd	<i>Frizzled</i>
HA	Hidroxiapatita
HD	Hemodiálise

HPTS	Hiperparatireoidismo secundário
Lrp5/6	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6</i>
MAR	Taxa de aposição mineral
MEPE	Fosfoglicoproteína de matriz extracelular
Mlt	Intervalo de tempo para mineralização
MS/BS	Superfície mineralizante
Na	Sódio
O.Th	Espessura osteóide
ObS/BS	Superfície osteoblástica/superfície óssea
OcS/BS	Superfície osteoclástica/superfície óssea
OF	Osteíte Fibrosa
OPG	Osteoprotegerina
OPN	<i>Osteopontin/Secreted Phosphoprotein-1</i>
OV/BV	Volume osteóide/volume ósseo
OS/BS	Superfície osteoide/ Superfície óssea
Ob.S/BS	Superfície osteoblástica/ Superfície óssea
P	Fósforo
PCR	Polimerase quantitativa em tempo real
PHEX	Endopeptidase Neutra reguladora de fosfato ligada ao cromossomo X
PPI	Pirofosfato
PTH	Paratormônio
PTH1R	Receptor de PTH
PTX	Paratireoidectomia
RANK	Fator nuclear Kappa β
RANKL	Fator nuclear Kappa β ligante

RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SIBLING	<i>Small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein</i>
SOST	Esclerostina proteína
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação das trabéculas
Tb.Th	Espessura trabecular
USP	Universidade de São Paulo
Wnt	<i>Wingless-int</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
±	mais ou menos
=	igual
<	menor
β	beta
°C	grau Celsius
Δ	delta
dL	decilitro
EUA	Estados Unidos da América
kDa	quilo dalton
Kg	quilograma
L	litro
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
N terminal	amino-terminal
p	coeficiente de significância estatística
pg	picograma
x	vezes
UA	unidade arbitrária
μm	micrômetro

RESUMO

Pires GO. *Efeitos da paratireoidectomia na biologia do tecido ósseo de pacientes com doença renal crônica e hiperparatireoidismo secundário* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

INTRODUÇÃO: O hiperparatireoidismo secundário (HPTS) é uma complicação da doença renal crônica que compromete a integridade do esqueleto. Pacientes com HPS submetidos à paratireoidectomia (PTX) passam de uma condição de níveis séricos de paratormônio (PTH) muito elevados para outra, onde esses níveis hormonais caem drasticamente. Os efeitos da PTX no tecido ósseo são mal compreendidos, especialmente no que se refere às proteínas expressas por osteócitos, como o fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF23), *dentin matrix protein 1* (DMP-1), fosfoglicoproteína de matriz extracelular (MEPE), esclerostina, Fator nuclear Kappa β ligante (RANKL) e osteoprotegerina (OPG), que regulam a remodelação e a mineralização óssea. **OBJETIVOS:** Caracterizar a expressão óssea dessas proteínas por imunohistoquímica e estabelecer relações com os dados da histomorfometria do tecido ósseo em pacientes com HPS, antes e após a PTX. **MÉTODOS:** Estudamos biópsias ósseas obtidas de um banco de biópsias de 23 pacientes com DRC e HPTS, que foram realizadas antes e 12 meses após a PTX. **RESULTADOS:** A avaliação dos parâmetros histomorfométricos demonstrou uma melhora da microarquitetura óssea, porém com um maior retardo em sua mineralização após a PTX. A análise da expressão das proteínas osteocíticas revelou um aumento significativo na expressão da esclerostina e da OPG e uma diminuição da relação RANKL/OPG após a PTX, sugerindo a participação dessas proteínas na melhora das lesões ósseas decorrentes do HPTS. Observamos um aumento significativo na expressão da OPG no grupo de pacientes que evoluiu com defeito de mineralização somente após a cirurgia, sugerindo a participação dessa proteína no retardo de mineralização óssea desses pacientes. A expressão das proteínas osteocíticas que participam da formação e mineralização óssea apresentou correlação com parâmetros envolvidos na remodelação óssea. **CONCLUSÕES:** Mudanças significativas na expressão óssea de proteínas osteocíticas que podem potencialmente regular a remodelação e a mineralização óssea foram observadas após a PTX.

Descritores: distúrbio do metabolismo mineral; insuficiência renal crônica; hiperparatireoidismo secundário; paratireoidectomia; FGF23; DMP-1; MEPE; esclerostina; RANKL; osteoprotegerina

SUMMARY

Pires GO. *Effects of parathyroidectomy on the biology of bone tissue in patients with chronic kidney disease and secondary hyperparathyroidism* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

INTRODUCTION: Secondary hyperparathyroidism (SHPT) is a complication of chronic kidney disease that compromises skeletal integrity. Patients with SHPT undergoing parathyroidectomy (PTX) go from a very high serum parathyroid hormone (PTH) condition to another, where these hormonal levels dramatically fall. The effects of PTX on bone tissue are poorly understood, especially as regards proteins expressed by osteocytes, such as fibroblast growth factor 23 (FGF23), dentin matrix protein 1 (DMP-1), extracellular matrix phosphoglycoprotein (MEPE), sclerostin, Kappa β ligand nuclear factor (RANKL) and osteoprotegerin (OPG), which regulate bone remodeling and mineralization. **OBJECTIVES:** Characterize bone expression of these proteins by immunohistochemistry and establish relations with bone tissue histomorphometry data in SHPT patients, before and after PTX. **METHODS:** We studied bone biopsies obtained from a biopsy database of 23 patients with CKD and SHPT, which were performed before PTX and 12 months after PTX. **RESULTS:** Evaluation of histomorphometric parameters showed improvement of bone microarchitecture, but with longer delay in mineralization after PTX. Analysis of osteocyte protein expression revealed significant increase in sclerostin and OPG expression and decrease in RANKL/OPG ratio after PTX, suggesting participation of these proteins in improvement of bone lesions due to SHPT. We observed significant increase in OPG expression in the group of patients who evolved with mineralization defect only after surgery, suggesting participation of this protein in bone mineralization delay of these patients. Expression of osteocyte proteins that participate in bone formation and mineralization correlated with parameters involved in bone remodeling. **CONCLUSIONS:** Significant changes in bone expression of osteocyte proteins that can potentially regulate bone remodeling and mineralization were observed after PTX.

Descriptors: chronic kidney disease-mineral and bone disorder; renal insufficiency, chronic; hyperparathyroidism secondary; parathyroidectomy; fibroblast growth factors 23; protein DMP-1; extracellular matrix phosphoglycoprotein; sclerostin; nuclear factor kappa beta ligand; osteoprotegerin

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Doença Renal Crônica (DRC) é um problema de saúde pública mundial com taxas de prevalência crescentes (1,2).

A DRC cursa com um amplo espectro de complicações, dentre elas, os distúrbios do metabolismo mineral e ósseo, que representam uma importante causa de morbidade e contribuem para piorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos. Esses distúrbios também se associam ao desenvolvimento de calcificações vasculares e aumento da mortalidade (3-6) e são detectados desde os estágios iniciais da DRC (7,8).

Anormalidades do cálcio (Ca), fósforo (P), paratormônio (PTH) e vitamina D contribuem para as alterações ósseas observadas nos pacientes com DRC. Estudos recentes revelaram que os osteócitos e proteínas produzidas por essas células participam dessas alterações (8-12).

1.1. Remodelação óssea e osteócitos

O tecido ósseo, embora pareça ser um órgão estático, é capaz de adaptar sua estrutura tridimensional e sua massa para suportar com mais eficiência a carga que lhe é imposta, sendo um tecido extremamente dinâmico (13).

A remodelação óssea consiste em um mecanismo de substituição e reconstrução do tecido ósseo. Nesse processo, atuam células de reabsorção

(os osteoclastos) e de formação (os osteoblastos) sob a regulação de diversos fatores locais e hormonais de modo a preservar a integridade do esqueleto.

Estudos mostram que os osteócitos desempenham um papel fundamental na regulação da remodelação óssea. Essas células são as mais abundantes do tecido ósseo, representando cerca de 95% do componente do osso adulto maduro (14-16).

Elas são derivadas dos osteoblastos. Estes por sua vez são células mesenquimais que se diferenciam de pré-osteoblastos a osteoblastos produtores de matriz osteóide. Finalizado o processo de formação e mineralização óssea, os osteoblastos se transformam em osteócitos que ficam aprisionados na matriz mineralizada e/ou *lining cells* que revestem a superfície óssea ou sofrem apoptose.

A transformação de osteoblastos produtores de matriz osteóide a osteócitos maduros requer uma reestruturação de seu citoesqueleto e de componentes celulares e esse processo é acompanhado da redução de seu volume em cerca de 70%, da perda de polarização da membrana plasmática apical e basolateral e da formação de processos dendríticos que fazem conexão dos osteócitos entre si e deles com vasos sanguíneos, osteoblastos, medula óssea e células da superfície óssea (17,18).

Os osteócitos geralmente tem uma forma estrelada. Seu corpo celular está contido em um espaço na matriz óssea chamado de lacuna, das quais partem em média 40 a 100 canalículos que abrigam os processos dendríticos. Esse sistema lacuno-canalicular (osteócitos e processos dendríticos) funciona

como uma rede sensorial que responde às influências mecânicas e hormonais impostas ao tecido ósseo (19) (Figura 1).

Figura 1. Osteócitos e o sistema lacuno canalicular. (A) Radiografia do fêmur de camundongo. (B) Fêmur de camundongo observado pela coloração Von Kossa e McNeal; tecido ósseo (detalhe em preto); medula óssea (detalhe em azul). (C) microscopia de campo claro mostrando os osteócitos e seus canalículos (em preto); as setas brancas indicam as lacunas osteocíticas. (D) micrografia eletrônica de varredura mostrando a organização celular dos osteócitos dentro do tecido ósseo com suas projeções atingindo outros osteócitos e células na medula óssea; as setas indicam as lacunas osteocíticas. Fonte: Adaptado de “Plotkin LI e Bellido T. Nat Rev Endocrinol. 2016” (20)

A rede lacuno-canalicular funciona como um sistema mecano-sensorial que converte a energia mecânica em sinais elétricos e bioquímicos, produzindo fatores que regulam tanto a reabsorção quanto a formação óssea (21).

De particular importância na avaliação da função mecano-sensorial dos osteócitos é a resposta dessas células a microlesões (21). Nas regiões de microlesão ocorre apoptose dessas células, desencadeando remodelação e reparo do tecido (22,23).

1.2. Proteínas produzidas pelos osteócitos

Os osteócitos regulam a deposição mineral na matriz óssea além de produzir fatores que interferem em processos químicos locais e em órgãos distantes, atuando como órgão endócrino. Eles expressam diversas proteínas que podem ser divididas de acordo com sua principal função em:

- Esclerostina, Fator nuclear Kappa β ligante (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) são proteínas que participam do controle da formação e reabsorção óssea;

- O grupo de proteínas relacionadas ao metabolismo do P e mineralização óssea inclui Fosfoglicoproteína de matriz extracelular (MEPE), *Dentin matrix protein 1* (DMP-1), Endopeptidase neutra reguladora de fosfato ligada ao cromossomo X (PHEX) e Fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF23).

A seguir descreveremos as principais funções de cada uma dessas proteínas.

1.2.1. Esclerostina

A esclerostina é uma proteína codificada pelo gene SOST, sendo altamente expressa pelos osteócitos e sua atuação vem sendo estudada na osteodistrofia renal (24).

A esclerostina reduz a proliferação e aumenta a apoptose dos osteoblastos, reduzindo a formação óssea (25). Ela é um potente antagonista da via de sinalização Wnt, vital para o desenvolvimento e renovação de vários

tecidos, entre eles o ósseo (26,27). Essa via é constituída por uma rede de proteínas que se ligam ao receptor *Frizzled* da família das proteínas G, e pelo correceptor *low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6* (LRP5/6). Após a ativação do receptor, uma cascata de eventos intracelulares estabiliza a β -catenina que se transloca para o núcleo, induzindo a transcrição e modulando a expressão de genes que codificam proteínas relacionadas com a diferenciação, ativação e recrutamento de osteoblastos. A esclerostina se liga ao correceptor LRP 5/6 impedindo a sinalização Wnt canônica (28) (Figura 2).

Além desse efeito, a esclerostina também antagoniza as ações de vários membros da família de proteínas morfogenéticas do osso (BMPs). Tanto as BMPs quanto a via Wnt são críticas para a osteoblastogênese, pois desencadeiam estímulos iniciais para progenitores multipotentes da linhagem osteoblástica (29,30).

Figura 2. Ação inibitória da esclerostina na via de sinalização Wnt e BMP
 Fonte: Adaptado de “Choi Y. et al. Nat Rev Rheumatol. 2009” (31)

Estudos mostraram que a inibição da expressão da SOST se associa com o desenvolvimento da esclerostose, uma doença rara caracterizada por aumento de massa óssea e a Doença de Van Bunchen cujo fenótipo inclui deformidades em crânio e ossos longos. Camundongos *knock-out* para SOST desenvolvem, assim como os humanos, um fenótipo associado a um aumento de massa óssea. Além disso, já se comprovou que a administração de anticorpos anti-esclerostina aumenta a massa óssea (32). Por outro lado, camundongos transgênicos que superexpressam SOST diminuem a massa óssea (26). Ensaios clínicos estão em andamento usando o anticorpo anti-esclerostina no tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa (33-35).

Cejka et al. identificaram uma correlação negativa entre a esclerostina e parâmetros histomorfométricos de avaliação da formação óssea: a taxa de formação ou frequência de ativação e a superfície osteoblástica (36).

Essas observações demonstram que essa proteína produzida principalmente pelos osteócitos exerce um *feedback* negativo na diferenciação osteoblástica e no processo de formação óssea.

1.2.2. RANK-RANKL-OPG

A identificação da interação RANK-RANKL-OPG representou um importante avanço para a compreensão da osteoclastogênese no processo de remodelação óssea (37).

Sabe-se que o RANKL, membro da família do Fator de Necrose Tumoral (TNF), é uma proteína que se expressa nos pré-osteoblastos e se liga ao seu receptor RANK (Fator nuclear Kappa β), presente nos pré-osteoclastos (38).

Essa ligação desencadeia os mecanismos que promovem a diferenciação, proliferação, ativação e aumento da sobrevivência das células da linhagem osteoclástica, resultando em aumento dos osteoclastos ativos e na reabsorção óssea. A completa diferenciação dos osteoclastos requer a presença do RANKL pelas células osteoblásticas e de RANK pelos precursores osteoclásticos (38,39).

A OPG, membro da superfamília de receptores TNF inibe essa interação, ligando-se ao RANKL, regulando negativamente a

osteoclastogênese e resulta em uma diminuição da reabsorção óssea e aumento da densidade, área e força do tecido ósseo (39).

Estudos mais recentes demonstraram que são os osteócitos os principais produtores dessas proteínas, contrariamente ao que se acreditava, que eram os osteoblastos e/ou estroma da medula óssea.

A deleção do RANKL em camundongos geneticamente modificados resultou em osteopetrose, enquanto a deleção da OPG resultou em osteoporose severa de início precoce e uma alta incidência de fratura, além de calcificação vascular (40-44). Dessa forma, não é surpreendente que a administração terapêutica de OPG seja bem sucedida no tratamento de condições osteolíticas, suprimindo a reabsorção óssea.

Nesse sentido, as características dessas proteínas levaram ao desenvolvimento de um anticorpo monoclonal, o denosumab, que se comporta como a OPG e se liga ao RANKL, prevenindo a osteoclastogênese e reduzindo a reabsorção óssea. A terapia com Denosumab tem sido clinicamente bem sucedida no tratamento de algumas doenças como a osteoporose, artrite reumatóide e metástases ósseas (45).

Desequilíbrios no eixo RANK/RANKL/OPG determinam várias modificações tanto na remodelação óssea como na participação de doenças como artrite reumatóide, doenças periodontais, osteólise associada a tumor, osteoporose, osteopetrose, Doença de Paget (46-49) além de contribuir para o desenvolvimento da aterosclerose e calcificação vascular (50,51). Demonstrou-se que a razão RANKL/OPG é um índice que tem sido usado para avaliar a

remodelação óssea tanto em condições normais como em condições patológicas associadas ao aumento da reabsorção óssea (52).

Estudos in vivo e in vitro tem mostrado que RANK/RANKL/OPG, sendo mediadores de doenças ósseas, são importantes alvos moleculares para o diagnóstico e intervenção terapêutica (46).

A Figura 3 demonstra a participação das proteínas RANK/RANKL/OPG na remodelação óssea.

Figura 3. Sinalização RANK/RANKL/OPG e a remodelação óssea.
 Fonte: Adaptado de “Richards et al. Nature Reviews Genetics. 2012” (53)

1.2.3. MEPE

O colágeno secretado pelos osteoblastos na osteogênese é mineralizado de forma controlada. A matriz extracelular contém proteínas não-colágenas que desempenham papéis centrais na remodelação além de modular a mineralização dessa matriz e, em última análise, responder pela elasticidade e resistência do tecido ósseo (54,55).

Dentre as proteínas não colágenas, a família de proteínas SIBLING (*small integrin-binding ligand, N-linked glycoprotein*) desempenha inúmeras funções e compreende a *Dentin Sialophosphoprotein* (DSPP), DMP-1, MEPE, *Osteopontin/Secreted Phosphoprotein-1* (OPN) e *Bone Sialoprotein/Integrin-Binding Sialoprotein* (BSP). Todas essas proteínas compartilham o chamado peptídeo ASARM (*Acidic Serine-Aspartate Rich MEPE associated motif* - região rica em ácido serina aspartato associada ao MEPE) (56,57) que, uma vez liberado como um peptídeo fosforilado, atua como um potente inibidor da mineralização tanto nos ossos como nos dentes. Esse peptídeo também participa da regulação do P, vascularização, calcificação de tecidos moles, osteoclastogênese, mecanotransdução e metabolismo energético da gordura (58).

Dentre as proteínas SIBLING, o MEPE é uma proteína glicosilada, que foi originalmente clonada de tumores de pacientes com osteomalácia hipofosfatêmica oncogênica. Essa proteína se expressa principalmente nos osteócitos maduros e osteoblastos inibindo a formação óssea (59,60).

A degradação enzimática do MEPE libera o peptídeo ASARM, bloqueando a mineralização *in vitro* e *in vivo*, ao se ligar aos cristais de hidroxiapatita (HA) (58,61). A inativação do MEPE se associa com um fenótipo de aumento de massa óssea devido ao aumento na formação sem interferir na reabsorção óssea (60,62,63).

1.2.4. DMP-1

A DMP-1 é uma proteína ácida não colágena, expressa nas fases iniciais da mineralização óssea e da dentina e, assim como o MEPE, pertence à família de proteínas SIBLING.

A DMP-1 possui múltiplas funções, atuando tanto como uma molécula de sinalização quanto como um regulador da mineralização. Estudos *in vitro* demonstraram que, enquanto o fragmento carboxilo-terminal (C-terminal) promove a mineralização, atuando como um promotor da formação de HA que liga grandes quantidades de cálcio, a molécula de DMP-1 de comprimento total pode inibir a formação da mesma (64-67). Assim, alterações na clivagem dessa proteína podem modificar significativamente a função da mesma.

Nos osteoblastos indiferenciados o DMP-1 é principalmente uma proteína nuclear que regula a expressão de genes específicos dessas células. Durante o processo de maturação dos osteoblastos, a proteína é fosforilada e exportada para a matriz extracelular, onde orchestra a mineralização.

Também se expressa nos canalículos dos osteócitos, onde aparentemente regula a formação de HA (68-70). Dependendo do estado de

fosforilação e do processamento proteolítico, a DMP-1 regula os processos de mineralização locais que ocorrem dentro das lacunas e canalículos de osteócitos no osso maduro (71).

A DMP-1 também atua na degradação do FGF23 e, portanto, está envolvida na homeostase do P. Mutações do gene DMP-1 estão relacionadas ao raquitismo hipofosfatêmico autossômico recessivo, uma doença com fenótipo de raquitismo e/ou osteomalácia.

1.2.5. PHEX

Em 1995, investigadores isolaram o gene PHEX, regulador do P, com homologia a endopeptidases, localizado no cromossomo X.

A família de metaloproteases de zinco, com a qual PHEX tem homologia, caracteriza-se por apresentar uma curta cauda amino-terminal (N-terminal), um único domínio transmembrana e uma região C-terminal mais longa, que contém o domínio catalítico e uma região ligadora de zinco (72).

Endopeptidases neutras clivam proteínas para torná-las ativas ou inativas. A homologia com as endopeptidases sugere que PHEX altere a função de uma proteína que regula o transporte de P.

Mutações desse gene resultam em uma doença denominada raquitismo hipofosfatêmico ligado ao cromossomo X, a forma mais comum de raquitismo hereditário, com uma incidência estimada de 1:20.000 indivíduos (73). Essa doença é acompanhada de hipofosfatemia e aumento dos níveis séricos de

FGF23. Representa também a etiologia mais frequente dentre as doenças hereditárias que cursam com hiperfosfatúria (74). PHEX regula direta ou indiretamente a expressão ou estabilidade do FGF23, pois sua inativação leva ao aumento da expressão do FGF23 (75). Quando PHEX não inativa o FGF23, que é produzido principalmente pelos osteócitos e osteoblastos, ocorre fosfatúria e comprometimento da mineralização óssea. PHEX também se liga ao MEPE e à região ASARM (59,76,77).

1.2.6. FGF23

O FGF23 é uma proteína da família dos fatores de crescimento dos fibroblastos, secretado principalmente pelos osteoblastos e osteócitos (78).

Essa proteína é considerada uma fosfatonina e inibe a reabsorção tubular de P além de reduzir os níveis séricos de 1,25-di-hidroxivitamina D (calcitriol), protegendo o organismo contra a retenção de P e o excesso de calcitriol (79). O FGF23 executa estas ações inibindo os cotransportadores Na/P tipo II (Na/P 2a e Na/P 2c) localizados na membrana apical do túbulo contorcido proximal e a enzima 1 α -hidroxilase, diminuindo a síntese de calcitriol. O FGF23 atua também nas células paratireoideanas, inibindo a produção de PTH (80).

Doenças que cursam com aumento de FGF23 se caracterizam por hipofosfatemia, diminuição da produção de calcitriol e osteomalácia. Por outro lado, níveis baixos de FGF23 se acompanham de hiperfosfatemia, aumento da produção de calcitriol, calcificação de tecidos moles e hiperostose (81).

Há cada vez mais evidências relacionando o FGF23 à biologia óssea. Este hormônio atua no transporte renal de P agindo na remodelação e mineralização óssea o que influencia tanto o influxo quanto o efluxo de Ca e P nos ossos. Estudos sugerem que o FGF23 possa atuar diretamente sobre o osso através de uma inibição da diferenciação dos osteoblastos e da mineralização da matriz óssea (82-85).

Outras proteínas como o PHEX, DMP-1 e MEPE também regulam o FGF23 assim como fatores sistêmicos (81, 82, 86-88). A interação entre esses fatores pode ser demonstrada no caso de deficiência de DMP-1, onde a mineralização da matriz encontra-se prejudicada (9). Osteócitos nesta situação aumentam a expressão de FGF23, o que resulta em uma maior excreção de P pelos rins, coincidindo com a diminuição da mineralização óssea. Dessa forma, é possível pressupor que os osteócitos são capazes de coordenar a formação óssea, mediada pelos osteoblastos e com a participação do P através da regulação da expressão de FGF23, esclerostina e outros fatores (88) (Figura 4).

Figura 4. A produção de FGF23 pelos osteócitos é regulada por fatores locais e sistêmicos. Fonte: Adaptado de “Sapir-Koren R et al. Bio Factors, 2014” (88)

1.3. Osteócitos e mineralização

A mineralização é o processo pelo qual o cristal de HA é depositado na matriz extracelular. Quando ela ocorre em tecido como o osso, placa de crescimento da cartilagem ou na dentina, chamamos de mineralização fisiológica. Se ocorre em outros tecidos, chamamos de mineralização patológica (89). Ambas compartilham mecanismos semelhantes. No tecido ósseo, esse processo é comandado pelos osteócitos.

A formação da HA dentro das chamadas vesículas da matriz é a etapa inicial da mineralização (90) e envolve a incorporação de íons Ca e P através de proteínas ligadoras desses minerais, co-transportadores, anexinas e fosfatases. Essa etapa é seguida da extrusão da HA através da membrana da vesícula e se deposita na matriz extracelular (91). Esse processo é coordenado

por diversas moléculas que atuam localmente nas células ósseas ou em órgãos distantes como os rins.

Além das proteínas sintetizadas principalmente pelos osteócitos, outras, como por exemplo, a Fetuína-A, também participam da mineralização, nesse caso como um importante inibidor do processo. Uma complexa interação entre essas proteínas envolve mecanismos de *feedback* positivo e negativo. Como são produzidas pelo mesmo tipo de célula, o osteócito, essas proteínas atuam através de sistemas autócrinos/parácrinos que controlam sua expressão e atividade. No entanto, os mecanismos pelos quais essas proteínas são reguladas não são totalmente compreendidos (92).

Belido et al. sugerem uma provável sequência desses eventos que está descrita na Figura 5 (20). Através de mecanismos diretos ou indiretos, enquanto PHEX e DMP-1 promovem a mineralização, MEPE, FGF23 e Fetuína-A inibem esse processo.

Figura 5. Regulação do metabolismo mineral por proteínas osteocíticas
 Fonte: Adaptado de “Plotkin L.I. e Bellido T. Nat Rev Endocrinol, 2016” (20)

1.4. PTH e as proteínas osteocíticas

O PTH estimula tanto a formação quanto a reabsorção óssea e os mecanismos envolvidos são múltiplos. Assim como a estimulação de células osteoprogenitoras, osteoblastos, a sinalização Wnt/ β -catenina, a mobilização de células-tronco, entre outros sítios de ação, os osteócitos são células alvo cruciais para as ações esqueléticas do PTH (93).

Dentre vários fatores locais e hormonais, o PTH tem sido implicado como regulador da expressão e liberação de algumas das proteínas osteocíticas citadas neste trabalho.

Kramer et al. estudaram o impacto do PTH na regulação da esclerostina e mostraram que o PTH inibe diretamente a transcrição da SOST tanto *in vivo* como *in vitro*, diminuindo sua expressão, sugerindo que a regulação da SOST desempenha um papel na mediação dos efeitos do PTH no tecido ósseo (94). Da mesma forma, os níveis séricos de esclerostina em mulheres saudáveis são inversamente correlacionados aos níveis séricos de PTH, enquanto as mulheres pós-menopáusicas tratadas com teriparatide (uma forma recombinante do hormônio da paratireóide, usado no tratamento da osteoporose) também demonstram níveis reduzidos de esclerostina sérica (95,96). Consistente com esses resultados, Yu et al. também demonstraram em uma coorte de 53 homens adultos saudáveis que a infusão de PTH 1-34 levou a uma redução nos níveis circulantes de esclerostina (97). Coletivamente, os dados da literatura em modelos clínicos e experimentais

confirmam uma relação inversa consistente entre os níveis de PTH e da esclerostina.

Quanto ao FGF23, a literatura mostra considerações relevantes que sugerem que a transcrição do gene FGF23 é modulada, entre outros fatores, pelo PTH. Rhee et al. apresentaram evidências demonstrando que a produção de FGF23 é aumentada pela ação direta do PTH em osteócitos tanto *in vivo*, em camundongos transgênicos que aumentam a expressão do receptor de PTH (PTH1R), quanto *in vitro*, em culturas contendo osteócitos tratados com ligantes do PTH1R. Os autores concluíram que a regulação do FGF23 nos osteócitos representa um mecanismo potencial pelo qual a sinalização através do receptor de PTH influencia as ações sistêmicas e locais do FGF23 (98). López et al. utilizaram uma abordagem diferente para testar os efeitos do PTH sobre a expressão do FGF23, usando um modelo de ratos paratireoidectomizados. Nesse experimento, a PTX resultou em uma redução significativa nos níveis circulantes de FGF23 e calcitriol e uma acentuada hiperfosfatemia. Esta situação, porém, foi revertida com a reposição de PTH de uma maneira dependente da dose. Os autores constataram que a ausência de PTH circulante em ratos paratireoidectomizados, causa uma diminuição do número ou atividade das células envolvidas na secreção de FGF23. Resumindo, o PTH é necessário para manter os níveis normais de FGF23 circulantes (99).

No que se refere ao DMP-1, trabalhos prévios tem demonstrado uma relação negativa entre essa proteína e o PTH. Em um estudo realizado por Wang et al., os cementoblastos de camundongos, que são células presentes

no ligamento periodontal semelhantes aos osteoblastos e conhecidos por expressar DMP-1, foram tratados com PTH recombinante. A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (PCR) e o *Western blot* revelaram que o PTH diminuiu a transcrição do gene DMP-1 (85%) e a expressão dessa proteína (30%), respectivamente. A imunohistoquímica confirmou a diminuição do DMP-1 *in vivo* no cemento celular e osso alveolar desses animais (100). Em conformidade com esses achados, Bellido et al., estudando osteócitos de camundongos regulados pela administração crônica ou intermitente de PTH, demonstraram que o PTH reduziu a expressão de DMP-1 nessas células (101).

Em relação ao MEPE, Jain et al. observaram que os níveis séricos de MEPE se correlacionaram negativamente com os do PTH em indivíduos saudáveis (102). Esses resultados são consistentes com o fato do MEPE estar envolvido no metabolismo do P e no tecido ósseo desses indivíduos.

O PTH também influencia a expressão do RANKL e da OPG. Para investigar a base molecular do efeito catabólico do PTH *in vivo*, Yanfei et al. examinaram o papel de OPG e do RANKL na reabsorção óssea induzida pela infusão contínua de PTH recombinante em ratos paratireoidectomizados. Os autores observaram que a infusão de PTH induziu a um aumento rápido e sustentado no RNAm do RANKL e diminuiu tanto o RNAm da OPG como a proteína nos osteoblastos. Essas alterações foram dependentes da dose e do tempo de infusão e precederam picos máximos de reabsorção óssea (103). Achados semelhantes foram relatados em vários estudos *in vitro* (104-106). Como tal, os estudos em humanos também confirmam os efeitos da exposição do PTH nos níveis séricos dessas proteínas, com esses marcadores

correlacionados com perda óssea femoral e aumento dos marcadores de reabsorção óssea em pacientes com hiperparatireoidismo primário, demonstrando um aumento do RANKL sérico e da razão RANKL/OPG (107,108). Tomados em conjunto, esses achados demonstram que o PTH estimula a expressão do RANKL e diminui a da OPG, o que leva à regulação da osteoclastogênese (109).

O paciente com DRC e HPTS, submetido a PTX, passa de uma situação de PTH elevado a controlado. Pouco se conhece sobre o efeito dessa mudança na expressão dessas proteínas e de suas implicações na remodelação e mineralização óssea.

As proteínas descritas anteriormente, bem como o padrão de expressão nas biópsias ósseas de pacientes com HPTS, antes e após a PTX, devem ainda ser avaliadas.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Caracterizar a expressão óssea da esclerostina, MEPE, DMP-1, RANKL, OPG e FGF23 por imunohistoquímica e estabelecer relações com os dados da histomorfometria do tecido ósseo em pacientes com hiperparatireoidismo secundário, antes e após a paratireoidectomia.

3. MÉTODOS

3. MÉTODOS

Estudamos biópsias ósseas obtidas do banco de biópsias do Laboratório de Fisiopatologia Renal (LIM 16) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e do Laboratório de Doenças Ósseas da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) realizadas de 1985 até a presente data.

3.1. Seleção das biópsias

Foram incluídas biópsias de pacientes com DRC e HPTS, antes e depois da PTX (N=25). Esses pacientes participaram de outros protocolos, já finalizados, para os quais foram obtidos consentimento livre e informado (110). As biópsias foram realizadas antes e 12 meses após a PTX.

Os pacientes tinham idade superior ou igual a 16 anos, estavam em tratamento com hemodiálise há pelo menos 3 meses e tinham quadro clínico (dores ósseas, musculares, articulares, deformidades ósseas, sendo que alguns tinham fraturas) e laboratorial (PTH superior a 400 pg/mL) de HPTS.

Os exames laboratoriais aqui descritos foram os analisados nos protocolos já finalizados:

- Cálcio total (Ca): Método: colorimétrico / Valor de referência: 8,8-10,6 mg/dL;
- Fósforo (P): Método: colorimétrico automatizado / Valor de referência: 2,7-4,5 mg/dL;

- Fosfatase alcalina total (FA): Método: cinético automatizado / Valor de referência: 35-104 U/L;
- PTH-intacto (IMMUNOLITE): Método: imunofluorimétrico – Delfia, USA / Valor de referência: 10 a 65 pg/mL.

Excluímos dois pacientes devido à qualidade das biópsias ósseas. Nas biópsias incluídas não detectamos depósitos de alumínio.

Figura 6. Fluxograma de pacientes do estudo

3.2. Biópsia óssea

A biópsia óssea transilíaca foi realizada no Hospital Dia do Hospital das Clínicas da FMUSP e do Hospital do Rim e Hipertensão, ligado à UNIFESP, sob anestesia local e sedação do paciente com midazolan, na dose de 5 a 15 mg, por via intra muscular. Os pacientes receberam previamente 2 cursos de tetraciclina, na dose de 500 mg a cada 12 horas por 3 dias, separados por 10 dias livres de medicamento - a biópsia foi realizada de 2 a 5 dias após o término do antibiótico. O fragmento ósseo foi incluído, sem descalcificação, em metil-metacrilato (111).

3.3. Histomorfometria

A análise histomorfométrica foi realizada empregando-se o sistema semi-automático de análise de imagens e o *software* de leitura *OsteomeasureTM* (Osteometrics, Inc. Atlanta, GA, EUA). Os parâmetros histomorfométricos estudados foram divididos em estáticos e dinâmicos, sendo os últimos analisados pela marcação com tetraciclina. As denominações dos parâmetros, assim como suas abreviaturas, seguem os propostos pela *American Society for Bone and Mineral Research* (112). Os valores de referência utilizados para os parâmetros estáticos foram os de controles normais locais (113), enquanto que os dinâmicos seguiram os descritos na literatura (114).

3.3.1. Parâmetros estáticos

- **Volume ósseo (BV/TV, %):** é o volume ocupado pelo osso trabecular mineralizado e não-mineralizado, expresso como porcentagem do volume ocupado pela medula óssea e trabéculas. Valor de referência: $21,8 \pm 7,2$ (mulheres); $24 \pm 6,1$ (homens).

- **Espessura trabecular (Tb.Th, μm):** representa a média da espessura das trabéculas. Valor de referência: $126 \pm 28,8$ (mulheres); $127,9 \pm 29,7$ (homens).

- **Separação trabecular (Tb.Sp, μm):** representa a média da distância entre as trabéculas. Valor de referência: $498,3 \pm 195,9$ (mulheres); $420,6 \pm 124,1$ (homens).

- **Número de trabéculas (Tb.N, /mm):** representa a média numérica do número de trabéculas por milímetro. Valor de referência: $1,76 \pm 0,52$ (mulheres); $1,89 \pm 0,42$ (homens).

- **Volume osteóide (OV/BV, %):** é o volume ocupado por osso não-mineralizado, expresso como porcentagem do volume ocupado pelo osso trabecular (mineralizado e não-mineralizado). Valor de referência: $1,55 \pm 1,9$ (mulheres); $2,9 \pm 2,7$ (homens).

- **Espessura osteóide (O.Th, μm):** é a espessura do rebordo da matriz osteóide, expressa em micra. Valor de referência: $10,8 \pm 3,2$ (mulheres); $11,7 \pm 3,5$ (homens).

- **Superfície osteóide (OS/BS, %):** é a porcentagem da superfície trabecular recoberta por matriz osteóide. Valor de referência: $9,2 \pm 8,4$ (mulheres); $16,1 \pm 12,6$ (homens).

- **Superfície reabsorvida (ES/BS, %):** é a porcentagem da superfície trabecular que apresenta lacunas de reabsorção óssea com a presença ou não de osteoclastos. Valor de referência: $2,3 \pm 2,4$ (mulheres); $1,75 \pm 1,21$ (homens).

- **Superfície osteoblástica (Ob.S/BS, %):** é a porcentagem da superfície trabecular que apresenta osteoblasto. Valor de referência: $1,2 \pm 3,2$ (mulheres); $1,2 \pm 1,4$ (homens).

- **Superfície osteoclástica (Oc.S/BS, %):** define-se da mesma forma que a superfície osteoblástica, aplicando-a aos osteoclastos. Valor de referência: $0,03 \pm 0,06$ (mulheres); $0,03 \pm 0,11$ (homens).

- **Volume de fibrose (Fb.V/TV, %):** é o volume ocupado por tecido medular que apresenta fibrose, expresso como porcentagem do volume total do espaço trabecular (trabéculas + medula óssea). Valor de referência: 0.

3.3.2. Parâmetros dinâmicos

- **Superfície mineralizante (MS/BS, %):** é a porcentagem da superfície trabecular que apresenta dupla marcação pela tetraciclina. Valor de referência: 12 ± 5 (mulheres); 18 ± 8 (homens).

- **Taxa de aposição mineral (MAR, $\mu\text{m}/\text{dia}$):** é a espessura do novo osso mineralizado depositado na unidade de tempo, expresso em micras por dia. Valor de referência: $0,65 \pm 0,12$.

- **Taxa de formação óssea (BFR/BS, $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$):** é o volume de osso novo, mineralizado, formado por unidade de superfície trabecular e por unidade de tempo. Valor de referência: $0,07 \pm 0,03$ (mulheres); $0,13 \pm 0,07$ (homens).

- **Taxa de formação óssea corrigida (Aj.AR, $\mu\text{m}/\text{dia}$):** é o volume de osso novo, mineralizado, formado por unidade de área de superfície osteóide e por unidade de tempo. Valor de referência: $0,5 \pm 0,2$.

- **Intervalo de tempo de mineralização (Mlt, dias):** é o intervalo de tempo entre deposição e a mineralização da matriz osteóide. Valor de referência: $23,7 \pm 2,7$ (mulheres); $21,3 \pm 2,3$ (homens).

A análise histomorfométrica das biópsias resultou no diagnóstico do tipo de remodelação (baixa e alta) bem como da mineralização óssea (normal e anormal). A classificação da Osteodistrofia Renal foi baseada nos quatro tipos classicamente descritos, de acordo com os seguintes critérios histomorfométricos: (1) Osteíte Fibrosa, definida como BFR/BS, assim como Ob.S/BS e/ou Oc.S/BS, acima de 1 desvio-padrão dos valores de referência, OV/BV dentro ou acima do normal e fibrose medular maior que 0,5%; (2) Doença Óssea Adinâmica, definida como BFR/BS e OV/BV abaixo de 1 desvio padrão dos valores de referência e fibrose medular menor que 0,5%; (3) Osteomalácia, definida como BFR/BS abaixo de 1 desvio padrão dos valores de referência e OV/BV acima de 1 desvio padrão dos valores de referência; e (4) Doença Óssea Mista, definida como BFR/BS e OV/BV acima de 1 desvio

padrão dos valores de referência, Mlt igual ou maior que 50 dias e fibrose medular maior que 0,5% (115).

A presença de osteoporose ficou estabelecida quando o BV/TV apresentar um desvio padrão abaixo dos valores de referência.

3.3.3. Quantificação dos osteócitos

Todos os osteócitos presentes no osso trabecular foram quantificados e os valores obtidos foram expressos como (1) osteócito total (Ost total, n); (2) osteócito total em relação à área de osso trabecular analisado (Ost total/B.Ar, n/mm^2); e (3) osteócito total em relação à área de tecido analisada, que inclui osso trabecular e medula óssea (Ost total/T.Ar, n/mm^2).

3.4. Imunohistoquímica

A técnica para a detecção imunohistoquímica das proteínas ósseas foi adaptado de um método previamente descrito (116). Cortes histológicos de 5 μm foram submetidos à remoção do metacrilato com uma mistura de 50% de xilol e 50% de clorofórmio por 30 minutos. Em seguida as amostras foram rehidratadas com álcool em concentrações decrescentes (100%, 96%, 70% e 50%) por 20 segundos cada, submetidas a uma semidescalcificação com ácido acético a 1%, por 10 minutos, sob agitação. Posteriormente, o tecido foi tratado com *Tween* a 0,1% em tampão fosfato salina (PBS) por 30 minutos, seguido de peróxido de hidrogênio a 3% em álcool metílico para bloqueio da peroxidase endógena.

Para a realização da imunohistoquímica utilizamos o método de imunoperoxidase com o kit Vectastain ABC-HRP - complexo Avidina/Biotina *horseradish-peroxidase* (Vector, Burlingame, CA, EUA). Após o bloqueio da peroxidase endógena, a avidina e biotina endógena foram bloqueadas com o kit de bloqueio avidina/biotina (Vector, Burlingame, CA). Terminada esta etapa, os cortes foram submetidos à incubação (*overnight*, 4°C) com os anticorpos primários e secundários descritos na tabela 1.

Tabela 1. Anticorpos e diluições utilizadas para reação de imunohistoquímica

Anticorpo primário (diluição)	Anticorpo secundário (diluição)
Anti DMP-1 humana, produzida em coelho (Takara) (1:200)	Anti-coelho biotinilado (1:1000)
Anti Esclerostina humana, produzida em camundongo (R&D systems) (1:100)	Anti-camundongo biotinilado (1:200)
Anti MEPE humana, produzida em cabra (R&D systems) (1:200)	Anti-cabra biotinilado (1:1000)
Anti FGF23 humana, produzida em camundongo (gentilmente cedido pela Genzyme) (1:200)	Anti-camundongo biotinilado (1:200)
Anti RANKL humana, produzida em cabra (Santa Cruz Biotechnology) (1:80)	Anti-cabra biotinilado (1:1000)
Anti OPG humana, produzida em cabra (Santa Cruz Biotechnology) (1:80)	Anti-cabra biotinilado (1:1000)

Após a incubação com os anticorpos e complexo ABC, o substrato cromogênico utilizado para revelação foi o AEC (*3-amino-9 ethyl-carbazol*) por

aproximadamente 15-20 minutos. Os cortes foram contracolorados com solução do hemalumbre de Mayer. Controles negativos simultâneos foram realizados em cada experimento, omitindo-se o anticorpo primário.

A expressão da esclerostina, FGF23, OPG e RANKL foi analisada em microscópio Nikon Eclipse 50i, em aumento de 400x. Para quantificar a expressão dessas proteínas, avaliamos os osteócitos corados em relação aos osteócitos totais ($\text{Ost}^+ / \text{Ost total} \times 100, \%$), sendo os valores expressos em porcentagem. Para complementar a análise, esses valores também foram corrigidos em relação à área de osso trabecular analisado ($\text{Ost/Ost total} \times 100/\text{B.Ar}$) e em relação ao tecido analisado ($\text{Ost/Ost total} \times 100/\text{T.Ar}$). Já a expressão do MEPE e DMP-1 foi quantificada utilizando-se o programa Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics®) no tecido ósseo trabecular. Os valores do MEPE e DMP-1 foram expressos em porcentagem (área positiva / área total $\times 100$).

3.5. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão, ou mediana e valores mínimos e máximos, para variáveis com distribuição paramétrica (normal) ou não-paramétrica, respectivamente. O tipo de distribuição foi avaliado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Os parâmetros bioquímicos, histomorfométricos e imunohistoquímicos foram comparados utilizando o teste t de Student pareado ou teste de Wilcoxon, quando apropriado.

Para avaliar a correlação de parâmetros foi utilizado o teste de significância para o coeficiente de correlação de Spearman.

A análise estatística foi realizada nos programas *GraphPad Prism 5.0* e *SPSS for Windows 17.0*. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação clínica e laboratorial

As características clínicas e laboratoriais dos pacientes estão descritas na Tabela 2. Os pacientes eram relativamente jovens, com uma média de idade de 42 anos; 43% eram homens; o tempo médio de hemodiálise foi de 97 meses. Quanto aos parâmetros bioquímicos, os níveis de Ca total, P, FA e PTH apresentaram uma queda significativa após a PTX.

Tabela 2. Características clínico-laboratoriais dos pacientes antes e depois da PTX

	Pré PTX (N=23)	Pós PTX (N=23)	p	Valores de referência
Idade, anos	41,91 ± 12,5	-	-	-
Sexo masculino, %	43,4	-	-	-
Tempo de hemodiálise, meses	96,96 ± 45,54	-	-	-
Cálcio total, mg/dl	10,18 ± 0,89	9,43 ± 1,06	0,0214	8,8-10,6
Fósforo, mg/dl	6,83 ± 2,01	5,33 ± 1,62	0,0022	2,7-4,5
Fosfatase alcalina, U/L	676 (177-2587)	109 (49-233)	<0,0001	35-104
PTH-intacto, pg/ml	1960 (597-3587)	58 (1-303)	<0,0001	10 a 65

Valores expressos como média e desvio padrão ou mediana e extremos e porcentagem;
PTX: paratireoidectomia; PTH: paratormônio.

4.2. Avaliação histomorfométrica

A Tabela 3 descreve os resultados da análise histomorfométrica das biopsias ósseas antes e depois da PTX.

Detectamos que antes da PTX, 52% dos pacientes (N=12) apresentavam osteoporose, nos quais observamos uma redução significativa do volume trabecular (BV/TV), da espessura (Tb.Th) e do número de trabéculas (Tb.N). Nesse grupo, observamos que o aumento da expressão do RANKL ($p=0,059$) ficou próximo da significância estatística quando comparado aos pacientes sem osteoporose.

Após a PTX, houve melhora do BV/TV, porém sem significância estatística; 39% desses pacientes (N=9) permaneceram osteoporóticos; já a Tb.Sp e a Tb.Th aumentaram significativamente. A melhora da Tb.Th provavelmente se deu à custa da maior mineralização da matriz osteóide.

Além da O.Th, houve diminuição significativa da Ob.S/BS, ES/BS, Oc.S/BS e Fb.V/TV, revelando melhora das lesões ósseas decorrentes do HPTS.

Tabela 3. Análise dos parâmetros histomorfométricos das biópsias ósseas antes e depois da PTX

	Pré PTX (N=23)	Pós PTX (N=23)	p	Valores de Referência Homem Mulher	
Parâmetros estruturais					
Volume ósseo (BV/TV, %)	14,9 (6,91-53,4)	19,6 (2,9-43,17)	0,38	24,0±6,1	21,8±7,2
Espessura trabecular (Tb.Th, <i>µm</i>)	111,8 ± 25,27	142,2 ± 34,8	0,0001	127,9±29,7	126,0±28,8
Separação trabecular (Tb.Sp, <i>µm</i>)	658,2 (86,39-1299)	585,5 (131-3627)	0,0275	420,6±124,1	498,3±195,9
Número de trabéculas (Tb.N, /mm)	1,3 (0,68-5,39)	1,4 (0,3-4,3)	0,0085	1,89±0,42	1,76±0,52
Parâmetros de formação					
Volume de osteóide (OV/BV, %)	10,6 (1,74-32,4)	4,5 (0,17-17,76)	0,0002	2,9±2,7	1,55±1,9
Espessura de osteóide (O.Th, <i>µm</i>)	11,8 ± 3,06	7,8 ± 2,17	< 0,0001	11,7±3,5	10,8±3,2
Superfície de osteóide (OS/BS, %)	52,5 ± 16,41	38,8 ± 24,96	0,0119	16,1±12,6	9,2±8,4
Superfície osteoblástica (Ob.S/BS, %)	13,4 (4,46-44,1)	1,5 (0-8,9)	< 0,0001	1,2±1,4	1,2±3,2
Parâmetros de reabsorção					
Superfície de reabsorção (ES/BS, %)	15,8 (3,83-25,5)	1,95 (0-14,6)	< 0,0001	1,75±1,21	2,3±2,4
Superfície osteoclástica (Oc.S/BS, %)	4,6 (1,2-9,14)	0,3 (0-1,34)	< 0,0001	0,03±0,11	0,03±0,06
Fibrose					
Volume de fibrose (Fb.V/TV, %)	6,8 (0,63-19,05)	0,03 (0-0,94)	< 0,0001	0	0
Parâmetros de mineralização					
Taxa de formação óssea (BFR/BS, <i>µm</i> ³ / <i>µm</i> ² / <i>dia</i>)	0,17 (0,04-0,43)	0,006 (0,006-0,096)	< 0,0001	0,13±0,07	0,07±0,03
Superfície mineralizante (MS/BS, %)	15,5 (3,93-27,7)	2,9 (0,33-21,9)	< 0,0001	18,3±7,5	11,5±4,5
Tempo de aposição mineral (Mlt, <i>dias</i>)	32,3 (5,6-104,6)	809,9 (7,4-809,9)	< 0,0001	21,3±2,3	23,7±2,7
Contagem de osteócitos					
Número de osteócitos totais (Ost total, <i>n</i>)	796 (113-2916)	737 (31-2244)	0,229	--	--
Número de osteócitos/Área do osso trabecular (Ost total/B.Ar, <i>n/mm</i> ²)	127,7 ± 45	78,7 ± 30,6	< 0,0001	--	--
Número de osteócitos/Área de Tecido (Ost total/ T.Ar, <i>n/mm</i> ²)	27,3 (4,9-75,4)	17,9 (1,6-61,3)	0,0018	--	--

Valores expressos como média e desvio padrão ou mediana e extremos; PTX: paratireoidectomia; PTH: paratormônio.

Dos 23 pacientes do presente estudo, 18 (78%) apresentavam Osteíte Fibrosa antes da PTX. Os outros 5 pacientes (22%) apresentavam Doença Mista. Um ano após a cirurgia, detectamos piora na mineralização uma vez que houve diminuição da taxa de formação óssea (BFR/BS), da superfície mineralizante (MS/BS) e aumento no intervalo de tempo de mineralização (Mlt); nesse grupo, somente 5 pacientes (22%) exibiam uma remodelação e mineralização óssea próximas do normal, enquanto 18 pacientes (78%) manifestavam Doença Óssea Adinâmica (Tabela 3, Figuras 7 e 8).

Também observamos após a PTX uma diminuição significativa do número de osteócitos corrigidos pela área de osso trabecular e pela área de tecido analisado (Tabela 3).

Figura 7. Evolução do tipo de osteodistrofia renal após a paratireoidectomia (PTX).

Figura 8. Classificação da osteodistrofia renal antes e após a PTX.
PTX: paratireoidectomia; OF: Osteíte Fibrosa; DM: Doença Mista; DOA: Doença Óssea Adinâmica.

Quando comparamos os pacientes pós PTX classificados com DOA com os pacientes que apresentavam histologia óssea normal, não encontramos diferenças significativas quanto ao quadro laboratorial ou expressão das

proteínas ósseas estudadas. As únicas diferenças encontradas foram as esperadas para a divisão entre os dois grupos como alguns parâmetros histomorfométricos estruturais e de mineralização (tabela 4).

Tabela 4. Diferenças encontradas entre pacientes com Doença Óssea Adinâmica e histologia óssea normal após a PTX

	DOA (N=18)	Histologia normal (N=5)	p
O.Th, μm	8,36 $\pm$ 2,05	5,98 $\pm$ 1,53	0,025
OS/BS, %	44,36 $\pm$ 25,21	18,73 $\pm$ 9,07	0,039
BFR/BS, $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$	0,006 (0,006-0,05)	0,05 (0,03-0,096)	0,0014
Mlt, dias	809,9 (72,8-809,9)	25,7 (7,4-37,3)	0,0003

Valores expressos como média e desvio padrão ou mediana e extremos; PTX: paratireoidectomia; DOA: Doença Óssea Adinâmica; O.Th: Espessura de osteóide; OS/BS: Superfície de osteóide; BFR/BS: Taxa de formação óssea; Mlt: Intervalo de tempo para a mineralização.

4.3. Expressão óssea do DMP-1, MEPE, esclerostina, FGF23, OPG E RANKL

Os resultados da análise da expressão das proteínas osteocíticas avaliadas por imunohistoquímica estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Análise da expressão das proteínas DMP-1, MEPE, esclerostina, FGF23, OPG e RANKL e a relação RANKL/OPG antes e depois da PTX

	Pré PTX (N=23)	Pós PTX (N=23)	p
DMP-1 (%)	3,47 (0,36-23)	4,02 (0,04-17,31)	0,9636
MEPE (%)	1,88 (0,21-7,45)	1,93 (0,7-5,01)	0,3155
Esclerostina (%)	3,95 (0,25-37,1)	13,5 (3,03-41,42)	0,0009*
FGF23 (%)	6,79 (1,5-28,33)	6 (0,35-74,38)	0,533
OPG (%)	0,74 (0,17-3,03)	2,54 (0,26-16,12)	0,0001*
RANKL (%)	2,1 (0,61-14,84)	3,62 (0,74-63,63)	0,1752
RANKL/OPG (UA)	3,39 (0,37-13,95)	1,50 (0,29-14,35)	0,040*

Valores expressos como mediana e extremos; PTX: paratireoidectomia; DMP-1: *dentin matrix protein 1*; MEPE: Fosfoglicoproteína de matriz extracelular; FGF23: Fator de crescimento de fibroblastos 23; OPG: Osteoprotegerina; RANKL: Fator nuclear Kappa β ligante; UA: Unidade arbitrária.

Analisando o osso trabecular, verificamos que a expressão óssea da esclerostina aumentou significativamente após a PTX, e, consistente com o fato dessa proteína ser um marcador de osteócito maduro, foi observada predominantemente nos osteócitos mais centrais das trabéculas ósseas (Figura 9).

Figura 9. Expressão da esclerostina antes e após a paratireoidectomia (PTX) (200x).

A PTX também aumentou de forma significativa a expressão da OPG, conforme demonstrado na figura 10.

Figura 10. Expressão da OPG antes e após a paratireoidectomia (PTX) (400x)

A razão RANKL/OPG diminuiu significativamente após a PTX (Figura 11).

Figura 11. Razão RANKL/OPG antes e após a paratireoidectomia (PTX). UA: Unidade Arbitrária

Observamos que houve persistência da significância estatística pré-PTX vs. pós-PTX quando esses mesmos 3 parâmetros (Esclerostina, OPG e razão RANKL/OPG) foram corrigidos em relação à área de osso trabecular analisado [(Ost+ / Ost total x 100)/B.Ar, Esclerostina: $p=0,06$; OPG: $p=0,021$; razão RANKL/OPG: $p=0,008$] e em relação ao tecido analisado [(Ost+ /Ost total x 100) / T.Ar, Esclerostina: $p=0,01$; OPG: $p=0,007$; razão RANKL/OPG: $p=0,024$].

A distribuição do DMP-1 foi difusa, com sua expressão mais acentuada nos corpos celulares e processos dendríticos dos osteócitos, em toda a trabécula (Figura 12A). Assim como o DMP-1, o MEPE também se expressou difusamente nas trabéculas, sendo observado nos corpos celulares dos osteócitos (Figura 12B). Quanto ao FGF23, sua expressão foi mais intensa nos osteócitos presentes na periferia da trabécula (Figura 12C). A expressão do RANKL, por sua vez, foi observada em osteoblastos próximos à superfície osteóide, em algumas células medulares e nos osteócitos (Figura 12D). A PTX não alterou a expressão óssea dessas proteínas.

Figura 12. Expressão das proteínas: (A) DMP-1; (B) MEPE; (C) FGF23; (D) RANKL. (A, B e C: 200x; D: 400x).

4.4. Correlações entre a expressão óssea das proteínas e os dados laboratoriais e histomorfométricos

Nossos resultados mostraram associações interessantes entre a expressão das proteínas produzidas pelos osteócitos, os parâmetros laboratoriais e a remodelação óssea.

Mudanças na expressão óssea do DMP-1 se correlacionaram significativamente com alterações nos níveis séricos de fosfatase alcalina e na expressão da OPG (Figura 13).

Figura 13. Correlação entre a variação na expressão do DMP-1 e mudanças na FA (A) e expressão da OPG (B).

A correlação entre a variação relativa do MEPE (pós-PTX em relação ao pré-PTX) com a superfície mineralizante (MS/BS) ficou próxima da significância (Figura 14A). O aumento da expressão do MEPE se correlacionou significativamente com o aumento da expressão do RANKL (figura 14B).

Figura 14. Correlação entre a variação na expressão do MEPE e mudança na superfície mineralizante (MS/BS) (A) e expressão do RANKL (B).

Alterações na expressão óssea da esclerostina se correlacionaram negativamente com parâmetros estruturais e de formação óssea como o BV/TV, Tb.N, OV/BV e O.Th e positivamente com Tb.Sp (Figura 15).

Figura 15. Correlação entre a variação na expressão da esclerostina e mudanças nos parâmetros estruturais (A) e de formação óssea (B) da histomorfometria. (BV/TV): Volume ósseo; (Tb.N): Número de trabéculas; (Tb.Sp): Separação trabecular; (OV/BV): Volume osteoide; (O.Th): Espessura osteoide.

Não houve correlação entre a expressão óssea do FGF23 com nenhum parâmetro bioquímico ou histomorfométrico.

Observamos correlação próxima da significância entre mudanças na expressão da OPG com a variação da OS/BS (Figura 16).

Figura 16. Correlação entre a variação na expressão da OPG e mudança na superfície osteóide (OS/BS).

Modificações na variação da expressão do RANKL se correlacionaram negativamente com variações do BV/TV e Tb.N e positivamente com variações do Tb.Sp (Figura 17).

Figura 17. Correlação entre a variação na expressão do RANKL e mudanças nos parâmetros estruturais da histomorfometria óssea. (BV/TV): Volume ósseo; (Tb.N): Número de trabéculas; (Tb.Sp): Separação trabecular.

A diminuição da razão RANKL/OPG se correlacionou significativamente com o aumento da Ob.S/BS (Figura 18).

Figura 18. Correlação entre a variação na razão RANKL/OPG e mudança na superfície osteoblástica (Ob.S/BS).

4.5. Mineralização e expressão de proteínas no tecido ósseo

Para compreender o comprometimento da mineralização detectado após a PTX, optamos por avaliar a expressão das proteínas aqui estudadas, antes e após a cirurgia, dividindo os pacientes da seguinte forma: os do grupo 1 (N=5) não tinham defeito de mineralização óssea antes e assim permaneceram após a PTX; aqueles que não tinham defeito de mineralização pré PTX e passaram a apresentar essa alteração somente após a cirurgia, constituem o grupo 2 (N=13); cinco pacientes tinham defeito de mineralização antes que persistiu após a PTX (N=5). Os resultados podem ser observados na tabela 6.

Houve um aumento significativo na expressão da OPG no grupo de pacientes que passou a apresentar comprometimento da mineralização após a PTX.

Tabela 6. Análise da expressão das proteínas DMP-1, MEPE, esclerostina, FGF23, OPG e RANKL, dividindo os pacientes em grupos em função da presença ou não de defeito de mineralização, antes e depois da PTX.

	Grupo 1 (N=5)			p	Grupo 2 (N=13)			p	Grupo 3 (N=5)			p
	Pré-PTX	Pós-PTX			Pré-PTX	Pós-PTX			Pré-PTX	Pós-PTX		
DMP-1 (%)	3,14 (1,59-18,2)	2,7 (2,19-11,65)		0,81	3,7 (0,74-23)	4,69 (0,04-17,31)		0,78	3,6 (0,36-15,1)	4,02 (0,33-15,52)		0,81
MEPE (%)	1,88 (0,21-3,29)	1,5 (1,07-3,42)		1,0	1,68 (0,29-7,45)	1,74 (0,7-4,94)		0,94	1,96 (1,13-2,43)	2,74 (1,06-5,01)		0,12
Esclerostina (%)	2,9 (0,25-3,95)	13,5 (10,15-37,5)		0,06	5,01 (0,51-37,1)	12,9 (3,03-41,42)		0,08	5,86 (2,07-10,7)	14,26 (12,45-35,5)		0,06
FGF23 (%)	6,79 (2,01-19,57)	9,52 (3,3-24,12)		0,62	5,3 (1,5-28,33)	9,4 (0,35-74,38)		0,54	7,66 (3,69-15,59)	3,84 (1,55-16,12)		0,81
OPG (%)	0,64 (0,17-2,01)	1,19 (0,35-13,82)		0,18	1,02 (0,18-3,03)	2,63 (0,59-11,03)		0,0007*	0,65 (0,19-2,76)	2,54 (0,26-16,12)		0,12
RANKL (%)	2,04 (0,8-3,27)	3,75 (0,98-5,56)		0,25	2,71 (0,61-14,84)	3,34 (0,74-10,69)		0,96	2,65 (0,7-3,37)	3,73 (1,41-63,63)		0,31

Valores expressos como mediana e extremos; PTX: paratireoidectomia; DMP-1: *dentin matrix protein 1*; MEPE: Fosfoglicoproteína de matriz extracelular; FGF23: Fator de crescimento de fibroblastos 23; OPG: Osteoprotegerina; RANKL: Fator nuclear Kappa β ligante.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro a revelar mudanças na expressão óssea de proteínas osteocíticas que se correlacionam com parâmetros laboratoriais e histomorfométricos em pacientes com HPTS submetidos a PTX, cujas alterações são evidentes em um pequeno tamanho de amostra.

A queda dos níveis de Ca, P, FA e PTH após a PTX aqui descrita é esperada e compõe a síndrome da fome óssea, um fenômeno que cursa com diminuição das concentrações séricas desses elementos após a cirurgia. A queda abrupta do PTH promove a diminuição dos osteoclastos, com redução dos parâmetros de reabsorção óssea. No entanto, a formação óssea mediada pelos osteoblastos, apesar de reduzida quando comparada ao período pré PTX, permanece conduzindo a um aumento da captação de Ca e P pelo tecido ósseo, diminuindo, portanto sua concentração sérica. O período de duração da síndrome da fome óssea é variável. Os pacientes aqui estudados apresentavam HPTS grave o que justifica a persistência da queda após 1 ano da PTX.

Os resultados da análise histomorfométrica revelaram que a maioria dos pacientes apresentava alta atividade osteoblástica e osteoclástica e um grande comprometimento da microarquitetura óssea, além de uma extensa área de fibrose, compatível com um quadro histológico de osteíte fibrosa, uma doença de alta remodelação, manifestação do HPTS. Essas alterações são influenciadas pelos altos níveis de PTH, através de múltiplos mecanismos.

A doença de alta remodelação se caracteriza por um desequilíbrio entre formação e reabsorção, o que compromete a microarquitetura do tecido ósseo, com diminuição da conectividade e aumento da separação entre as trabéculas. A mineralização também pode ficar prejudicada, uma vez que o osso recém-formado é removido rapidamente sem tempo suficiente para que a mineralização se complete de forma adequada o que foi observado principalmente nos pacientes com doença mista (117,118).

Poucos estudos avaliaram as características histológicas do tecido ósseo usando histomorfometria 1 ano após o tratamento do HPTS, como no presente trabalho. Para obter informações sobre as mudanças dinâmicas no metabolismo e no tecido ósseo em pacientes com HPTS, Yajima et al. investigaram pacientes submetidos a biopsia óssea 1 semana após a PTX. Eles perceberam um aumento transitório na formação óssea, enquanto que os osteoclastos desapareceram ou diminuíram em número (119).

Em outro estudo, alguns anos depois, o mesmo grupo analisou a histologia óssea, antes e de 2 a 4 semanas após a PTX. Na ocasião, os autores também observaram que a superfície dos osteoclastos diminuiu drasticamente para quase 0%, com um aumento substancial no volume osteóide e uma redução na fibrose, além de uma queda significativa do número de osteócitos, concomitante com um aumento no número de lacunas vazias e uma redução do volume lacunar (120). Da mesma forma, observamos em nosso trabalho, uma diminuição significativa do número de osteócitos no osso trabecular presumivelmente devido à diminuição da sinalização do PTH nessas células como descrito no estudo de Yajima et al. (120).

Behets et al., por sua vez, caracterizaram a resposta do tecido ósseo de pacientes com HPTS comprovada por biópsia, que foi realizada de 6 a 12 meses após terapia com cinacalcete, uma outra medicação utilizada no tratamento do HPTS. Os autores perceberam uma redução significativa nos parâmetros de formação óssea à medida que o PTH foi reduzido durante o tratamento (121).

Em resumo, o tratamento do HPTS resulta em uma queda acentuada do PTH com consequente diminuição dos efeitos deletérios do excesso desse hormônio no tecido ósseo e, como esperado, observamos uma melhora da microarquitetura óssea e da fibrose medular após a PTX.

Avaliando a expressão de proteínas osteocíticas, evidenciamos um aumento significativo da expressão óssea da esclerostina após a PTX. Muitos avanços nos últimos anos foram alcançados e a literatura tem nos oferecido importantes informações sobre a regulação da esclerostina e seus mecanismos de ação. Vários estímulos, como o PTH, corticóides, estrogênios, Vitamina D, estímulo mecânico, entre outros fatores foram relatados como reguladores da expressão do gene SOST/esclerostina. No entanto, como esses fatores agem mutuamente para regular sua expressão de uma forma espaço-temporal é desconhecida (122).

Pereira et al., analisando pacientes pediátricos com DRC e HPTS tratados com análogos da vitamina D, o doxercalciferol, também observaram um aumento na expressão dessa proteína (123). Assim, poderíamos supor que o tratamento do HPTS, seja com PTX ou com análogos da vitamina D (PTX química) reduzem os níveis de PTH e aumentam, consequentemente, a

expressão da esclerostina, uma vez que o PTH é um importante inibidor dessa proteína.

Os efeitos anabólicos do PTH no tecido ósseo são mediados em parte pela supressão da esclerostina. Nesse contexto, a diminuição na taxa de formação óssea e superfície osteoblástica observadas após a cirurgia, podem ter sido influenciadas de alguma forma pelo aumento na expressão da esclerostina, o que já foi observado em outros trabalhos (36).

Nosso estudo apontou relações importantes entre a expressão das proteínas osteocíticas e a remodelação óssea. A esclerostina possui um papel central na regulação da massa óssea, apresentando uma ação inibitória na formação do tecido ósseo (124). Consistente com esse papel, nossos resultados demonstraram uma associação negativa dessa proteína com parâmetros estruturais e de formação óssea como o volume ósseo, volume osteoide, o número e a espessura trabecular e uma relação positiva com a separação das trabéculas.

Demonstramos também um aumento significativo na expressão óssea da OPG após a cirurgia. Essa proteína regula negativamente a osteoclastogênese e o aumento de sua expressão pode ter contribuído para a diminuição dos parâmetros de reabsorção detectados após a PTX. Estudos prévios tem demonstrado um efeito inibitório do PTH sobre a OPG. É possível que a queda dos níveis do PTH após a PTX tenha contribuído para este resultado (106,109,110).

Conforme mostrado na tabela 3, observamos uma diminuição nos parâmetros de reabsorção após a PTX. Era de se esperar que a expressão do RANKL diminuísse após a cirurgia, pois essa proteína regula positivamente a osteoclastogênese, promovendo a reabsorção óssea. No entanto, apesar de não haver significância estatística, observamos um aumento de sua expressão após a PTX. Wijenayaka et al., avaliando culturas de células osteocíticas humanas e células osteócitos-*like* de camundongos, demonstraram que a esclerostina regula o RANKL, aumentando sua expressão (125). Dessa forma, a elevação da esclerostina após a PTX observada no presente estudo pode ter contribuído para o aumento da expressão do RANKL no tecido ósseo.

Por outro lado, apesar do aumento da expressão do RANKL, a razão RANKL/OPG diminuiu significativamente após a PTX, dado que reforça a diminuição dos parâmetros de reabsorção detectados após a cirurgia.

RANKL e OPG são importantes marcadores da biologia óssea. Anormalidades na razão RANKL/OPG têm sido implicadas na patogênese de diversas doenças como osteoporose, artrite reumatoide, tumores e metástases ósseas. Essa relação, quando aumentada, se correlaciona com marcadores de reabsorção óssea e lesões osteolíticas, podendo indicar perda óssea. No cenário do hiperparatireoidismo primário, os níveis circulantes do RANKL são aumentados e positivamente correlacionados com marcadores de reabsorção óssea (109). Nesses pacientes, estudos mostram uma diminuição da razão RANKL/OPG 1 ano após a paratireoidectomia (126,127), dado que vai ao encontro dos nossos resultados.

Na análise de correlações, apresentamos também dados interessantes entre essas proteínas e alguns parâmetros histomorfométricos. A OPG, ao inibir a reabsorção, promove o aumento de massa óssea. De forma intrigante, observamos que houve uma tendência de correlação entre o aumento da OPG com a diminuição da superfície osteóide, um parâmetro que avalia a formação óssea. As razões para esta associação não são claras, mas podem refletir diferenças subjacentes na biologia esquelética e/ou respostas hormonais esqueléticas em indivíduos com HPTS. Por outro lado e de acordo com nossas expectativas, demonstramos uma associação negativa entre o RANKL e alguns parâmetros estruturais do tecido ósseo como o volume ósseo e o número de trabéculas e uma associação positiva com a separação trabecular, fato que corrobora com o papel promotor da reabsorção óssea dessa proteína. A diminuição da razão RANKL/OPG se correlacionou significativamente com o aumento da superfície osteoblástica, o que reforça a diminuição da perda óssea que encontramos após a PTX.

Quanto ao DMP-1, não observamos alteração significativa em sua expressão. Dados da literatura mostram que o DMP-1 apresenta relação direta com o P e uma relação inversa com a esclerostina e o calcitriol (128-131). A queda do P e o aumento da esclerostina após a PTX, associados à suplementação com calcitriol, necessária para tratar a fome óssea desses pacientes, poderiam resultar em uma diminuição da expressão do DMP-1. Por outro lado, Wang et al. (100) e Belido et al. (101) demonstraram que o PTH atua de forma inibitória sobre o DMP-1. A queda do PTH após a PTX poderia contribuir para um aumento em sua expressão. No entanto, não foi o que

observamos. Pereira et al., por sua vez, observaram um aumento na expressão da forma completa (98 kDa) e uma diminuição do fragmento 57 kDa dessa proteína em pacientes pediátricos com DRC e HPTS tratados com doxercalciferol (123). Vale ressaltar que avaliamos o fragmento N-terminal dessa proteína o que poderia explicar os resultados distintos de Pereira et al.

Na análise de associações, entretanto, encontramos resultados interessantes, pois mudanças na expressão do DMP-1 se correlacionaram negativamente com alterações na FA. O DMP-1 desempenha um papel importante na homeostase mineral por intermédio de seu efeito direto na mineralização e indireto na homeostase do P que ainda não são bem compreendidos (70,132). A FA, por sua vez, exerce uma ação fundamental na mineralização óssea, sendo responsável principalmente pela produção de P inorgânico a partir da clivagem do pirofosfato (PPi), necessária para promover a mineralização. Informações atualmente disponíveis demonstram claramente seu papel central na formação de minerais em tecidos mineralizantes, o que provavelmente ocorre por meio de sua capacidade de alterar a relação P / PPi na matriz pré-mineralizada desses tecidos. Em contraste, o aumento do fosfato inorgânico em cementoblastos up regula entre outras proteínas, o DMP-1 e down regula a expressão da FA (133). Portanto, é possível que o DMP-1 possa afetar a expressão da FA através da correta relação P / PPi.

Encontramos também uma associação negativa entre variações na expressão óssea do DMP-1 e da OPG. A relação entre essas proteínas já foi relatada previamente. Masuki et al. observaram que a expressão do DMP-1 pode ser afetada em camundongos *knockout* para OPG. Na ocasião, os

autores observaram que a deficiência da OPG pode prejudicar a distribuição regular do sistema lacuno-canalicular osteocítico, o que, por sua vez, pode afetar a síntese de DMP-1 e, conseqüentemente, sua expressão óssea (134).

Assim como o DMP-1, não encontramos alteração na expressão do MEPE em relação ao valor pré-PTX. A variação relativa do MEPE, por sua vez, (pós-PTX em relação ao pré-PTX) ficou próxima da significância com a superfície mineralizante (MS/BS), um parâmetro que avalia a mineralização. Consistente com estudos anteriores, modificações na expressão do MEPE são preditores de mudanças na mineralização óssea. Como relatado previamente, o MEPE contém uma região C-terminal, chamada de peptídeo ASARM, um conhecido inibidor da mineralização. Alteração na expressão desse peptídeo pode potencialmente interferir nessa correlação (58,135). Observamos também uma correlação positiva entre alterações na expressão do MEPE e mudanças no RANKL. Não encontramos na literatura dados que mostrem uma associação direta entre essas duas proteínas. Porém, estudos prévios têm sugerido que os peptídeos ASARM, derivados do MEPE estão envolvidos na regulação da expressão do gene da OPG (60). Uma vez que a atividade da OPG está intimamente relacionada com o RANKL, é possível que a associação por nós encontrada tenha sido influenciada por efeito indireto da OPG.

Em relação ao FGF23, níveis elevados dessa proteína encontrados nos pacientes em fases avançadas da DRC resultam, pelo menos parcialmente, dos altos níveis de PTH circulantes. Estudos prévios tem demonstrado uma diminuição nos níveis séricos de FGF23 após a PTX em modelos animais e estudos clínicos (136,137). Pereira et al., por sua vez, observaram um aumento

na expressão dessa proteína no tecido ósseo em resposta à terapia com doxercalciferol (123). No entanto, não observamos mudança na expressão óssea dessa proteína após a PTX.

O controle dos níveis séricos de P, um ano após a PTX, pode ter contribuído para que sua expressão não tenha se alterado. Adicionalmente, tanto fatores sistêmicos quanto locais regulam a atividade do FGF23. Além do P, seus níveis são modulados pelo Ca, calcitriol, PTH, esclerostina e outros fatores de homeostase mineral, como o PHEX e os membros da pequena família de glicoproteínas que interagem com ligantes de integrina (SIBLING), incluindo DMP-1 e o MEPE (138).

Os motivos pelos quais a expressão do FGF23 não tenha se alterado após a PTX, podem ser reflexo do complexo mecanismo envolvido na regulação dessa proteína, com vários fatores interferindo tanto positivamente quanto negativamente em sua expressão.

Ao dividirmos os pacientes em grupos conforme a presença ou não de defeito de mineralização antes e após a PTX, observamos um aumento significativo na expressão da OPG no grupo de pacientes que passou a apresentar comprometimento da mineralização somente após a cirurgia.

Dados *in vitro* mostraram que a OPG pode prevenir a mineralização induzida pelo cálcio em células musculares lisas vasculares (139). Apesar da OPG ter sido descrita como uma proteína que dificulta a mineralização vascular, não temos dados na literatura até o momento, que relacionam o efeito direto da OPG com a mineralização do tecido ósseo. Este é o primeiro

trabalho que demonstra a associação dessa proteína com um defeito de mineralização óssea.

A participação das proteínas ósseas no contexto da osteodistrofia renal, especialmente na mineralização do tecido ósseo não é totalmente compreendida. Nosso grupo, em outro estudo recente, comparou a expressão óssea de proteínas envolvidas na formação e na mineralização óssea de pacientes com DRC com e sem fratura. A análise dos resultados revelou que a expressão de proteínas ósseas nos osteócitos do osso trabecular e cortical são diferentes, havendo uma redução da expressão da DMP-1 nas corticais e aumento da expressão da SOST no osso trabecular dos pacientes com fratura comparados aos sem fratura, sugerindo a participação das mesmas no retardo de mineralização (DMP-1) e na baixa massa óssea (SOST) dos pacientes fraturados.

Em outro trabalho, nosso grupo também avaliou previamente a expressão temporal de várias proteínas produzidas por osteócitos em biópsias ósseas de indivíduos normais e de pacientes em diferentes estágios da DRC e testou vários marcadores de remodelação óssea, correlacionando esses níveis com achados da biópsia óssea. Com a progressão da DRC, o cálcio sérico diminuiu, enquanto o P sérico, fosfatase alcalina, FGF23, PTH e a OPG aumentaram. Além disso, houve um aumento gradual na reabsorção óssea associada a uma diminuição da formação e comprometimento na mineralização óssea. Na ocasião, observamos também que a expressão óssea de algumas proteínas, como a esclerostina e PTH-receptor-1 pareceu ser maior nos estágios iniciais da DRC, enquanto FGF23 e β -catenina fosforilada tiveram

maior expressão nos últimos estágios da doença renal e a expressão de todas elas foi maior do que nos indivíduos controle. A singularidade desse estudo consistiu em ter realizado imunohistoquímica e quantificado proteínas ósseas relacionadas à via de sinalização Wnt, comparando um subconjunto de voluntários saudáveis com pacientes nos diferentes estágios da DRC, incluindo pacientes em diálise (140).

No cenário atual, analisando os pacientes no último estágio da doença renal com HPTS submetidos a PTX, abordamos questões ainda não respondidas. Acreditamos que esse tipo de análise tenha nos ajudado a compreender o papel dessas proteínas no tecido ósseo e particularmente na mineralização dos pacientes com HPTS.

É importante destacar que não são totalmente compreendidos os mecanismos pelos quais o PTH e as proteínas citadas no presente trabalho modulam a atividade dos osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Da mesma forma, ainda está indefinido o processo de modificação desses mecanismos regulatórios em estados patológicos como no HPTS e sobretudo, a adaptação desses mecanismos em resposta à queda abrupta de PTH como ocorre após a PTX.

Muitos fatores, endócrinos ou parácrinos, exercem seus efeitos sobre a rede de osteócitos através de receptores, como por exemplo, o receptor do hormônio da paratireóide (PTH1R). Esse receptor, ativado por ligantes diferentes, exerce sua ação através de caminhos intracelulares distintos, fornecendo ações pleiotrópicas ao PTH. Essas múltiplas funções dependem do

tipo e estágio de diferenciação celular e das condições bioquímicas e mecânicas gerais do esqueleto (141).

Apesar de várias pesquisas terem sido realizadas nos últimos anos, ainda existem lacunas significativas no que se refere ao conhecimento dos meios exatos de ação e regulação do PTH e de seu receptor como protagonistas do metabolismo ósseo.

As principais limitações do presente trabalho são o pequeno tamanho da amostra e as complexidades intrínsecas relacionadas à quantificação da expressão óssea das proteínas aqui estudadas no processo de imunohistoquímica, o que pode ter comprometido nossa capacidade de melhor caracterizá-las. Além disso, trata-se de um trabalho retrospectivo, o que restringe nossa possibilidade de ampliar detalhes relacionados aos dados dos pacientes.

Vale ressaltar, no entanto, que abordamos aspectos ainda não compreendidos e consideramos que nossos resultados tenham ajudado a entender o complexo mecanismo envolvido na relação entre as proteínas produzidas pelos osteócitos e o processo de remodelação e mineralização óssea.

Neste estudo, discutimos observações novas relacionadas ao comportamento de proteínas que participam da biologia óssea. Compreender a atuação dessas proteínas ao longo de uma terapia já estabelecida como a PTX permite identificar novos alvos potenciais para intervenções terapêuticas no tratamento do HPTS.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. Caracterizamos a expressão óssea da esclerostina, MEPE, DMP-1, RANKL, OPG e FGF23 por imunohistoquímica e estabelecemos relações com os dados clínicos, laboratoriais e histomorfométricos do tecido ósseo em pacientes com hiperparatireoidismo secundário, antes e após a paratireoidectomia.
2. A avaliação dos parâmetros histomorfométricos demonstrou que a paratireoidectomia normalizou os parâmetros estruturais, de formação e mineralização em um pequeno número de pacientes; no entanto, houve uma queda acentuada da remodelação, com consequente evolução para Doença Óssea Adinâmica na maioria dos pacientes.
3. A análise da expressão das proteínas osteocíticas revelou um aumento significativo na expressão da esclerostina, que se correlacionou com parâmetros histomorfométricos estruturais e de formação óssea, além de um aumento na expressão da OPG e uma diminuição da relação RANKL/OPG um ano após a PTX, sugerindo a participação dessas proteínas na melhora das lesões ósseas decorrentes do HPTS.
4. Observamos um aumento significativo na expressão da OPG no grupo de pacientes que evoluiu com defeito de mineralização somente após a cirurgia, sugerindo a participação dessa proteína no retardo de

mineralização óssea desses pacientes. Este é o primeiro trabalho que demonstra a associação dessa proteína com um defeito de mineralização óssea.

5. As demais proteínas avaliadas, apesar de não apresentarem mudança significativa na expressão óssea após a PTX, se correlacionaram significativamente com alguns parâmetros bioquímicos e histomorfométricos. A integração entre essas proteínas osteocíticas constitui um complexo quebra-cabeça que passa a ser melhor decifrado e deve ser melhor explorado no futuro.
6. Em resumo, encontramos neste trabalho novos achados relacionados à atuação de proteínas envolvidas na biologia do tecido ósseo que podem nos levar a caminhos a serem direcionados na identificação de potenciais agentes terapêuticos, visando melhorar a saúde óssea no contexto do distúrbio mineral e ósseo relacionada à doença real crônica.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

1. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016; 11(7): e0158765.
2. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, et al. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA*. 2007; 298: 2038-47.
3. Hemmelgarn BR, Manns BJ, Lloyd A, et al. Alberta Kidney Disease Network. Relation between kidney function, proteinuria, and adverse outcomes. *JAMA*. 2010; 303: 423-9.
4. Rennenberg RJMW, Kessels AGH, Schurgers J, et al. Vascular calcifications as a marker of increased cardiovascular risk: A meta-analysis. *Vasc Health Risk Manag*. 2009; 5: 185-97.
5. Block G A, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK. Association of serum phosphorus and calcium x phosphorus product with mortality risk in chronic. *Am J Kidney Dis*. 1998; 31(4): 607-17.
6. Moe SM, Chen NX. Pathophysiology of vascular calcification in chronic kidney disease. *Circ Res*. 2004; 95: 560-7.
7. KDIGO Clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. *Kidney Int Suppl*. 2009; (113): S1-130.
8. Moe SM, Radcliffe JS, White KE, et al. The pathophysiology of early-stage chronic kidney disease-mineral bone disorder (CKD-MBD) and response to phosphate binders in the rat. *J Bone Miner Res*. 2011; 26: 2672-81.
9. Feng JQ, Ward LM, Liu S, et al. Loss of DMP-1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet*. 2006; 38(11): 1310-5.

10. Liu S, Rowe PS, Vierthaler L, Zhou J, Quarles LD. Phosphorylated acidic serine-aspartate-rich MEPE associated motif peptide from matrix extracellular phosphoglycoprotein inhibits phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome enzyme activity. *J Endocrinol.* 2007; 192(1): 261-7.
11. Pereira RC, Juppner H, Azucena-Serrano CE, et al. Patterns of FGF23, DMP-1 and MEPE expression in patients with chronic kidney disease. *Bone.* 2009; 45: 1161-8.
12. Isakova T, Wahl P, Vargas GS, et al. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2011; 79: 1370-8.
13. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3 (Suppl 3): S131-9.
14. Marotti G. The structure of bone tissues and the cellular control of their deposition. *Ital J Anat Embryol.* 1996; 101: 25-79.
15. Qiu S, Rao DS, Palnitkar S, Parfitt AM. Relationships between osteocyte density and bone formation rate in human cancellous bone. *Bone.* 2002; 31(6): 709-11.
16. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn.* 2006; 235: 176-90.
17. Bonewald L. Osteocytes. In: Marcus, R., editor. Osteoporosis. 3rd. ed. Elsevier; 2008. p. 170-89.
18. Gu G, Nars M, Hentunen TA, et al. Isolated primary osteocytes express functional gap junctions in vitro. *Cell Tissue Res.* 2006; 323(2): 263-71.
19. Donahue HJ. Gap junctions and biophysical regulation of bone cell differentiation. *Bone.* 2000; 26: 417-22.
20. Plotkin LI, Bellido T. Osteocytic signalling pathways as therapeutic targets for bone fragility. *Nat Rev Endocrinol.* 2016. 12(10): 593-605.
21. Schaffler MB, Kennedy OD. Osteocyte signaling in bone. *Curr Osteoporos Rep.* 2012; 10(2): 118-25
22. Bentolila V, Boyce TM, Fyhrie DP, et al. Intracortical remodeling in adult rat long bones after fatigue loading. *Bone.* 1998; 23(3): 275-81.
23. Verborgt O, Gibson GJ, Schaffler MB. Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo. *J Bone Miner Res.* 2000; 15(1): 60-7.

24. Veverka V, Henry AJ, Slocombe PM, et al. Characterization of the structural features and interactions of sclerostin: molecular insight into a key regulator of Wnt-mediated bone formation. *J Biol Chem*. 2009; 284: 10890-900.
25. Drüeke TB, Lafage-Proust MH. Sclerostin: just one more player in renal bone disease? *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011; 6: 700-3.
26. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J*. 2003; 22: 6267-76.
27. Van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, Wee-Pals L, De Wilt E, et al. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med*. 2004; 199: 805-14.
28. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE, Wu D. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem*. 2005; 280: 19883-7.
29. Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev*. 2003; 24: 218-35.
30. Kolpakova E, Olsen BR. Wnt/beta-Catenin: a canonical tale of cell-fate choice in the vertebrate skeleton. *Dev Cell*. 2005; 8: 626-7.
31. Choi Y, Arron JR, Townsend MJ. Promising bone related therapeutic targets for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2009; 5(10): 543-8.
32. Warmington K, Morony S, Sarosi I, et al. Sclerostin antagonism in adult rodents, via monoclonal antibody mediated blockade, increases bone mineral density and implicates sclerostin as a key regulator of bone mass during adulthood. *J Bone Miner Res*. 2004; 19 (Suppl. S1): S56.
33. McColm J, Hu L, Womack T, Tang CC, Chiang AY. Single and multiple-dose randomized studies of blosozumab, a monoclonal antibody against sclerostin, in healthy postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2014; 29: 935-43.
34. McClung MR, Grauer A, Boonen S, Bolognese MA, Brown JP, Diez-Perez A, et al. Romosozumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med*. 2014; 370: 412-20.

35. Recker R, Benson C, Matsumoto T, et al. A randomized, double-blind phase 2 clinical trial of blosozumab, a sclerostin antibody, in postmenopausal women with low bone mineral density. *J Bone Miner Res.* 2015; 30: 216-24.
36. Cejka D, Herberth J, Branscum AJ et al. Sclerostin and dickkopf-1 in renal osteodystrophy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011; 6: 877-82.
37. Khosla S. The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001; 142(12): 5050-5.
38. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature.* 1997; 390: 175-9.
39. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 3597-602.
40. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med.* 2011; 17: 1231-4.
41. Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas SC, O'Brien CA. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med.* 2011; 17: 1235-41.
42. Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Suzuki H. Regulatory mechanisms of RANKL presentation to osteoclast precursors. *Curr Osteoporos Rep.* 2014; 12(1): 115-20.
43. Ben-awadh AN, Delgado-Calle J, Tu X, Kuhlenschmidt K, et al. Parathyroid hormone receptor signaling induces bone resorption in the adult skeleton by directly regulating the RANKL gene in osteocytes. *Endocrinology.* 2014; 155(8): 2797-809.
44. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998; 12: 1260-8.
45. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev.* 2008; 29: 155-92.

46. Hofbauer L, Heufelder A. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med.* 2001; 79: 243-53.
47. Sattler A, Schoppet M, Schaefer J, Hofbauer L. Novel aspects on RANK ligand and osteoprotegerin in osteoporosis and vascular disease. *Calcif Tiss Int.* 2004; 74: 103-6.
48. Hofbauer L, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular disease. *JAMA.* 2004; 292: 490-5.
49. Schoppet M, Preissner K, Hofbauer L. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22: 549-53.
50. Bargnoux AS, Morena M, Arnaud J, Cavalier É, Zaoui P, et al. Biomarkers of vascular calcifications: the osteoprotegerin / RANK / RANKL axis. *Ann Biol Clin (Paris).* 2015; 73(3): 289-98.
51. Davaine JM, Quillard T, Chatelais M, Guilbaud F, Brion R, et al. Bone like arterial calcification in femoral atherosclerotic lesions: prevalence and role of osteoprotegerin and pericytes. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2016; 51(2): 259-67.
52. Boyce BF, Xing L. The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr Osteoporos Rep.* 2007; 5(3): 98-104.
53. Richards JB, Zheng HF, Spector TD. Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges. *Nat Rev Genet.* 2012; 13: 576-88.
54. Gorski, JP. Biomineralization of bone: a fresh view of the roles of non-collagenous proteins. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2011; 16: 2598-621.
55. Hansma PK, Fantner GE, Kindt JH, Thurner PJ, Schitter G, et al. Sacrificial bonds in the interfibrillar matrix of bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2005; 5: 313-5.
56. Fisher LW, Fedarko NS. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res.* 2003. 44 (Suppl. 1): 33-40.
57. Rowe PS. The chicken or the egg: PHEX, FGF23 and SIBLINGs unscrambled. *Cell Biochem Funct.* 2012; 30: 355-75.

58. Rowe PS. Regulation of bone-renal mineral and energy metabolism: the PHEX, FGF23, DMP-1, MEPE ASARM pathway. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2012; 22(1): 61–86.
59. Riminucci M, Collins MT, Fedarko NS, Cherman N, Corsi A, White KE, et al. FGF23 in fibrous dysplasia of bone and its relationship to renal phosphate wasting. *J Clin Invest.* 2003; 112: 683-92.
60. Kulkarni RN, Bakker AD, Everts V, Klein-Nulend J. Inhibition of osteoclastogenesis by mechanically loaded osteocytes: involvement of MEPE. *Calcif Tissue Int.* 2010; 87: 461-8.
61. Harris SE, Gluhak-Heinrich J, Harris MA, Yang W, et al. DMP-1 and MEPE expression are elevated in osteocytes after mechanical loading in vivo: theoretical role in controlling mineral quality in the perilacunar matrix. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2007; 7(4): 313-5.
62. Gowen LC, Petersen DN, Mansolf AL, Qi H, Stock JL, et al. Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bone mass. *J Biol Chem.* 2003; 278: 1998-2007.
63. Zelenchuk LV, Hedge AM, Rowe PS. Age dependent regulation of bone-mass and renal function by the MEPE ASARM-motif. *Bone.* 2015; 79: 131-42.
64. Tartaix PH, Doulaverakis M, George A, Fisher LW, Butler WT, et al. In vitro effects of dentin matrix protein-1 on hydroxyapatite formation provide insights into in vivo functions. *J Biol Chem.* 2004; 279(18): 18115-20.
65. He G, Gajjaraman S, Schultz D, Cookson D, Qin C, Butler WT, Hao J, George A. Spatially and temporally controlled biomineralization is facilitated by interaction between self-assembled dentin matrix protein 1 and calcium phosphate nuclei in solution. *Biochemistry.* 2005; 44(49): 16140-8.
66. He G, Dahl T, Veis A, George A. Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1. *Nat Mater.* 2003; 2(8): 552-8.
67. He G, Dahl T, Veis A, George A. Dentin matrix protein 1 initiates hydroxyapatite formation in vitro. *Connect Tissue Res.* 2003; 44 (Suppl. 1): 240-5.

68. Toyosawa S, Shintani S, Fujiwara T, Ooshima T, Sato A, Ijuhin N, Komori T. Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2001; 16: 2017-26.
69. Toyosawa S, Okabayashi K, Komori T, Ijuhin N. mRNA expression and protein localization of dentin matrix protein 1 during dental root formation. *Bone.* 2004; 34: 124-33.
70. He G, George A. Dentin matrix protein 1 immobilized on type I collagen fibrils facilitates apatite deposition in vitro. *J Biol Chem.* 2004; 279: 11649-56.
71. Gluhak-Heinrich J, Ye L, Bonewald LF, Feng JQ, et al. Mechanical loading stimulates dentin matrix protein 1 (DMP-1) expression in osteocytes in vivo. *J Bone Miner Res.* 2003; 18: 807-17.
72. Turner AJ, Tanzawa K. Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX. *FASEB J.* 1997; 11(5): 355-64.
73. Burnett C, Dent CE, Harper C, Warland BJ. Vitamin D-resistant rickets. Analysis of twenty-four pedigrees with hereditary and sporadic cases. *Am J Med.* 1964; 36: 222-33.
74. Tenenhouse HS, Econs MJ. Mendelian hypophosphatemias. In: Scriver CR, ed. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 8th ed. New York: McGraw-Hill. 2001; p. 5045-6.
75. Kiela PR, Ghishan FK. Recent advances in the renal-skeletal-gut axis that controls phosphate homeostasis. *Lab Invest.* 2009; 89(1): 7-14.
76. Bowe AE, Finnegan R, Jan de Beur SM, Cho J, Levine MA, Kumar R, et al. FGF-23 inhibits renal tubular phosphate transport and is a PHEX substrate. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 284: 977-81.
77. Yuan B, Takaiwa M, Clemens TL, Feng JQ, Kumar R, Rowe PS, Xie Y, Drezner MK. Aberrant Phex function in osteoblasts and osteocytes alone underlies murine X linked hypophosphatemia. *J Clin Invest.* 2008; 118: 722-34.
78. Martin A, David V, Quarles LD. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. *Physiol Rev.* 2012; 92: 131-55.
79. Berndt TJ, Schiavi S, Kumar R. "Phosphatonins" and the regulation of phosphorus homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 289: F1170-82.

80. Shimada T, Yamazaki Y, Takahashi M, Hasegawa H, Urakawa I, et al. Vitamin D receptor-independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005; 289: F1088-95.
81. Liu S, Quarles LD. How fibroblast growth factor 23 works. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18(6):1637-47.
82. Liu S, Zhou J, Tang W, Jiang X, Rowe DW, Quarles LD. Pathogenic role of FGF23 in Hyp mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 291(1): E38-49.
83. Liu S, Rowe PS, Vierthaler L, Zhou J, Quarles LD. Phosphorylated acidic serine-aspartate-rich MEPE-associated motif peptide from matrix extracellular phosphoglycoprotein inhibits phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome enzyme activity. *J Endocrinol*. 2007; 192(1): 261-7.
84. Sato T, Tominaga Y, Ueki T, Goto N, Matsuoka S, Katayama A, et al. Total parathyroidectomy reduces elevated circulating fibroblast growth factor 23 in advanced secondary hyperparathyroidism. *Am J Kidney Dis*. 2004; 44(3): 481-7.
85. Wang H, Yoshiko Y, Yamamoto R, Minamizaki T, Kozai K, Tanne K, et al. Overexpression of fibroblast growth factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *J Bone Miner Res*. 2008; 23(6): 939-48.
86. Spoto B, Pizzini P, Tripepi G, Mallamaci F, Zoccali C. Circulating adiponectin modifies the FGF23 response to vitamin D receptor activation: a post hoc analysis of a double-blind, randomized clinical trial. *Nephrol Dial Transplant*. In press 2018.
87. Liu S, Guo R, Simpson LG, et al. Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX. *J Biol Chem*. 2003; 278 (39): 37419-26.
88. Sapir-Koren R, Livshits G. Bone mineralization is regulated by signaling cross talk between molecular factors of local and systemic origin: the role of fibroblast growth factor 23. *Biofactors*. 2014; 40(6): 555-68.
89. Boskey AL. Biomineralization: conflicts, challenges and opportunities. *J Cell Biochem Suppl*. 1998; 30-31: 83-91.
90. Anderson HC. Molecular biology of matrix vesicles. *Clin Orthop Rel Res*. 1995; 314: 266-80.

91. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch.* 2010; 77(1): 4-12.
92. Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling. *Calcif Tissue Int.* 2014; 94: 25-34.
93. Osagie-Clouard L, Sanghani A, Coathup M, Briggs T, Bostrom M, Blunn G. Parathyroid hormone 1-34 and skeletal anabolic action. *Bone Joint Res.* 2017; 6: 14-21.
94. Kramer I, Keller H, Leupin O, Kneissel M. Does osteocytic SOST suppression mediate PTH bone anabolism? *Trends Endocrinol Metab.* 2010; 21: 237-44.
95. Drake MT, Srinivasan B, Mödder UI, Peterson JM, McCready LK, et al. Effects of parathyroid hormone treatment on circulating sclerostin levels in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95: 5056-62.
96. Piemonte S, Romagnoli E, Bratengeier C, Woloszczuk W, Tancredi A, et al. Serum sclerostin levels decline in post-menopausal women with osteoporosis following treatment with intermittent parathyroid hormone. *J Endocrinol Investig.* 2012; 35: 866-8.
97. Yu EW, Kumbhani R, Siwila-Sackman E, Leder BZ. Acute decline in serum sclerostin in response to PTH infusion in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96: E1848-51.
98. Rhee Y, Bivi N, Farrow E, Lezcano V, Plotkin LI, White KE, Bellido T. Parathyroid hormone receptor signaling in osteocytes increases the expression of fibroblast growth factor-23 in vitro and in vivo. *Bone.* 2011; 49(4): 636-43.
99. López I, Rodríguez-Ortiz ME, Almadén Y, Guerrero F, de Oca AM, et al. Direct and indirect effects of parathyroid hormone on circulating levels of fibroblast growth factor 23 in vivo. *Kidney Int.* 2011; 80: 475-82.
100. Wang L, Tran AB, Nociti FH Jr, Thumbigere-Math V, Foster BL, et al. PTH and Vitamin D repress DMP1 in cementoblasts. *J Dent Res.* 2015; 94(10): 1408-16.
101. Bellido T, Ali AA, Gubrij I, Plotkin LI, Fu Q, et al. Chronic elevation of parathyroid hormone in mice reduces expression of sclerostin by osteocytes: a novel mechanism for hormonal control of osteoblastogenesis. *Endocrinology.* 2005; 146(11): 4577-83.

102. Jain A, Fedarko NS, Collins MT, Gelman R, Ankrom MA, Tayback M, Fisher LW. Serum levels of matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) in normal humans correlate with serum phosphorus, parathyroid hormone and bone mineral density. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(8): 4158-61.
103. Ma YL, Cain RL, Halladay DL, Yang X, Zeng Q, et al. Catabolic effects of continuous human PTH (1–38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology.* 2001; 142(9): 4047-54.
104. Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ, Gillespie MT. Osteotropic agents of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells. *Endocrinology.* 1998; 139(11): 4743-6.
105. Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology.* 1999; 140(8): 3552-61.
106. Murakami T, Yamamoto M, Ono K, Nishikawa M, Nagata N, Motoyoshi K, Akatsu T. Transforming Growth Factor-beta 1 increases mRNA levels of osteoclastogenesis inhibitory factor in osteoblastic/stromal cells and inhibits the survival of murine osteoclast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 252(3): 747-52.
107. Osagie-Clouard L, Sanghani A, Coathup M, Briggs T, Bostrom M, Blunn G. Parathyroid hormone 1-34 and skeletal anabolic action: the use of parathyroid hormone in bone formation. *Bone Joint Res.* 2017; 6(1): 14-21.
108. Nakchbandi IA, Lang R, Kinder B, Insogna KL. The role of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand / osteoprotegerin cytokine system in primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol.* 2008; 93: 967-73.
109. Huang JC, Sakata T, Pfleger LL, Bencsik M, Halloran BP, Bikle DD, et al. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *J Bone Miner Res.* 2004; 19: 235-44.
110. Hernandez FR, Canziani ME, Barreto FC, Santos RO, Moreira VM, et al. The shift from high to low turnover bone disease after parathyroidectomy is associated with the progression of vascular calcification in hemodialysis patients: a 12-month follow-up study. *PLoS One.* 2017; 12(4): e0174811.

111. de Souza CG, de Souza MP, Jorgetti V, Dos Reis LM. Histomorphometric bone assessment in patients with fracture of the proximal end of the femur. *Acta Ortop Bras.* 2015; 23(2): 103-6.
112. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for Bone Histomorphometry: A 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 2013; 28: 2-17.
113. Dos Reis LM, Batalha JR, Munoz DR, Borelli A, Correa PHS, et al. Brazilian normal static bone histomorphometry: effects of age, sex and race. *J Bone Miner Metab.* 2007; 25 (6): 400-6.
114. Melsen F, Mosekilde L. Tetracycline double-labeling of iliac trabecular bone in 41 normal adults. *Calcif Tissue Res.* 1978; 26 (2): 99-102.
115. Barreto FC, Barreto DV, Moyses RM, Neves CL, Jorgetti V, et al. Osteoporosis in hemodialysis patients revisited by bone histomorphometry: a new insight into an old problem. *Kidney Int.* 2006; 69(10): 1852-7.
116. Gomes SA, dos Reis LM, de Oliveira IB, Noronha IL, Jorgetti V, Heilberg IP. Usefulness of a quick decalcification of bone sections embedded in methyl methacrylate [corrected]: an improved method for immunohistochemistry. *J Bone Miner Metab.* 2008; 26(1): 110-3.
117. Zheng CM, Zheng JQ, Wu CC, Lu CL, Shyu JF, et al. Bone loss in chronic kidney disease: quantity or quality? *Bone.* 2016; 6(87): 57-70.
118. McNerny EMB, Nickolas TL. Bone Quality in Chronic kidney disease: Definitions and diagnosis. *Cur Osteoporos Rep.* 2017; S 11914-17
119. Yajima A, Ogawa Y, Takahashi HE, Tominaga Y, Inou T, Otsubo O. Changes of bone remodeling immediately after parathyroidectomy for secondary hyperparathyroidism. *Am J Kidney Dis.* 2003; 42(4): 729-38.
120. Yajima A, Inaba M, Tominaga Y, Nishizawa Y, Ikeda K, Ito A. Increased osteocyte death and mineralization inside bone after parathyroidectomy in patients with secondary hiperparathyroidism. *J Bone Miner Res.* 2010; 25(11): 2374-81.
121. Behets GJ, Spasovski G, Sterling LR, Goodman WG, Spiegel DM, et al. Bone histomorphometry before and after long-term treatment with cinacalcet in dialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int.* 2015; 87: 846-56.

122. Delgado-Calle J, Sato AY, Bellido T. Role and mechanism of action of sclerostin in bone. *Bone*. 2017; 96: 29-37.
123. Pereira RC, Jüppner H, Gales B, Salusky IB, Wesseling-Perry K. Osteocytic protein expression response to doxercalciferol therapy in pediatric dialysis patients. *PLoS One*. 2015; 10(3): e0120856.
124. Winkler DG, Sutherland MK, Georghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J*. 2003; 22(23): 6267-76.
125. Wijenayaka AR, Kogawa M, Lim HP, Bonewald LF, Findlay DM, Atkins GJ. Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway. *PLoS One*. 2011; 6(10): e25900.
126. Stilgren LS, Rettmer E, Eriksen EF, et al. Skeletal changes in osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand mRNA levels in primary hyperparathyroidism: effect of parathyroidectomy and association with bone metabolism. *Bone*. 2004; 35: 256-65.
127. Szymczak J, Bohdanowicz-Pawlak A. Osteoprotegerin, RANKL, and bone turnover in primary hyperparathyroidism: the effect of parathyroidectomy and treatment with alendronate. *Horm Metab Res*. 2013; 45: 759-64.
128. Miyagawa K, Yamazaki M, Kawai M, et al. Dysregulated gene expression in the primary osteoblasts and osteocytes isolated from hypophosphatemic Hyp mice. *PloS One*. 2014; 9(4): e93840.
129. Nociti FH Jr, Foster BL, Tran AB, Dunn D, Presland RB, Wang L, et al. Vitamin D represses dentin matrix protein 1 in cementoblasts and osteocytes. *J Dent Res*. 2014; 93(2):148-54.
130. Atkins JG, Rowe PS, Lim HP, Welldon KJ, Ormsby R, et al. Sclerostin is a locally acting regulator of late-osteoblast/preosteocyte differentiation and regulates mineralization through a MEPE-ASARM-dependent mechanism. *J Bone Miner Res*. 2011; 26: 1425-36.
131. Rendenbach C, Yorgan TA, Heckt T, et al. Effects of extracellular phosphate on gene expression in murine osteoblasts. *Calcif Tissue Int*. 2014; 94: 473-83.
132. Ling Y, Rios HF, Myers ER, Lu Y, Feng JQ, Boskey AL. DMP1 depletion decreases bone mineralization in vivo: an FTIR imaging analysis. *J Bone Miner Res*. 2005; 20(12): 2169-77.

133. Foster BL, Nociti FH Jr, Swanson EC, Matsa-Dunn D, Berry JE, Cupp CJ, Zhang P, Somerman MJ. Regulation of cementoblast gene expression by inorganic phosphate in vitro. *Calcif Tissue Int.* 2006; 78(2): 103-12.
134. Masuki H, Li M, Hasegawa T, Suzuki R, et al. Immunolocalization of DMP1 and sclerostin in the epiphyseal trabecule and diaphyseal cortical bone of osteoprotegerin deficient mice. *Biomed Res.* 2010; 31(5): 307-18.
135. David V, Martin A, Hedge AM, Rowe PS. Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is a new bone renal hormone and vascularization modulator. *Endocrinology.* 2009; 150(9): 4012-23.
136. Takahashi H, Komaba H, Takahashi Y, Sawada K, Tatsumi R, et al. Impact of parathyroidectomy on serum FGF23 and soluble Klotho in hemodialysis patients with severe secondary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99(4): E652-8.
137. Kawata T, Imanishi Y, Kobayashi K, Miki T, Arnold A, et al. Parathyroid hormone regulates fibroblast growth factor-23 in a mouse model of primary hyperparathyroidism. *J Am Soc Nephrol.* 2007; 18(10): 2683-8.
138. Martin A, Liu S, David V, Li H, Karydis A, Feng JQ, Quarles LD. Bone proteins PHEX and DMP1 regulate fibroblastic growth factor FGF23 expression in osteocytes through a common pathway involving FGF receptor (FGFR) signaling. *FASEB J.* 2011; 25(8): 2551-62.
139. Callegari A, Coons ML, Ricks JL, Rosenfeld ME, Scatena M. Increased calcification in osteoprotegerin-deficient smooth muscle cells: dependence on receptor activator of NF- κ B ligand and interleukin 6. *J Vasc Res.* 2014; 51(2): 118-31.
140. Graciolli FG, Neves KR, Barreto F, Barreto DV, Dos Reis LM, et al. The complexity of chronic kidney disease-mineral and bone disorder across stages of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2017; 91(6): 1436-46.
141. Yavropoulou MP, Michopoulos A, Yovos JG. PTH and PTHR1 in osteocytes. New insights into old partners. *Hormones (Athens).* 2017; 16(2): 150-60.