EMILIA MARIA DANTAS SOEIRO

Padrão histomorfométrico de biópsias ósseas em crianças e adolescentes com doença renal crônica em programa de diálise

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

Programa de Nefrologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosa Maria Affonso Moyses

São Paulo
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Soeiro, Emilia Maria Dantas
Padrão histomorfométrico de biópsias ósseas em crianças e adolescentes com doença renal crônica em programa de diálise / Emilia Maria Dantas Soeiro. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.
Orientadora: Rosa Maria Affonso Moyses.

Descritores: 1.Insuficiência renal crônica 2.Doenças ósseas metabólicas 3.Hiperparatireoidismo secundário 4.Biopsia 5.Criança

USP/FM/DBD-450/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Aos meus filhos Lucas, Matheus e Ligia, "com todo amor e carinho".

À meu esposo Mauricio, juntos na caminhada..

À minha mãe, minha avó e meus tios, pelos exemplos de vida, ética, força e coragem.

Agradecimentos

À minha querida orientadora Dra. Rosa Maria Affonso Moysés. Inteligente, perspicaz, experiente, comprometida, paciente. Exemplo de pessoa, de médica, professora e pesquisadora. Obrigada, por tudo amiga!

À Dra. Vanda Jorgetti, pela acolhida no laboratório, pelas palavras de incentivo, pelos ensinamentos, pela simplicidade. Grande exemplo! Obrigada por tudo Dra Vanda!

À toda a equipe do LIM 16, Luciene dos Reis, Wagner Dominguez, Ivone Braga, Luzia Furukawa e todos

Aos que fazem o Programa de Pós-Graduação da Disciplina de Nefrologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Aos colegas da Disciplina de Nefrologia do HCFMUSP

À Eliana, secretária da Nefrologia, a quem tanto perturbei.... Parabéns pelo seu trabalho.

Ao professor Natal e à amiga Rosilene pelo grande auxílio na estatística.

À querida Lucimary Castro que disponibilizou todas as biópsias do hospital Pequeno Príncipe para que o nosso estudo pudesse ser realizado. Obrigada Lu!

À toda minha família, minhas cunhadas e cunhados, meus sobrinhos, primos e amigos.

Agradeço a Deus por tudo e por todos!

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de abreviaturas
Lista de tabelas
Lista de figuras
Resumo
Summary

1-INTRODUÇÃO 1

1.1-Doença Renal Crônica em Pediatria 1

1.2-Distúrbios do Metabolismo Mineral e Ósseo da Doença Renal Crônica..... 5

1.3-Distúrbios do Metabolismo Mineral e Ósseo da Doença Renal Crônica em Crianças e Adolescentes (DMO-DRCp) 7

1.4-Diagnóstico das alterações ósseas na DRCp..... 8

1.5-Biópsia óssea e Histomorfometria na DRCp 11

1.6 Estudos de Biópsia óssea em DRCp 14

2-OBJETIVOS 23

2.1- Objetivo Primário 23

2.2 Objetivos Secundários 23

3-CASUÍSTICA E MÉTODOS 25

3.1 Critérios de Inclusão 25

3.2 Critérios de Exclusão 25

3.3 Avaliação dos Aspectos Clínicos 25

3.4 Exames laboratoriais 26

3.5 Densitometria óssea 26

3.6 Biópsia Óssea..... 27

3.7 Histomorfometria 27

3.7.1 Parâmetros Estruturais..... 28

3.7.2 Parâmetros Estáticos de Formação Óssea 28

3.7.3 Parâmetros Estáticos de Reabsorção 29

3.7.4 Parâmetros Dinâmicos 29

3.8 Classificação pelo sistema TMV 29

3.9 Avaliação Estatística 30

3.10 Avaliação do Comitê de Ética e Pesquisa 31

4-RESULTADOS 33

4.1 Características Clínicas dos Pacientes 33

4.2 Dados Laboratoriais dos Pacientes 35

4.3 Biópsia óssea 36

4.3.1 Comparação da histomorfometria óssea com dados normais brasileiros . 36

4.3.2 Classificação pelo sistema TMV 38

4.3.3 Densitometria óssea e histomorfometria 42

4.3.4 Relação entre dados demográficos, clínicos, laboratoriais, DXA, e classificação TMV 43

4.3.5 Capacidade do PTH e da FA para prever a condição do TMV 51

5-DISCUSSÃO 56

6-CONCLUSÕES 69

7-REFERÊNCIAS 71

8- APÊNDICE 83

Lista de abreviaturas

ASBMR *American Society for Bone and Mineral Research*

BFR/BS Taxa de formação óssea (do inglês, *bone formation rate*)

BV/TV Volume trabecular (do inglês, *bone volume* / *tissue volume*)

CAKUT Anomalias congênitas do rim e do trato urinário (do inglês (*congenital anomalies of the kidney and the urinary tract*)

DMO Densidade mineral óssea (do inglês *bone mineral density*)

DMO-DRC Distúrbios do Metabolismo Mineral e Ósseo da Doença Renal Crônica

Dp Desvio-Padrão

DRC Doença Renal Crônica

DRCp Doença Renal Crônica Pediátrica

DXA Absortometria de raio-x de dupla energia (do inglês, *dual energy x-ray absortiometry*)

ES/BS Superfície de reabsorção (do inglês, *eroded surface*)

FGF-23 Fator de Crescimento do Fibroblasto 23

FMUSP Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HC Hospital das Clínicas

HPTS Hiperparatireodismo Secundário

HR-pQCT Tomografia Computadorizada Quantitativa de Alta Resolução

IC Intervalo de Confiança

KDIGO *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*

LIM Laboratório de Investigação Médica

MAR Taxa de aposição mineral (do inglês, *mineral aposition rate*)

Micro-CT Micro Tomografia Computadorizada

Mlt Tempo de mineralização (do inglês, *mineralization lag time*)

NKF-KDOQI *National Kidney Foundation / Kidney Disease Outcomes Quality Initiative)*

O.Th Espessura osteoide (do inglês, *osteoid thickness*)

Ob.S/BS Superfície osteoblástica (do inglês, *osteoblast surface*)

Oc.S/BS Superfície osteoclástica (do inglês, *osteoclast surface*)

OS/BS Superfície osteoide (do inglês, *osteoid surface*)

OV/BV Volume osteoide (do inglês, *osteoid volume*)

pmpic Por milhão da população com idade compatível

ppm Por milhão da população

pQCT Tomografia Computadorizada Quantitativa Periférica

PTH Paratormônio

RFG Ritmo de Filtração Glomerular

SBN Sociedade Brasileira de Nefrologia

Tb.N Número trabecular (do inglês, *trabecular number*)

Tb.Sp Separação trabecular (do inglês, *trabecular separation*)

Tb.Th Espessura trabecular (do inglês, *trabecular thickness*)

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TXR Transplante Renal

USRDS *United States Renal Data System*

Lista de tabelas

Tabela 1- Ritmo de filtração glomerular normal para crianças e adultos jovens.....3

Tabela 2- Estudos de biópsias ósseas em crianças e adolescentes 18

Tabela 3- Estudos de biópsias ósseas em crianças e adolescentes com a classificação TMV 20

Tabela 4- Características dos pacientes.....35

Tabela 5- Dados laboratoriais dos pacientes.....36

Tabela 6- Comparação da histomorfometria óssea estática com dados normais brasileiros.....38

Tabela 7- Dados histomorfométricos dos pacientes, tipo de osteodistrofia renal e classificação TMV 41

Tabela 8- Características clínicas, laboratoriais e parâmetros histomorfométricos (TMV) dos pacientes com densidade mineral óssea abaixo da média esperada para a idade pela DXA 42

Tabela 9- Parâmetros clínicos e laboratoriais de acordo com a remodelação óssea 43

Tabela 10- Parâmetros clínicos e laboratoriais de acordo com a mineralização óssea 44

Tabela 11- Parâmetros clínicos e laboratoriais de acordo com o volume ósseo 45

Tabela 12-Comparação da histomorfometria e dados laboratoriais de crianças e adolescentes de acordo com a etiologia da DRC.....46

Tabela 13- Comparação da histomorfometria, dados clínicos e laboratoriais de crianças e adolescentes de acordo com a idade ≤ 12 anos e > 12 anos 47

Tabela 14- Comparação da histomorfometria e dados laboratoriais de crianças e adolescentes de acordo com o sexo 48

Tabela 15- Comparação da histomorfometria, dados clínicos e laboratoriais de crianças e adolescentes de acordo com a modalidade de diálise.....49

Tabela 16- Comparação da histomorfometria, dados clínicos e laboratoriais de crianças e adolescentes de acordo com a raça 50

Lista de figuras

Figura 1- Critérios de exclusão das biópsias.....33

Figura 2- Distribuição dos pacientes de acordo com a classificação TMV 40

Figura 3- Gráfico de dispersão do PTH e da FA com a taxa de formação óssea e o volume osteóide 52

Figura 4- Curva ROC de biomarcadores para previsão de baixa remodelação 53

Figura 5- Curva ROC de biomarcadores para previsão de mineralização anormal..54

RESUMO

Soeiro EMD. *Padrão histomorfométrico de biópsias ósseas em crianças e adolescentes com doença renal crônica em programa de diálise* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Os distúrbios minerais ósseos em crianças com DRC resultam em aumento do risco de fraturas, déficit de crescimento, baixa qualidade de vida e morte. A biópsia óssea é o padrão ouro para o diagnóstico de osteodistrofia renal (OR). No entanto, esforços têm sido feitos na tentativa de usar biomarcadores circulantes, bem como técnicas de diagnóstico por imagem. O objetivo deste trabalho foi caracterizar os parâmetros da biópsia óssea e sua relação com características clínicas, marcadores bioquímicos e densitometria (DXA) em crianças com DRC. Quarenta e dois pacientes, com média de idade de 11,3 ± 4,3 anos com DRC 5D, foram submetidos à biópsia óssea. Dados demográficos, clínicos e bioquímicos e DXA foram obtidos naquele momento. Baixa remodelação óssea estava presente em 59% dos pacientes, mineralização anormal em 29%. Volume ósseo alto e baixo estavam presentes em 19% e 7% dos pacientes, respectivamente. Maior taxa de formação óssea foi encontrada em pacientes não brancos, enquanto mineralização anormal ocorreu em crianças mais velhas (13,4 ± 3,5 versus 10,5 ± 4,4 anos; p = 0,05) e mais baixas (-3,4 ± 1,5 vs. -2,2 ± 1,7 escore Z altura/idade; p = 0,04). Não houve diferença nos parâmetros histomorfométricos entre os pacientes quanto ao sexo, idade e etiologia da doença. O escore Z da DXA mostrou correlação inversa com o volume osteóide (OV/BV) (r = -0,52; p <0,001) e superfície osteóide (OS/BS) (r = -0,34; p = 0,04). O PTH e a fosfatase alcalina (FA) apresentaram correlação positiva com a remodelação óssea. Na análise da curva ROC, o PTH e o cálcio foram capazes de prever baixa remodelação (AUC 0,74, sensibilidade 0,60 e especificidade 0,88). O PTH e a FA também previram mineralização anormal (AUC 0,75, sensibilidade 0,67 e especificidade 0,90) e (AUC 0,72, sensibilidade 0,58, e especificidade 0,93). Embora o PTH e o FA estivessem associados à remodelação e à mineralização, reconhecemos a limitação de seu desempenho para distinguir claramente alta e baixa remodelação, e mineralização normal da mineralização anormal. Nossos resultados reforçam a necessidade de expandir o conhecimento sobre osteodistrofia renal na população pediátrica por meio de estudos prospectivos de biópsia óssea.

Descritores: Insuficiência renal crônica; Doenças ósseas metabólicas; Hiperparatireoidismo secundário; Biopsia; Criança.

SUMMARY

Soeiro EMD. Histomorphometric pattern of bone biopsies in children and adolescentes with chronic kidney disease in dialysis program [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Bone mineral disorders in children with CKD results in increased risk of fractures, growth failure, low quality of life and death. Bone biopsy is the gold standard for the diagnosis of renal osteodystrophy (RO). Efforts have been made in the attempt to use circulating biomarkers, as well as diagnostic imaging techniques. The objectives of this study were to characterize bone biopsy parameters and their relationship to clinical features, biochemical markers, as well as densitometry (DXA) in children with CKD. Forty-two patients, mean age 11.3±4.3 with 5D CKD, underwent bone biopsy. Demographic, clinical and biochemical data, and DXA were obtained at that time. Low bone turnover was present in 59% of patients, abnormal mineralization in 29%. High and low bone volume was present in 19% and 7% of patients, respectively. Higher bone formation rates were found in non-Caucasian patients, while abnormal mineralization occurred in older (13.4 ± 3.5 versus 10.5 ± 4.4 years; $p = 0.05$) and shorter children (- 3.4 ± 1.5 vs. -2.2 ± 1.7 Z score height / age; $p = 0.04$). There was no difference in histomorphometric parameters between patients regarding gender, age and disease etiology. DXA Z-score showed an inverse correlation with osteoid volume (OV / BV) ($r = -0.52$; $p < 0.001$) and osteoid surface (OS / BS) ($r = -0.34$; $p = 0.04$). PTH and an alkaline phosphatase (AP) were positively correlated with bone turnover. In the ROC analysis curve, PTH and calcium were able to predict low turnover (AUC 0.74, sensitivity 0.60 and specificity 0.88). PTH and AP also prevent abnormal mineralization (AUC 0.75, sensitivity 0.67 and specificity 0.90) and (AUC 0.72, sensitivity 0.58, and specificity 0.93) Albeit PTH and AP were associated with turnover and mineralization, we recognize the limitation of their performance to clearly distinguish high from low turnover and normal from abnormal mineralization. Our results reinforce the need to expand knowledge about renal osteodystrophy in the pediatric population through prospective bone biopsy studies.

Descriptors: Renal, insufficiency chronic; Bone diseases, metabolic; Hyperparathyroidism, Secondary; Biopsy; Child.

INTRODUÇÃO

1-INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é um importante problema de saúde pública mundial, não somente devido aos altos índices de morbidade e mortalidade, como também pelo aumento da incidência e da prevalência observado nos últimos anos. Em 1990, a doença representava o 27º lugar entre as principais causas de mortes globais; em 2010, o 18º lugar, e em 2012, ocupava o 14º lugar, o que corresponde a uma taxa de 12,2/100.000 indivíduos[1, 2].

A incidência e a prevalência da DRC variam ao redor do mundo. No Brasil, o censo de 2017 aponta 126.583 pacientes com DRC em tratamento dialítico, com uma prevalência de 610 pacientes por milhão da população (pmp) e uma incidência 193 pmp. A taxa de mortalidade dos pacientes naquele ano foi de 18,5%, de acordo com os dados da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) [3].

1.1-Doença Renal Crônica em Pediatria

Em relação à doença nos adultos, o número de casos de DRC na faixa etária pediátrica (DRCp) é proporcionalmente menor. No entanto, crianças com DRC apresentam taxas de mortalidade 30 vezes maiores quando comparadas à mortalidade daquelas sem doença renal e representam um desafio para o sistema de saúde[4]

Nos Estados Unidos, o sistema de dados *United States Renal Data System* (USRDS) mostrou uma incidência de 1.398 casos novos de DRCp e uma prevalência de 9.721 crianças acometidas em 2014. Naquele ano, a incidência variou de 6,8 por milhão para o grupo etário de cinco a nove anos, a 30,6 por milhão na faixa etária de 18 a 21 anos. No período de 2009 a 2013, os dados americanos

apresentaram uma taxa ajustada de mortalidade de 32/1.000 doentes/ano, sendo as complicações cardiovasculares as principais causas de morte, seguidas pelas infecções [5]. Dados da Europa mostram uma incidência de 11 a 12 pacientes por milhão da população com idade compatível (pmpic) nos estágios 3 a 5 da DRCp e de 8 pmpic para os estágios 4 e 5 de DRCp [6]. Na Austrália e na Nova Zelândia, a incidência de DRCp dialítica é de 8 pmpic e a prevalência de 45 pmpic [7]. Na América Latina (Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, México, Uruguai e Venezuela), estudo mostrou uma ampla variação na incidência, de 2,8 a 15,8 pmpic [8] . No Brasil, em 2005, estudo realizado no Estado do Rio de Janeiro encontrou uma prevalência de DRCp dialítica de 24 pmpic [9] e em 2007 Koch e cols. apontaram uma prevalência estimada de 23,4 casos pmpic em pacientes menores de 20 anos no estado de São Paulo [10]. Outro estudo que englobou as cinco regiões brasileiras mostrou um total de 1.283 pacientes pediátricos em tratamento de diálise crônica em 2012, resultando em uma prevalência de 20 casos pmpic e uma incidência de 6,6 casos pmpic naquele ano [11]. Este estudo mostrou uma diferença de dados regionais e estima-se que este fato seja devido, principalmente, à falta de diagnóstico da doença.

Os dados epidemiológicos sobre a DRCp são escassos e a maior parte dos registros são de pacientes em estágio avançado da doença, em unidades de diálise [6]. Possíveis razões para a escassez de dados podem ser devido aos métodos para medir ou estimar o ritmo de filtração glomerular (RFG), à ausência de definição e classificação da DRCp até 2002 e às dificuldades com relação ao diagnóstico de DRCp em menores de dois anos de idade [6].

Em 2012, o grupo de trabalho internacional para doença renal crônica (KDIGO- *Kidney Disease Improving Global Outcomes*), revisou a classificação do (NKF-KDOQI *National Kidney Foundation / Kidney Disease Outcomes Quality*

Initiative) de 2002 e determinou diretrizes para a definição da DRCp, como descreveremos a seguir[12, 13].

Para crianças maiores de dois anos de idade o diagnóstico da DRCp segue os mesmos critérios dos adultos, ou seja: RFG inferior a 60 mL / min por 1,73 m^2 por mais de três meses, independentemente de outros marcadores de DRC ou RFG maior que 60 mL/min por 1,73m^2, acompanhada de evidência de danos estruturais ou outros marcadores de alterações funcionais incluindo proteinúria, albuminúria, distúrbios tubulares renais ou alterações histológicas ou inferidas por exames de imagem. Para esta faixa etária, a diretriz do KDIGO classifica a DRCp com base no RFG em cinco estágios, semelhantes ao adulto[12].

Para crianças menores de dois anos de idade esta definição não se aplica, posto que o RFG normal é menor, aumenta progressivamente com a maturação renal e se aproxima do valor médio do adulto somente ao final deste período[14]. Vale salientar que a estimativa do RFG com base na creatinina sérica em crianças deve levar em consideração a faixa etária, o método de aferição da creatinina [15, 16]. e deve ser comparada com os valores normativos apropriados à idade. [17] (Tabela 1)

Tabela 1- Ritmo de filtração glomerular normal para crianças e adultos jovens

Idade	(Sexo)	RFG (mL/min/1.73m^2)
1 semana	(M/F)	40,6 ± 14,8
2 a 8 semanas	(M/F)	65,8 ± 24,8
>8 semana	(M/F)	95,7 ± 21,7
2 a 12 anos	(M/F)	133,0 ± 27,0
13 a 21 anos	(M)	140,0 ± 30,0
13 a 21 anos	(F)	126,0 ± 22,0

M: masculino; F: feminino; RFG: ritmo de filtração glomerular; Dados expressos em média ± Dp

Além disso, para recém-nascidos e lactentes até os três meses de idade, não se leva em consideração o tempo, na classificação de DRCp. Portanto, para crianças menores de dois anos de idade, a DRCp é classificada de acordo com o desvio-padrão do RFG normal para a idade: DRCp moderada - RFG >1dp e < 2dp e DRCp severa - RFG > 2dp abaixo da média do RFG recomendado para a faixa etária [12].

Do ponto de vista etiológico, a DRC é bastante diferente entre adultos e crianças. Enquanto nos primeiros predominam a hipertensão e o diabetes, nestes as anomalias congênitas do rim e do trato urinário (CAKUT) representam 48% dos casos, as glomerulopatias primárias 14%, ao passo que as nefropatias hereditárias contribuem com 10%. A distribuição das etiologias varia com a idade. A DRCp por CAKUT predomina em crianças mais jovens, e em crianças maiores de 12 anos as glomerulopatias são mais comuns [6].

Além da problemática comum aos adultos, essas crianças e adolescentes acometidos pela DRCp apresentam problemas específicos como a baixa estatura, que é uma das sequelas mais significativas a longo prazo da infância e determina impedimento para o bem-estar psicológico, qualidade de vida e integração social na vida adulta. Vale ressaltar que, em crianças, o crescimento é um dos marcadores mais importantes de saúde. Essas crianças e adolescentes sofrem ainda de alterações cognitivas, além do absenteísmo escolar que comprometem o aprendizado, com um grande impacto sobre a independência e garantia de emprego no futuro. Portanto, a abordagem e o tratamento da DRCp são mais individualizados, mais complexos e mais dispendiosos[18, 19].

Dentre os problemas da DRCp, os distúrbios do metabolismo mineral e ósseo ocorrem precocemente no curso da doença e representam importante causa

de morbidade e mortalidade, como detalharemos no decorrer do texto.

1.2-Distúrbios do Metabolismo Mineral e Ósseo da Doença Renal Crônica

Os primeiros relatos dos distúrbios do metabolismo mineral e ósseo da doença renal crônica (DMO-DRC) datam de 1915, quando Davies e cols. descreveram a osteíte fibrosa cística. Posteriormente em 1930, Bauer e cols. associaram os achados de Davies à hiperatividade da glândula paratireoide. O grupo de Albright em 1937 demonstrou que a retenção de fósforo e a concomitante redução de cálcio sérico em pacientes com doença renal crônica poderiam causar hiperplasia da glândula paratireoide e osteíte fibrosa renal, ou seja, a osteodistrofia renal[20]. No final da década de 60, Slatopolsky e Bricker propuseram a clássica teoria do "*trade-off*". Os autores propunham que a perda da função renal comprometeria a excreção de fósforo de forma evolutiva, levando à hiperfosfatemia e consequente hipocalcemia. Esta, por sua vez levaria ao aumento da produção de paratormônio (PTH), o que aumentaria a fosfatúria, levando os níveis séricos de fósforo de volta para valores dentro da faixa da normalidade. A piora progressiva da função renal associada aos elevados níveis de PTH, levaria à instalação do hiperparatireodismo secundário (HPTS) [21]. Anos se passaram, até que por volta do ano 2000, a identificação do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23), um hormônio produzido pelos osteócitos, e do gene Klotho, um co-receptor para o FGF-23, mudou a interpretação da historia natural dos DMO-DRC [22, 23].

Um estudo com cerca de 4000 indivíduos com DRC, mostrou elevação dos níveis de FGF-23 em estágios iniciais da doença, antes mesmo da hiperfosfatemia e da elevação do PTH; e níveis progressivamente mais elevados à

medida que a doença progride. O mesmo estudo sugeriu que a lesão renal possa ser o estímulo inicial para a secreção de FGF-23 no início da DRC, por aumento da produção de fator que estimula a secreção do FGF-23 ou por diminuição da expressão de um inibidor [24]. Com o aumento do FGF-23, hormônio que contra-regula a síntese de calcitriol, há uma diminuição nos níveis deste hormônio, e aumento da secreção de PTH, levando ao HPTS. Altos níveis de FGF-23 e baixos níveis de calcitriol reduzem ainda mais a expressão de Klotho no rim e na paratireoide, e podem explicar a falta de supressão do PTH, apesar da elevação do FGF-23. A desregulação do eixo endócrino FGF-23-Klotho com manutenção deste ciclo vicioso aumenta a resistência da paratireoide e do rim, aumentando ainda mais o FGF-23, diminuindo a vitamina D, e aumentando o PTH [25].

Desde os estudos iniciais no início do século XX, acreditava-se que as alterações ósseas na DRC eram resultantes dos distúrbios do metabolismo mineral e hormonal da doença. Nos últimos anos entretanto, essa percepção mudou e o osso é visto como um órgão endócrino que desempenha um papel ativo nas alterações metabólicas e também nas complicações cardiovasculares que ocorrem com a progressão da DRC [26]. Assim, considerando as características sistêmicas dos distúrbios minerais e ósseos, em 2006 o KDIGO recomendou que o termo "osteodistrofia renal" fosse utilizado exclusivamente para definir a patologia óssea associada a DRC e que se utilize o termo Distúrbios Mineral e Ósseo da Doença Renal Crônica (DMO-DRC). Assim, DMO-DRC pode ser definido como uma alteração sistêmica do metabolismo mineral ósseo, que se manifesta: 1) por alterações do cálcio , do fósforo , da vitamina D e do PTH; 2) por anormalidades na remodelação óssea, na mineralização, no crescimento linear, no volume, ou na

resistência óssea; 3) e pela presença de calcificação vascular e de outros tecidos moles [27, 28].

1.3-Distúrbios do Metabolismo Mineral e Ósseo da Doença Renal Crônica em Crianças e Adolescentes (DMO-DRCp)

Em crianças e adolescentes, os distúrbios no metabolismo mineral e ósseo ocorrem precocemente no curso da DRCp [29]. As alterações nos parâmetros bioquímicos e na biologia vascular levam a formação de calcificações vasculares, que contribuem para a doença cardiovascular, principal causa de mortalidade nas crianças e adolescentes acometidas pela DRCp [30].

Com relação às manifestações ósseas, essas crianças apresentam alterações na mineralização, na modelação e na remodelação que comprometem o acúmulo e a deposição mineral no osso, e portanto, na massa, na arquitetura e na força óssea[31]. Tais comprometimentos resultam em risco aumentado de fraturas, dor, deformidades ósseas, déficit de crescimento e afetam a qualidade de vida dessas crianças e adolescentes [32].

Estudos demonstram que crianças com DRC têm uma taxa de morbidade óssea muito maior do que seus pares saudáveis, bem como maior incidência de fraturas, que pode ser até 3 vezes maior [33, 34].

Além disso, a morbidade e mortalidade óssea da DRCp continuam na vida adulta. Uma coorte de 249 adultos jovens com início de insuficiência renal avançada na pré-adolescência e acompanhados até a idade adulta, mostrou que 61% apresentavam grave comprometimento de crescimento, 37% sintomas de doença óssea (deformidades, dor óssea, necrose óssea asséptica e fraturas atraumáticas) e 18% eram deficientes físicos em decorrência da doença óssea [34, 35].

Até metade das pessoas com DRCp não atingem a altura geneticamente pré-determinada e apresentam baixa estatura significativa [36].

Um estudo identificou menor densidade mineral óssea em 170 crianças e jovens de até 21 anos com DRC 2-5 e em diálise. Destes, 6,5% sofreram alguma forma de fratura durante o acompanhamento em um ano de estudo (incidência de 556 / 10.000 pessoas-ano). Os fatores associados ao risco de fratura foram período de crescimento rápido na adolescência, juntamente com níveis mais baixos de cálcio e uma densidade mineral óssea menor que a basal, conforme identificado pela tomografia computadorizada quantitativa periférica (pQCT) [33]. Essas alterações não se modificam mesmo após o transplante renal, mantendo uma incidência seis vezes maior de fraturas em geral, mas particularmente fraturas vertebrais (160 vezes) em comparação com pares saudáveis [37, 38].

Estudo prospectivo recente avaliou a taxa de fraturas em 537 crianças com DRC. Encontrou relatos de 395/10.000/ano para o sexo masculino e 323/10.000/ano para o sexo feminino, cerca de 2,4 e 3 vezes mais altas, respectivamente, que as taxas específicas por sexo em crianças e adolescentes saudáveis [33, 39].

1.4-Diagnóstico das alterações ósseas na DRCp

Tendo em vista a elevada morbidade das alterações ósseas na DMO-DRCp, o diagnóstico desse acometimento é de suma importância. As diretrizes atuais recomendam avaliar a remodelação e a mineralização; para tanto, a biópsia óssea é o padrão-ouro para o diagnóstico de osteodistrofia renal (OR).

Por ser uma técnica invasiva, esforços têm sido realizados na tentativa de se utilizar biomarcadores circulantes que possam refletir a remodelação óssea,

assim como técnicas de diagnóstico por imagem que possam refletir a histomorfometria óssea nesses pacientes [40]. Os métodos mais utilizados são a absortometria de raio-x de dupla energia (DXA) e a tomografia computadorizada periférica (pQCT).

Embora amplamente disponível e fácil de usar, a DXA permite apenas imagens em duas dimensões (2D) do osso e não consegue distinguir o osso cortical do osso trabecular. Além disso, diferentes composições corporais podem distorcer os resultados, ou seja, subestimar a alteração óssea em uma criança pequena, ou superestimar em uma criança maior [41]. Assim sendo, para compensar essas distorções, os resultados da DXA, são apresentados em escores ajustados para idade ou para o tamanho. Apesar dessas limitações, a Sociedade Internacional de Densitometria Clínica sugere que há um papel para a DXA na avaliação da doença óssea em crianças com DRC [42].

A pQCT é uma técnica tridimensional (3D) que mede a densidade mineral óssea volumétrica, as dimensões do osso cortical e estima a força óssea. Exige doses de radiação muito menores que a DXA. Permite medir a densidade mineral óssea cortical e/ou trabecular, independente do tamanho do paciente. Embora a pQCT seja capaz de discriminar entre osso trabecular e o osso cortical, e forneça detalhes em relação à densidade e a geometria cortical, a pQCT não tem resolução suficiente para fornecer informações detalhadas sobre a microarquitetura trabecular [43]. Lima e cols, em estudo por pQCT com 21 crianças e adolescentes com idade média de 16 anos em diálise peritoneal, observaram menor densidade mineral óssea cortical e densidade mineral óssea trabecular aumentada, quando comparados com indivíduos saudáveis. O referido estudo mostrou uma correlação inversa entre a densidade mineral óssea trabecular e a idade, a altura e o peso dos pacientes,

enquanto que a densidade mineral óssea cortical mostrou uma correlação direta com esses parâmetros [44].

Mais recentemente, a tomografia computadorizada quantitativa de alta resolução (HR-pQCT) permite, além da avaliação da densidade mineral óssea cortical e trabecular, uma visão ainda mais detalhada da microarquitetura óssea trabecular, que possibilita a medida do número, da espessura e da separação das trabéculas ósseas [41]. Estudo em pacientes adultos em diálise submetidos a biópsia óssea e a HRpQCT mostrou que o número, a separação e a espessura trabecular obtidos pela HRpQCT e pela biópsia óssea correlacionaram-se entre si; e que os pacientes com porosidade cortical na histomorfometria óssea apresentaram menor densidade cortical no rádio distal. No entanto, uma limitação da HRpQCT é não poder ver os componentes dinâmico e celulares vistos à histomorfometria [45]. Em 2011 Bacchetta e cols. estudaram a densidade mineral e a microarquitetura óssea por HRpQCT em 22 crianças e adolescentes com DRC. Os autores não encontraram diferenças nos parâmetros ósseos estudados quando comparados com o grupo controle de crianças saudáveis, seja com relação ao estágio da DRC, ou quanto a faixa etária dos pacientes avaliados. Reforçaram que os resultados deveriam ser analisados com cautela, tendo em vista o pequeno número de pacientes e sugeriram novos estudos [46].

Estudo recente mostrou que a mineralização óssea pode ser estimada pela micro tomografia computadorizada (μ-CT) em pacientes pediátricos com DRC em diálise [40]. No entanto, este estudo comparou dados histomorfométricos ósseos com a tomografia computadorizada de núcleos de biópsias ósseas transilíacas, que também necessita do procedimento de biópsia óssea, tornando este achado um tanto redundante.

Estudos estão sendo realizados na tentativa de se estabelecer um método não invasivo; no entanto, até o presente momento, o melhor método para diagnóstico da OR ainda é a biópsia óssea [47, 48]. Avaliar, prever e prevenir o risco de fraturas em crianças com DRC exige a necessidade de medição e monitoramento precisos da mineralização óssea e da OR. Se faz necessário estudar o que pode ser modificável para garantir uma melhor qualidade óssea e reduzir a morbidade dessas crianças acometidas. Do exposto, reconhece-se que a biópsia óssea ainda é o padrão-ouro na avaliação da dinâmica óssea.

1.5-Biópsia óssea e Histomorfometria na DRCp

A biópsia óssea é um procedimento seguro, bem tolerado, associado a baixa morbidade e sem mortalidade. Em um estudo com 9.000 biópsias ósseas, as complicações ocorreram em 0,6% dos pacientes, e a complicação mais temida, a dor, ocorreu em 0,2% dos casos [49]. A biópsia óssea ajuda compreender a fisiopatologia e o curso da doença óssea, relacionar os achados histológicos com sintomas clínicos de dor, fratura, deformidades ósseas e determinar se os tratamentos são eficazes. A avaliação da biópsia óssea pode ser qualitativa, e/ou quantitativa, esta última chamada histomorfometria. A análise histomorfométrica de amostras de biópsia óssea não descalcificada avalia parâmetros estruturais, incluindo o volume ósseo trabecular (osso mineralizado e não mineralizado), elementos celulares (osteoblastos e osteoclastos) e fibrose. Além disso, as medidas dinâmicas de formação óssea, do tempo de maturação osteóide e do tempo de latência da mineralização, realizadas através da marcação pelos compostos da tetraciclina ampliam as informações fornecidas por este método diagnóstico.

Atualmente todas estas medidas seguem as recomendações da *American Society Bone Mineral Research* (ASBMR)[50].

A análise histomorfométrica resulta no diagnóstico do tipo histológico da OR. Tradicionalmente os tipos de OR são definidos com base nos parâmetros de remodelação e mineralização óssea, e são eles:

1- Osteíte fibrosa (OF): doença que se caracteriza por remodelamento ósseo aumentado e mineralização normal.

2- Doença mista (DM) que combina o aumento da remodelação óssea com alteração na mineralização.

3-Doença óssea adinâmica (DOA): doença de baixa remodelação, com mineralização normal

4- Osteomalácia (OM) doença de baixa remodelação e mineralização anormal [28].

É importante ressaltar que, mesmo que a remodelação (T- *turnover*) esteja normal, as alterações na mineralização e no volume ósseo podem se traduzir por desfechos como deformidades ósseas, fraturas, e retardo de crescimento [32]. A partir de 2006, portanto, as diretrizes do KDIGO recomendaram que a classificação da OR tivesse como base parâmetros de remodelação (***T****urnover*), **M**ineralização e **V**olume: o sistema TMV [27]. Estes três componentes (T, M e V) devem ser analisados de forma independente para caracterizar o diferente subtipo de OR. Assim sendo, o KDIGO sugere que:

1- Para a remodelação, (***T****urnover*) se utilize parâmetros histomorfométricos de formação óssea, de reabsorção óssea e presença de fibrose.

2- Para a **M**ineralização que se avalie parâmetros de maturação osteóide e o tempo de mineralização, ambos dependentes da espessura do osteóide.

3- Finalmente o **V**olume ósseo, que é o resultado das taxas de formação e reabsorção e pode contribuir para a fragilidade óssea [28].

A histomorfometria óssea é crucial para estudos moleculares e celulares. Novas técnicas de preparação óssea hoje nos permitem estudar a biologia dos osteócitos através da expressão de proteínas, o que contribui para uma melhor compreensão da fisiopatologia do metabolismo ósseo e até mesmo para a identificação de novas vias metabólicas [51]. No processo de remodelação, a formação óssea acontece inicialmente através da deposição de uma matriz proteica (matriz osteóide). Posteriormente, a deposição mineral de cálcio e de fósforo sobre esta matriz produz o osso mineralizado, constituído de cristais de hidroxiapatita. Esta etapa inicial é realizada pela atividade dos osteoblastos através de mecanismos de sinalização celular. Algumas proteínas envolvidas neste processo estão implicadas na fisiopatologia e na progressão da doença mineral óssea na DRC [52]. Até pouco tempo, os osteócitos eram considerados células senescentes e inertes. Com a descoberta de várias proteínas e de suas funções, ficou claro o papel exercido por estas células na fisiologia óssea e na comunicação entre os diferentes segmentos desse tecido [53, 54].

Dados demonstram alteração na função dos osteócitos e sugerem que as vias de sinalização e maturação dos osteócitos desempenham um papel na patogênese da OR. Esses conceitos podem, no futuro, mudar os paradigmas que descrevem a patogênese da OR em termos das alterações de cálcio, fósforo e PTH [55].

Apesar da biópsia óssea ser uma ferramenta fundamental na avaliação da OR, não é um procedimento realizado rotineiramente em crianças com DRC, provavelmente pelo caráter invasivo, pela necessidade de equipamentos

especializados e pela falta de treinamento técnico para interpretar as amostras ósseas. Sendo assim, dispomos de poucos estudos sobre a OR na pediatria [56, 57].

1.6 Estudos de Biópsia óssea em DRCp

Em 1980, Norman e cols estudaram 29 crianças e adolescentes entre dois e 18 anos de idade, com RFG entre 25 a 50% dos valores normais para a idade. Observaram OF em seis crianças, OM em 7, e DM em 11. Desse total, 12 pacientes apresentavam defeito de mineralização. Chamou a atenção a associação entre o retardo de crescimento e a presença de alterações histológicas antes mesmo do aparecimento de alterações bioquímicas e com comprometimento apenas moderado da função renal [58].

Em 1982, Hodson e cols estudaram 47 crianças menores de um ano a 17 anos de idade, com RFG < 80ml/min/1,73m^2, sendo 23 delas com RFG <20 ml/min/1,73m^2. Vinte e uma crianças apresentaram biópsias normais, e entre as 26 crianças com doença óssea, 11 apresentaram OF, 7 mostraram OM e 8 não foram classificadas. As alterações ósseas neste estudo foram observadas apenas naquelas crianças com RFG abaixo de 30 ml/min/1,73m^2. O PTH não se mostrou um bom marcador da doença óssea, uma vez que foram observados níveis elevados em 48% das crianças sem doença óssea significativa. Os resultados do estudo enfatizaram o valor da histologia na detecção de doença óssea [59].

Em 1988, Salusky e cols [60] estudaram pela primeira vez, biópsia óssea de crianças, em diálise peritoneal. O estudo envolveu 44 pacientes com média de idade de 12 ± 6 anos. Observaram OF em 28 crianças, DOA em 5, OM em 4, e biópsia óssea normal em 7. Embora os valores séricos médios do PTH intacto fossem duas a três vezes maiores nos pacientes com OF do que nas outras lesões

histopatológicas, não houve diferença entre os grupos. O mesmo ocorreu com relação aos níveis séricos de cálcio, de fósforo e de fosfatase alcalina.

Este mesmo grupo mais tarde, estudou crianças em hemodiálise, com média de idade de 17,5 ± 1,5 anos. Das 21 biópsias ósseas avaliadas, 8 mostraram doença de alta remodelação (OF) e 10 apresentaram doença de baixa remodelação (DOA em 6, OM em 4). Em 3 crianças a histologia foi normal. Quanto aos parâmetros bioquímicos, os níveis séricos de PTH se correlacionaram diretamente com a histologia e inversamente com os níveis séricos de cálcio. Oito de nove pacientes com níveis de PTH acima de 125 pg/ml apresentavam OF e todos os pacientes com cálcio sérico menor que 10 mg/dl e PTH >125 pg/ml tinham OF ou DM [61].

Em 1994, Salusky e cols, revisaram os dados histomorfométricos e bioquímicos de todos os pacientes pediátricos em diálise peritoneal que foram submetidos a biópsia óssea na instituição entre 1983 e 1992. Reviram 68 biópsias ósseas de 55 pacientes com média de idade de 13 ± 5 anos, sendo OF em 40, DOA em 15 e 13 crianças com biópsia óssea normal. Observaram que a combinação do nível sérico de PTH> 200 pg/ml e de cálcio <10 mg/dl foi 85% sensível e 100% específico para identificar pacientes com lesões ósseas de alta remodelação; e valores de PTH <150 pg/ml e de cálcio sérico> 10 mg/dl associados, foram 100% sensíveis e 92% específicos para predizer DOA [62].

Posteriormente, o grupo de Salusky estudou 47 crianças submetidas a transplante renal. A média de idade dos pacientes foi 12 anos, variando de 4 a 20 anos. Dos pacientes estudados, 31 apresentaram biópsia óssea normal, 11 doença de alta remodelação e 5 revelaram DOA. Nenhum dos pacientes apresentava fibrose peri-trabecular ou medular. Vinte e quatro pacientes já haviam realizado uma biópsia

óssea no período em que estiveram em diálise peritoneal, e na comparação com a biópsia realizada após o transplante renal, houve uma melhora substancial. Os níveis séricos de PTH não apresentaram boa correlação com a histologia óssea [63].

O estudo de Ziólkowska e cols. em 51 crianças com idade de 11,5 ± 2,9 anos, em diálise peritoneal ou hemodiálise, mostrou biópsia óssea normal em 37% dos casos, DOA em 27%, OF em 24%, DM em 10% e OM em 2%, sem diferença nas prevalências entre as crianças em hemodiálise ou diálise peritoneal. Embora os marcadores bioquímicos apresentassem um valor limitado para diagnóstico dos tipos de OR e da remodelação óssea, neste estudo, a prevalência de DOA foi significativamente maior nos pacientes com níveis de PTH abaixo de 50 pg/ml. Por outro lado, 75% das crianças com OF apresentaram PTH acima de 200 pg/ml [64].

Yalçgnkaya e cols. avaliaram 17 crianças com idades entre 7 e 20 anos, em diálise peritoneal. Neste estudo, a doença de alta remodelação foi a mais frequente, presente em oito pacientes (47%). Cinco pacientes (29%) apresentaram doença de baixa remodelação e quatro (24%) tinham DM. Chamou a atenção que, 7 dos nove pacientes que tiveram nefrite tubulo-intersticial apresentaram doença de alta remodelação, ao contrário daqueles com glomerulonefrite (n=4), que apresentaram doença de baixa remodelação. Níveis séricos de PTH> 200 pg/ml foram 100% sensíveis e 66% específicos para identificar doença de alta remodelação. Por outro lado, no grupo com doença de baixa remodelação foram vistos níveis séricos de cálcio mais elevados. Este autor comentou sobre a variabilidade de prevalência dos tipos OR entre os centros, e atribuiu ao fato das diferenças nos critérios diagnósticos utilizados para identificar a doença óssea. Além disso sugeriu que o risco de desenvolver doença de alta remodelação é maior em crianças com curso da progressão da DRC mais prolongado, como nas nefrites

túbulo intersticiais. Concluiu ainda, que os parâmetros bioquímicos são fracos preditores do tipo e da gravidade da doença óssea [65].

Em 2007, Andrade e cols avaliaram a histologia óssea de 20 crianças e adolescentes, com DRC em programa de diálise. Neste estudo 40% dos pacientes apresentavam doença de alta remodelação (OF) e 60% mostravam doença de baixa remodelação (OM e DOA); dados que diferem dos demais estudos internacionais. Também não foram encontradas correlações entre os dados laboratoriais e os achados de remodelação óssea [66]. Na tabela 2 apresentamos de forma esquematizada, os resultados dos estudos citados acima.

Tabela 2- Estudos de biópsias ósseas em crianças e adolescentes

Autor /Ano	n	Idade	RFG/Diálise	Biópsia Óssea
Norman 1980	29	2 a 18	<50%	3 FT 2 NL 6 OF 7 OM 11 DM
Hodson 1982	47	< 1 a17	<80ml 11DP	21 NL 11 OF 7 OM 8 NC
Salusky 1988	44	12± 6	DP	7 NL 28 OF 4 OM 5 DOA
Mathias 1993	21	17 ± 2	HD	3 NL 8 OF 6 DOA 4 DM
Salusky 1994	68	13 ± 5	DP	13 NL 40 OF 15 DOA
Sanchez 1998	47	12 ± 2	TXR	31 NL 11 OF 5 DOA
Ziotkowska 2000	51	11 ± 3	DP/HD	19 NL 12 OF 14 DOA 1 OM 5 DM
Yalçgnkaya 2000	17	13 ± 3	DP	8 DAR 5 DBR 4 DM
Andrade 2007	20	4 a 17	DP /HD	5 OF 3 DM 2 DOA 10 OM

RFG-ritmo de filtração glomerular, DP-diálise peritoneal, HD- hemodiálise, TXR-transplante renal, FT- falha técnica, NL- normal, OF-osteíte fibrosa, OM-osteomalácia, DM- doença mista, NC- não classificada, DOA- doença óssea adinâmica, DAR- doença de alta remodelação, DBR- doença de baixa remodelação.

Vale salientar que a maioria desses estudos de biópsia óssea em crianças e adolescentes com DRC foi realizada antes das novas diretrizes que sugerem avaliar a remodelação, a mineralização e o volume ósseo. Esses estudos foram classificados com foco na remodelação óssea, a maioria em estágios avançados da doença, com uma ampla faixa de variação de idade, sem comparação nas diversas faixas etárias, e alguns estudos, numa época em que não havia sistematização para analisar os parâmetros histomorfométricos. Tendo em vista que o crescimento não ocorre de forma linear, a análise histomorfométrica óssea em crianças e adolescentes deve considerar as particularidades de cada faixa etária [67,68].

Em 2008 Waller e cols. estudaram pela primeira vez a histomorfometria óssea baseada nos critérios TMV em onze crianças que iriam iniciar diálise. Dos 11 pacientes, 5 apresentavam doença de alta remodelação e 2 doença de baixa remodelação. Em 2 pacientes a remodelação era normal, e 2 pacientes não foram classificados. Quanto a mineralização, 8 pacientes mostravam alteração [69].

Em 2010, Bakaloglu e cols revisaram biópsias ósseas realizadas anteriormente na instituição entre os anos de 1990 e 2005, e aplicaram a classificação TMV. Nesta revisão de 161 pacientes pediátricos em diálise, identificaram alta prevalência de alterações na mineralização que não haviam sido observadas previamente. Reforçaram que a etiologia e as consequências clínicas dos defeitos de mineralização nestes pacientes ainda são desconhecidas. Com relação aos parâmetros bioquímicos, estabeleceram algoritmos para os níveis séricos de cálcio, de fósforo e de PTH, na tentativa de correlacionar estes marcadores com os achados histológicos. No entanto, sugeriram novos estudos para confirmar estes níveis séricos alvo [70].

Em 2012 Wesseling-Perry e cols. mostraram alterações na mineralização óssea em pacientes pediátricos, em estágio precoce da DRC e aumento da prevalência das alterações ósseas com a progressão da doença renal; respectivamente 29%, 42% e 79% para os estágios 2, 3 e 4-5 de DRC. A maioria dos pacientes nos estágio pré-diálise mostraram remodelação óssea normal. É interessante acrescentar que nos estágios 2 da DRC, os defeitos de mineralização estavam presentes, mesmo com níveis séricos de cálcio e de fósforo na faixa da normalidade. No que se refere aos marcadores séricos, a análise multivariada não mostrou qualquer correlação e os parâmetros bioquímicos não foram capazes de predizer os achados da histologia óssea, sendo a biópsia óssea o único método confiável [55]. Na tabela 3 apresentamos de forma esquematizada, os resultados dos estudos de biópsias ósseas citados acima, de acordo com a classificação TMV.

Tabela 3- Estudos de biópsias ósseas em crianças e adolescentes com a classificação TMV

Autor /Ano	n	Idade	RFG/Diálise	Biopsia óssea
Waller, 2008	11	7-16	Inicio de diálise	**T** 5A, 2B, 2N, 2ND **M** 9An, 2N **V** 11N
Bakaloglu, 2010	161	< 1- 20	Em diálise	**T** 92A 7B 62N **M** 78An 83N **V** 43A117N
Wesseling-Perry, 2012	52	2-21	Estágios 2,3,4 e 5	**T** E2 N E3 A13% E4-5 A 29% **M** E2 An 29% E3 An 42% E4-5 An 79% **V** ND

RFG ritmo de filtração glomerular; E estágio; T turnover (remodelação); M mineralização; V volume; A alto; B baixo; An anormal; N normal; ND não disponível.

A análise histomorfométrica é uma ferramenta valiosa para a pesquisa e avaliação clínica da doença óssea em pacientes com DRC [71]. Até o presente

momento, não dispomos de estudo na população pediátrica brasileira que tenha realizado a histomorfometria óssea baseada nos critérios TMV. Paralelamente, a busca por um marcador bioquímico para prever mudanças na remodelação óssea e na mineralização é contínua. Estudos na população pediátrica mostraram que o PTH sérico e FA elevados podem caracterizar uma doença de alta remodelação, enquanto o PTH e FA baixos sugerem doença óssea adinâmica[60,61,62,64]. No entanto, não há um ponto de corte para PTH e para a FA que possam prever remodelação e mineralização nessas crianças. Isso pode ser explicado pela diversidade entre os estudos com relação a idade , etiologia da doença renal, raça, modalidade de diálise e tratamento clínico [60,61,62,64,65,]. Neste estudo, avaliaremos a associação dos achados histológicos com possíveis fatores de interferência, como idade, raça e etiologia da DRC em crianças e adolescentes. Também abordaremos a capacidade dos marcadores séricos de remodelação óssea em prever a remodelação e a mineralização nessa população.

2-OBJETIVOS

2-OBJETIVOS

2.1- Objetivo Primário

Descrever o padrão histológico de biópsia óssea de crianças e adolescentes com doença renal crônica em programa de diálise, através da análise histomorfométrica baseada nos critérios TMV.

2.2 Objetivos Secundários

Correlacionar o padrão histomorfométrico de biópsia óssea de crianças com doença renal crônica em programa de diálise, com dados clínicos, laboratoriais e da densitometria óssea.

Avaliar a capacidade de marcadores bioquímicos em predizer o padrão TMV na biópsia óssea.

3-CASUÍSTICA E MÉTODOS

3-CASUÍSTICA E MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal, para descrição do padrão histológico de biópsia óssea em crianças e adolescentes com DRC em programa de diálise através da análise histomorfométrica. As biópsias ósseas foram realizadas nos anos de 2001 a 2003, no Hospital Infantil Pequeno Príncipe / Curitiba, na ocasião, para diagnóstico de doença mineral óssea; e estavam arquivadas em blocos, no banco de biópsias ósseas do Laboratório de Investigação Médica 16 (LIM 16) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídas biópsias ósseas de crianças e adolescentes com idade entre 1 e 18 anos e diagnóstico de doença renal crônica em programa de diálise, provenientes da Nefrologia Pediátrica do Hospital Infantil Pequeno Príncipe / Curitiba

3.2 Critérios de Exclusão

Após uma triagem inicial por observador que não teve acesso aos dados clínicos e demográficos, foram excluídas as biópsias sem qualidade para realização da análise histomorfométrica.

Foram excluídas biópsias de pacientes maiores de 18 anos ou que estivessem sem dados clínicos disponíveis.

3.3 Avaliação dos Aspectos Clínicos

A avaliação dos aspectos clínicos foi retrospectiva, a partir da folha de registro enviada para o LIM 16 quando da realização da biópsia óssea no Hospital

Infantil Pequeno Príncipe / Curitiba e foram avaliados dados como: idade, sexo, diagnóstico etiológico da DRC e modalidade dialítica, medicações em uso relacionadas ao controle do metabolismo mineral e ósseo - quelante de fósforo (carbonato de cálcio ou sevelamer), colecalciferol, calcitriol.

3.4 Exames laboratoriais

As dosagens do paratormônio (PTH pg/ml) foram feitas pelo método eletroquimioluminométrico. A análise da fosfatase alcalina (FA UI/L) foi realizada pelo método cinético automatizado. As medidas de cálcio (mg/dl), de fósforo (mg/dl) e de albumina sérica (g/dl), foram executadas por método colorimétrico automatizado. Os valores da hemoglobina (mg/dl) foram obtidos por automação em contador hematológico. A determinação de bicarbonato (mEq/L) foi efetuada por cálculo indireto através da gasometria. Os valores de referência foram expressos de acordo com os diferentes grupos etários entre os pacientes de 1 a 18 anos, conforme as recomendações do KDIGO e do K/DOQI [72, 73].

3.5 Densitometria óssea

A DXA de corpo inteiro foi feita por densitômetro HOLOGIG (Hologic Inc, Bedford, MA, USA), com software V8.17a:3 (Hologic, Waltham, MA, EUA). Os resultados da DXA, foram expressos como número de desvios padrão da média normal apropriada (escore Z), de acordo com o sexo e a faixa etária e corrigidos para a idade estatural. Os escores Z iguais ou menores que −2 foram considerados como densidade mineral óssea (DMO) abaixo do esperado para a idade. A metodologia para realização do exame e as análises dos resultados seguiram as

recomendações do Posicionamento Pediátrico na Sociedade Internacional de Densitometria Clínica, na segunda Conferência [42].

3.6 Biópsia Óssea

A biópsia óssea foi realizada na crista ilíaca antero-posterior à direita ou esquerda, sob anestesia, com agulha de Jamshidi®. Antes da biópsia, os pacientes tomaram tetraciclina como marcador para calcular a taxa de formação óssea. A dose foi de 10 mg/kg por dia, durante 2 dias, em duas ocasiões (sete e 14 dias), resultando uma dose total de 40 mg/kg. A biópsia foi realizada de 3 a 5 dias após o término do antibiótico, em protocolo adaptado de Salusky e cols [60].

O fragmento ósseo obtido foi armazenado em álcool 70% e fixado em etanol a 100%, desidratado e embebido em metil metacrilato. Cortes de 5µm de espessura foram corados com azul de toluidina, pH 6,4, e cortes de 10µm não corados foram obtidos para análise de parâmetros dinâmicos ao microscópio com luz ultravioleta [74].

3.7 Histomorfometria

A análise histomorfométrica foi realizada empregando-se método semi automatizado, com o microscópio Nikon, Labophot-2a, cursor, placa digitalizadora software Osteomeasure (Osteometrics Inc., Atlanta, GA, USA). Os parâmetros histomorfométricos foram divididos em estruturais, estáticos e dinâmicos de acordo com a nomenclatura padronizada pela *American Society of Bone and Mineral Research* traduzida para o português, com exceção das abreviações [50].

3.7.1 Parâmetros Estruturais

- Volume trabecular - BV/TV (%): volume ocupado pelo osso trabecular, mineralizado ou não, expresso como porcentagem do volume ocupado pela medula óssea e as trabéculas.

- Espessura trabecular - Tb.Th (µm): representa a média da espessura das trabéculas.

- Número de trabéculas - Tb.N (/mm ou mm-1): representa o número de trabéculas ósseas por milímetro de tecido avaliado (é dado pela razão entre o volume trabecular e sua espessura).

- Separação trabecular - Tb.Sp (µm): é a distância média entre as trabéculas.

3.7.2 Parâmetros Estáticos de Formação Óssea

- Espessura osteóide - O.Th (µm): é a espessura da matriz osteóide expressa em micra.

- Superfície osteóide - OS/BS (%): é a porcentagem da superfície trabecular recoberta por matriz osteóide em relação à superfície do osso trabecular total.

- Volume osteóide - OV/BV (%): é o volume ocupado por osso não mineralizado (matriz osteóide), em relação ao volume trabecular (mineralizado e não mineralizado).

- Superfície osteoblástica - Ob.S/BS (%): é a porcentagem da superfície trabecular recoberta por osteoblastos em relação a superfície trabecular total.

3.7.3 Parâmetros Estáticos de Reabsorção

- Superfície reabsorvida - ES/BS (%): é a porcentagem da superfície trabecular que apresenta lacunas de reabsorção óssea, com a presença ou não de osteoclastos, em relação à superfície trabecular total.

- Superfície osteoclástica - Oc.S/BS (%): é a porcentagem da superfície trabecular recoberta por osteoclastos em relação à superfície trabecular total.

- Volume de fibrose - Fb.V/TV (%): é a porcentagem da medula óssea ocupada por fibrose em relação à área avaliada. Valor de referência: 0. Por questões de qualidade do material, optamos por não analisar os parâmetros de fibrose.

3.7.4 Parâmetros Dinâmicos

- Taxa de formação óssea - BFR/BS: é o produto da taxa de aposição mineral (MAR) e a superfície mineralizante (MS/BS) em 365 dias ou um ano. Representa a taxa de osso mineralizado por dia ou um ano. Utilizamos a taxa de mineralização por ano ($\mu m^3/\mu m^2$/ano)

- Intervalo de tempo para a mineralização - Mlt (dias): intervalo de tempo entre deposição e a mineralização da matriz osteóide.

Os parâmetros histomorfométricos estáticos foram comparados com crianças e adolescentes brasileiros saudáveis [75] e os parâmetros dinâmicos com controles normais conforme Glorieux e cols [68]. Os dados foram expressos como médias e desvio padrão relacionando os dados normais correspondentes a idade.

3.8 Classificação pelo sistema TMV

A análise histomorfométrica das biópsias pelo sistema TMV resultou no diagnóstico do tipo de remodelação – Turnover - (alta, normal e baixa), da

mineralização óssea –- (normal e anormal), bem como do volume – Volume - (alto, normal ou baixo).

A remodelação foi considerada alta quando o BFR/BS estava 1 desvio acima da média dos controles normais. Remodelação foi considerada baixa quando BFR/BS estava menor que 1 desvio da média dos controles normais, de acordo com a faixa etária [27, 68]. Consideramos mineralização anormal quando O.Th, e Mlt encontravam-se 1 desvio acima da média dos controles normais de acordo com a faixa etária [27,68]. Para a análise do volume ósseo, considerou-se como referência de normalidade o BV/TV% de uma amostra composta por 26 crianças e adolescentes brasileiros saudáveis. Baixo volume ósseo quando o valor estava menor que 1 desvio da média para a idade e alto volume ósseo quando estava 1 desvio acima da média para a faixa etária [27, 75].

3.9 Avaliação Estatística

Os dados contínuos e semi-contínuos foram comparados com a Curva Normal através do teste de Shapiro-Wilk para determinação da normalidade dos dados. As variáveis contínuas foram expressas como média e desvio padrão, ou mediana e percentis (25-75). Dados paramétricos foram comparados pelo teste t student ou Anova. Para os dados não paramétricos as comparações foram feitas através dos testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Os dados categóricos foram analisados pelo teste do Qui-quadrado com análise de significância. Foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson ou de Spearman para avaliar a correlação entre as variáveis contínuas de acordo com a distribuição paramétrica e não paramétrica, respectivamente, assim como análise de regressão logística multivariada, quando aplicável. A curva ROC foi construída para analisar a

sensibilidade e especificidade dos parâmetros laboratoriais em prever os parâmetros TMV da histomorfometria. O melhor ponto de corte foi escolhido pelo índice de Youden para maximizar a sensibilidade e a especificidade. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, versão 25). Foi considerado para todo estudo risco $\alpha \leq 0,05$ para erro Tipo I.

3.10 Avaliação do Comitê de Ética e Pesquisa

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o número 77530117.0.3001.0065.

4-RESULTADOS

4-RESULTADOS

De um total de 67 biópsias provenientes da Nefrologia Pediátrica do Hospital Pequeno Príncipe-Curitiba, 42 foram elegíveis para o estudo, conforme demonstrado na figura 2. Foram excluídas inicialmente 11 biópsias sem condições técnicas para análise histomorfométrica. Em seguida, foram excluídas 8 biópsias por ausência de dados clínicos correspondentes e 6 biópsias de crianças maiores de 18 anos.

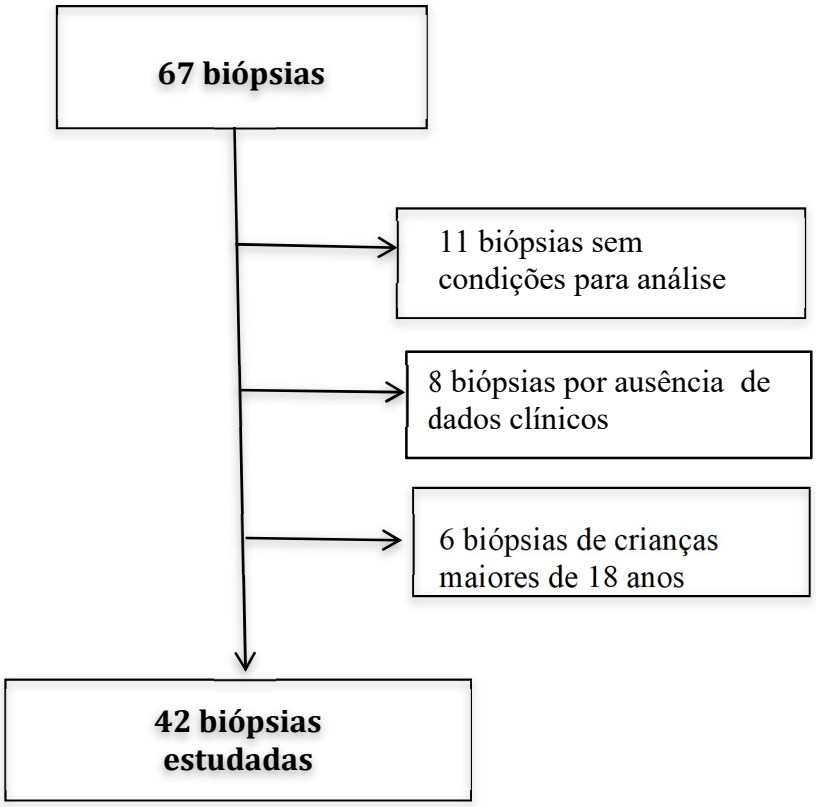


Figura 1- Critério de exclusão das biópsias

4.1 Características Clínicas dos Pacientes

Conforme descrito na Tabela 4, a média de idade dos pacientes era de 11,3 ± 4,3 anos, sendo 30 (71,4%) do sexo masculino. Vinte e oito (66,7%) eram

brancos, 10 (23,8%) não brancos e para 4 (9,5%), não dispúnhamos de dados. Vinte e duas crianças (52,4%) apresentavam anomalias congênitas do rim e do trato urinário, (válvula de uretra posterior-10, refluxo vesico-ureteral-5, extrofia vesical-2, síndrome de Prunne-Belly-2, agenesia renal-1, rim multicístico-1, bexiga neurogênica-1), seguidas das glomerulopatias (12-28,6%), e outras etiologias (8-19%), composto por síndrome hemolítico urêmica-2 , nefronoftise-2, doença policística renal-1, cistinose nefropática-1, nefrite intersticial aguda-1, sepse neonatal-1. O tempo em dialise foi 19 (10-35) meses. Vinte e três (54%) pacientes estavam em hemodiálise e 19 (45,2%) em diálise peritoneal. Três pacientes haviam sido transplantados previamente. Em 38 pacientes, o Z-escore de estatura foi -2,5 ± 1,68, enquanto que o Z-escore de peso era -2,0 ± 1,05. Vinte e dois (57,8%) e 23 (60,5%) pacientes apresentavam Z-escore < -2 para peso e estatura, respectivamente. Não dispúnhamos de dados antropométricos de quatro pacientes. Quarenta e um pacientes faziam uso de carbonato de cálcio e 38 faziam uso de calcitriol.

Tabela 4- Características dos pacientes

Características dos Pacientes (n=42)	
Idade (anos)	11,3 ± 0,7
Sexo masc/fem	30/12 (71,4/28,6)
Raça	
Branca	28 (66,7)
Não branca	10 (23,8)
Sem dados	4 (9,5)
Escore Z peso/Idade **	-2,0 ± 0,2
Escore Z estatura/Idade **	-2,5 ± 0,3
Diagnóstico	
Uropatia	22 (52,4)
Glomerulopatia	12 (28,5)
Outros	8 (19)
Pressão arterial	
Normal	28 (66,7)
Elevada	10 (23,8)
Modalidade Dialítica	
Hemodiálise	23 (54,8)
Diálise peritoneal	19 (45,2)
Tempo de Diálise (meses)	19 (10-35)
Transplante Anterior	
Sim	3 (7,1)
Não	35 (83,3)
Sem Dados	4 (9,5)

Os dados estão expressos em forma de (n; %), media e Dp ou mediana intervalo 25-75%. ** n=38

4.2 Dados Laboratoriais dos Pacientes

Quinze pacientes (35,7%) apresentavam hipercalcemia, 8 pacientes tinham hiperfosfatemia e 3 apresentavam hipofosfatemia. Quinze pacientes (35,7%) apresentavam valores de PTH acima de 300 pg/ml. De 38 crianças, 27 (71%) apresentavam anemia, enquanto que 17 (44,7%) encontravam-se em acidose

metabólica. Somente um paciente apresentava albumina sérica menor que 3 g/dl. Os achados laboratoriais estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5- Dados laboratoriais dos pacientes

	Dados laboratoriais dos pacientes	Valores de referência de acordo com a idade
Hemoglobina (mg/dl) **	9,9 ± 1,8	6 meses a 5 anos = 11 6 a 12 anos = 11,5 12 a 15 anos = 12 > 15 anos feminino = 12 > 15 anos masculino =13
Albumina (g/dl)**	3,8 (3,6-4,1)	3.5-5.0
Bicarbonato ** (mEq/L)	21,2 ± 5,1	22-26
Cálcio Total (mg/dl)*	10,3 ± 1,4	1 a 5 anos = 9.4-10.8 6 a12 anos = 9.4-10.3 13 a 20anos = 8.8-10.2
Fósforo (mg/dl)*	5,1 ± 1,5	1 a 5 anos = 4.5-6.5 6 a 12 anos = 3.6-5.8 13 a 20 anos = 2.3-4.5
Fosfatase Alcalina (UI/L)*	301 (173- 441)	1 a 10 anos: 142-335 10 a 13 anos 129-417 13 a 15 anos: 116-468 15 a 17 anos: 82-331 17 a 19 anos: 55-149
PTHi (pg/ml)*	157 (49,3- 378,7)	2 a 17anos = 23,0 (15 a 31,6) DRC estágio V <300

Os dados estão expressos em forma de média e Dp ou mediana e intervalo 25-75%; * valores de referência de acordo com a idade segundo KDOQI/ KDIGO [72,73]. ** n=38.

4.3 Biópsia óssea

4.3.1 Comparação da histomorfometria óssea com dados normais brasileiros

Quando avaliamos os parâmetros estruturais da histomorfometria óssea estática, comparados com dados normais brasileiros [75] observamos que não houve diferença com relação ao volume ósseo (BV/TV), nem na espessura das trabéculas

ósseas (TbTh). No entanto, encontramos um maior número de trabéculas ósseas (TbN), e diminuição da separação entre as mesmas (TbSp).

Em relação aos parâmetros de formação óssea, observamos aumento na espessura (O.Th) e na superfície osteóide (OS/BS), assim como da superfície osteoblástica (ObS/BS). Com relação aos parâmetros de reabsorção óssea, os nossos pacientes apresentaram maior superfície de erosão (ES/BS), assim como maior superfície osteoclástica (OcS/BS). (Tabela 6)

Tabela 6- Comparação da histomorfometria óssea estática com dados normais brasileiros

Parâmetro	Pacientes n=42	dos Reis, et al [75] n= 26	p
Idade (anos)	11,3 ± 4,3	11,5 ± 5,6	0,860
Sexo (M/F)	30/12	17/9	0,602
Raça			
Branca	28 (66,7)	14 (53,8)	0,193
Não Branca	10 (23,8)	8 (30,8)	
Sem dados	4 (9,5)	4 (15,4)	
Histomorfometria			
Parâmetros Estruturais			
BV/TV (%)	29,9 ± 8,8	25,8± 9,6	0,780
Tb.Th (µm)	120,2 (108 - 133)	134,3(111 - 149)	0,230
Tb.N (/mm)	2,3 ± 0,5	1,9 ± 0,5	0,005
Tb.Sp µm)	315,2 (247 - 407)	371,6 (289 - 482)	0,007
Parâmetros Estáticos de Formação			
O.Th (µm)	6,0 (5 -10)	10,4 (8-12)	0,002
OS/BS (%)	22,9 (14,1 - 45,5)	18,6 (6,6 -24,5)	0,045
OV/BV (%)	2,2 (1,1 - 5,8)	2,4 (0,8 -3,9)	0,530
Ob.S/BS (%)	9,0 (4,3 - 17,8)	1,0 (0,3 - 3,8)	0,000
Parâmetros Estáticos de Reabsorção			
ES/BS	7,8 (2,9 - 13,6)	2,7 (0,8 - 5,1)	0,000
OcS/BS	1,3 (0,1 - 3,0)	0,02 (0,01 - 0,07)	0,000

Os dados estão expressos em forma de (n; %), média e Dp, mediana intervalo 25-75%

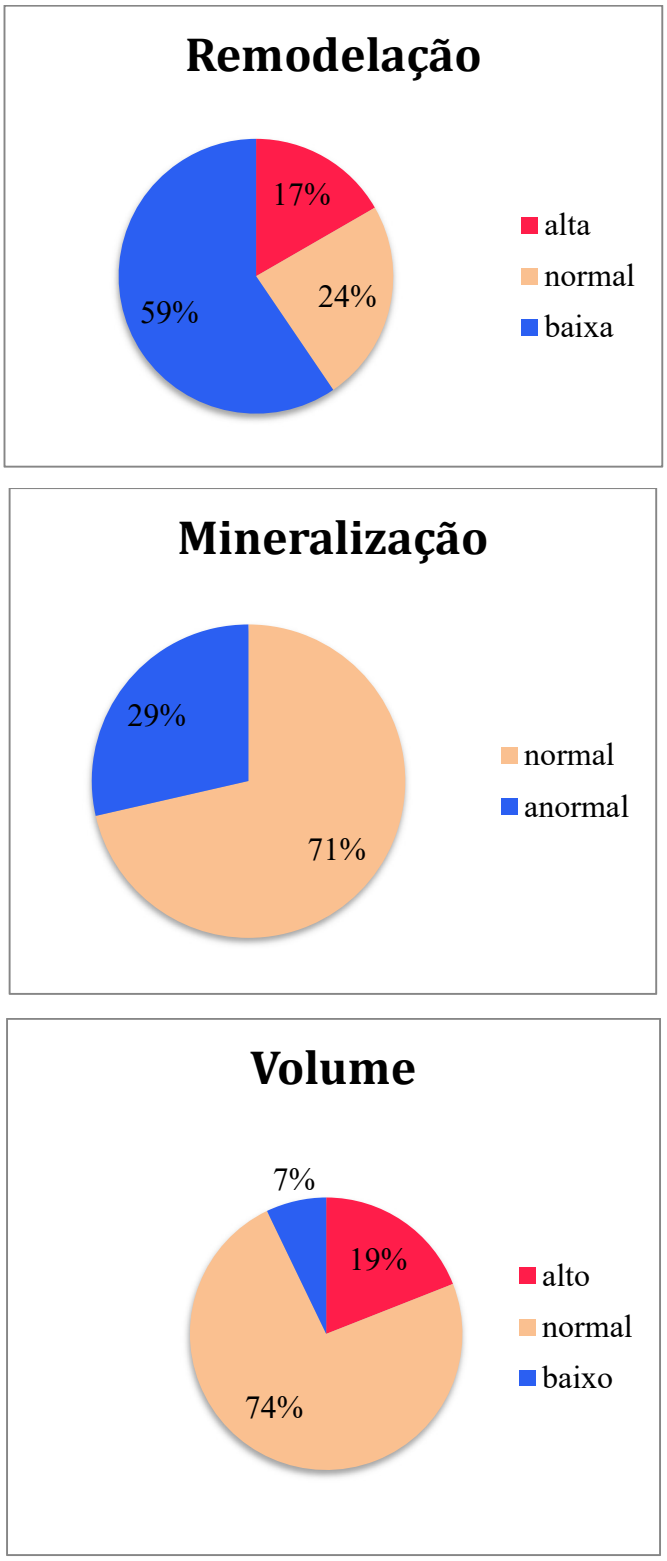
Observamos que não houve correlação da idade dos pacientes com volume ósseo (BV/TV) (r= -0,38 p= 0,813).

4.3.2 Classificação pelo sistema TMV

Com relação à classificação do sistema TMV, baixa remodelação estava presente em 25 pacientes

(59%) e alta remodelação em sete pacientes (17%). Em 10 pacientes (24%) a remodelação era normal. Cinco biópsias apresentaram depósito de alumínio, sendo que baixa e alta remodelação estavam presentes em 4 e 1 biópsias, respectivamente. Quanto à mineralização, ela estava anormal em 12 pacientes (29%). Em 31 pacientes (74%) o volume ósseo estava dentro da faixa de normalidade e alto em 8 (19%). Baixo volume ósseo foi encontrado em três pacientes (7%). A distribuição do sistema TMV está ilustrada na figura 2.

Figura 2- Distribuição dos pacientes de acordo com a classificação TMV



Os dados histomorfométricos dos pacientes e a classificação TMV estão apresentados na tabela 7

Tabela 7- Dados histomorfométricos dos pacientes, tipo de osteodistrofia renal e classificação TMV

Paciente	Idade	BFR/BS	T	MIt	O.Th	M	BV/TV	V
1	8	B	B	A	A	An	N	N
2	6	A	A	N	A	N	A	A
3	9	B	B	A	N	N	N	N
4	10	N	N	A	A	An	A	A
5	11	N	N	A	A	An	N	N
6	10	B	B	A	N	N	N	N
7	12	N	N	N	B	N	B	B
8	16	B	B	A	A	An	B	B
9	17	A	A	A	A	An	N	N
10	10	B	B	A	N	N	N	N
11	3	B	B	N	B	N	A	A
12	10	B	B	A	N	N	N	N
13	16	N	N	N	N	N	B	B
14	16	B	B	N	B	N	N	N
15	12	A	A	B	N	N	A	A
16	9	N	N	N	N	N	N	N
17	13	N	N	B	N	N	N	N
18	15	B	B	N	B	N	N	N
19	11	B	B	A	A	An	A	A
20	6	N	N	N	N	N	N	N
21	14	B	B	A	B	N	N	N
22	6	B	B	A	N	N	N	N
23	9	B	B	A	A	An	N	N
24	18	B	B	A	A	An	A	A
25	17	B	B	A	N	N	N	N
26	3	B	B	A	N	N	N	N
27	4	A	A	N	A	N	A	A
28	8	B	B	A	B	N	N	N
29	17	B	B	A	N	N	N	N
30	18	N	N	A	A	An	A	A
31	11	B	B	B	B	N	N	N
32	11	B	B	A	N	N	N	N
33	3	B	B	A	N	N	N	N
34	13	B	B	A	B	N	N	N
35	14	A	A	B	B	N	N	N
36	14	B	B	A	A	An	N	N
37	16	B	B	A	A	An	N	N
38	14	N	N	N	A	N	N	N
39	18	A	A	N	N	N	N	N
40	13	N	N	A	A	An	N	N
41	8	A	A	N	A	N	N	N
42	7	B	B	N	N	N	N	N

A-alto, B-baixo, N- normal, An- anormal, T-remodelação, M- mineralização, V-volume.

4.3.3 Densitometria óssea e histomorfometria

Trinta e três crianças realizaram densitometria óssea de corpo inteiro. O escore Z foi -0,33 ± 1,37. Apenas três crianças (paciente 10, paciente 31 e paciente 32) apresentavam escore Z inferior a −2, ou seja, DMO abaixo da média esperada, de acordo com a Sociedade Internacional de Densitometria Clínica [42.] As características clínicas e laboratoriais dos adolescentes com densidade mineral baixa a DXA estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8- Características clínicas, laboratoriais e parâmetros histomorfométricos (TMV) dos pacientes com densidade mineral óssea abaixo da média esperada para a idade pela DXA

	Paciente 10	Paciente 31	Paciente 32
Idade (anos)	16	17	18
Etiologia	Extrofia de bexiga	Nefropatia do Refluxo	Glomerulonefrite
Raça	branca	não branca	Branca
Sexo	masc	fem	masc
Escore Z est/idade	-4,25	-1,98	-3,63
Cálcio mg/dl	9,4	10,5	10
Fósforo mg/dl	4,5	3,3	7,1
PTH pg/ml	952,0	244,0	1538,0
Fosfatase Alcalina UI/L	242	156	1958
Bicarbonato mEq/l	18	25	16,8
Remodelação	baixo	baixo	baixo
Mineralização	normal	normal	normal
Volume	normal	normal	normal

Na análise histomorfométrica, observamos uma correlação inversa do volume osteóide (OV/BV r= -0.52 p <0.001 IC95% -0.75 a -0.20) e da superfície osteóide (OS/BS r= -0.34 p=0.044 IC95%-0.63 a 0.03), com o escore Z da DXA.

4.3.4 Relação entre dados demográficos, clínicos, laboratoriais, DXA, e classificação TMV

Como mostra a tabela 9, as crianças com baixa remodelação apresentaram menor PTH e FA, e uma tendência a cálcio sérico mais elevado. Observamos que mineralização anormal ocorreu em crianças de maior idade, acompanhada por menor escore Z de altura / idade, menor escore Z da DMO, bem como maior PTH e FA. Os resultados da comparação estão apresentados na tabela 10. Também observamos uma tendência de maior FA sérica naqueles pacientes com alto volume ósseo trabecular. como mostrado na tabela 11

Tabela 9- Parâmetros clínicos e laboratoriais de acordo com a remodelação óssea

	Remodelação (Turnover)		
	Normal/Alto (n= 17)	**Baixa (n= 25)**	**p=**
Idade (anos)	11,8 ± 4,2	11,0 ± 4,5	0,55
Tratamento			
HD	9	14	
DP	8	11	0,84
Raça**			
branca	9	19	
não branca	6	4	0,12
Z escore peso/idade**	-1,7 ± 1,0	-2,1 ± 1,0	0,21
Z escore est/idade**	-2,7 ± 1,6	-2,5 ± 1,6	0,88
Z escore DMO***	-0,52 ± 1,2	-0,19 ± 1,4	0,49
Cálcio mg/dl	9,8 ± 1,0	10,5 ± 1,5	0,05*
Fósforo mg/dl	5,0 ± 1,4	5,1 ± 1,6	0,85
PTH pg/ml	352(154-438)	113(31-265)	0,005*
Fosfatase Alcalina UI/L	367(149-389)	242(149-349)	0,0158*
Bicarbonato**	19,8 ± 4,7	22,3 ± 5,3	0,19

Os dados estão expressos em forma de (n), média e Dp, mediana intervalo 25-75%, *p < 0,05; **n =38; ***n=33.

Tabela 10- Parâmetros clínicos e laboratoriais de acordo com a mineralização óssea

	Mineralização		
	Normal (n= 30)	**Anormal (n=12)**	**p=**
Idade (anos)	10,5± 4,4	13,4± 3,5	0,05*
Tratamento			
HD	18	5	
DP	14	5	0,72
Raça**			
branca	21	7	
não branca	6	4	0,15
Z escore peso/idade**	-1,8 ± 0,98	-2,4 ± 1,15	0,15
Z escore est/idade**	-2,2 ± 1,7	-3,4 ± 1,5	0,04*
Z escore DMO***	0,001 ± 1,0	-1,1 ± 1,7	0,026*
Cálcio mg/dl	10,5± 1,1	9,8± 1,9	0,14
Fósforo mg/dl	5,1± 1,7	5,1±0,9	0,94
PTH pg/ml	144 (47 - 292)	625 (91 -1013)	0,01*
Fosfatase Alcalina UI/l	282 (153 -385)	544 (190- 824)	0,03*
Bicarbonato**	21,6± 5,1	20,1± 5,0	0,4

Os dados estão expressos em forma de (n), média e Dp, mediana intervalo 25-75%, *p<0,05; **n =38,***n=33

Tabela 11- Parâmetros clínicos e laboratoriais de acordo com o volume ósseo

	Volume			
	Normal (n= 31)	**Baixo (n=3)**	**Alto (n= 8)**	**p=**
Idade (anos)	11,2± 4,0	14,6±2,3	10,2± 5,7	0,33
Tratamento				
HD	2	18	3	
DP	1	13	5	0,53
Raça**				
branca	24	1	3	
não branca	5	1	4	0,07
Z escore peso/idade**	-1,9 ± 1,0	-2,9 ± 0,59	-2,0 ± 1,1	0,47
Z escore est/idade**	-2,5±1,5	-4,2± 0,1	-2,1±2,2	0,33
Z escore DMO***	-2,3 ± 1,7	-0,23 ± 1,0	-0,08 ± 2,2	0,26
Cálcio mg/dl	10,4±1,4	9,5±0,86	10,1± 1,5	0,58
Fósforo mg/dl	5,1±1,5	5,0± 1,1	4,8±1,4	0,85
PTH pg/ml	153 (44-352)	489(371-489)	138 (19-547)	0,13
Fosfatase Alcalina UI/l	284(155-389)	242(220-242)	555(273-931)	0,05*
Bicarbonato**	21,3±5,2	20,7±2,9	20,8±5,4	0,96

Os dados estão expressos em forma de (n), média e Dp, mediana intervalo 25-75%, *p<0,05; **n =38; n=33.

Na comparação de pacientes com DRC secundária a CAKUT com aqueles cuja DRC foi secundária a outras etiologias (não-CAKUT), os dados clínicos, laboratoriais e da histomorfometria não mostraram diferença nos

parâmetros avaliados. Os resultados da comparação estão apresentados na tabela 12.

Tabela 12-Comparação da histomorfometria e dados laboratoriais de crianças e adolescentes de acordo com a etiologia da DRC

	Não-CAKUT n= 20	CAKUT n= 22	p
Idade (anos)	12,2 ± 3,9	10,5 ± 4,7	0,16
Tempo em dialise (meses)	21(11,2-47)	19 (8,5-28)	0,67
Raça **			
Branca	16	12	
Não-Branca	4	6	0,35
Sexo (m/f)	13/7	17/5	0,37
Dialise HD/DP	12/8	11/11	0,51
Calcio total(mg/dl)	10,3 ± 1,7	10,2 ± 1,0	0,75
Fósforo (mg/dl)	5,2 ± 1,8	4,9 ± 1,1	0,49
PTH (pg/ml)	144,5(41,4-375,5)	203,5(96,6-385)	0,49
Fosofatase Alcalina (UI/l)	307 (159-490)	292 (197- 441)	0,87
Bic (mEq/l)**	20,2 ± 5,6	22,3 ± 4,4	0,21
BV/TV (%)	30,4 (24,2-38,0)	27,2(23,6-33,4)	0,49
Tb.Th (µm)	125,9(111,3-133,5)	118,6(108,5-145,4)	0,51
Tb.N (/mm)	2,4 ± 0,6	2,3 ± 0,5	0,67
Tb.Sp (µm)	318,1 ± 112,1	318,9 ± 99,9	0,97
O.Th (µm)	7,5 (4,6-11,3)	6,5 (4,8-9,0)	0,72
OS/BS (%)	24,2 ± 13,4	29,1 ± 20,5	0,16
OV/BV (%)	2,8 (0,6-6,7)	2,6 (1,1-4,2)	0,84
Ob.S/BS (%)	9,0 (2,5-19,3)	8,0 (4,7-14,5)	0,80
ES/BS (%)	7,8(4,1-16,3)	6,3(2,1-10,2)	0,19
OcS/BS (%)	1,2 (0,4-3,5)	0,7 (0,3-1,7)	0,13
MIt (/dia)	29,8 (13,9-122,0)	33,8 (11,8-122.0)	0,66
BFR/BS (mm^3/mm^2/ano)	20,1 (0,3-42,8)	14,6 (0,3-52,0)	0.81

HD- hemodiálise; DP- diálise peritoneal, CAKUT- anomalia congênita do rim e do trato urinário. Os dados estão expressos em forma de (n), média, Dp e mediana intervalo 25-75%. **n=38.

Não encontramos diferenças histomorfométricas significativas com relação a idade, sexo ou modalidade de diálise. Os resultados estão apresentados nas tabelas 13, 14 e 15, respectivamente.

Tabela 13- Comparação da histomorfometria, dados clínicos e laboratoriais de crianças e adolescentes de acordo com a idade ≤ 12 anos e > 12 anos

	≤ 12 anos n= 22	**> 12 anos n= 20**	**p**
Idade (anos)	7,9±2,7	15,1±2,0	0,89
Sexo (M/F)	17/5	13/7	0,38
Branco/Não-Branco**	15/5	13/5	0,85
CAKUT/Não-CAKUT	12/6	10/6	0,96
Tempo em diálise (meses)	14 (7-28)	14 (8-46)	0,04*
Diálise HD/DP	9/13	14/6	0,06
Z-scores peso/idade**	-1,8±0,94	-2,18±1,1	0,37
Z-scores estatura/idade**	-2,8(-4,2- -1,0)	-2,1(-4,1- -1,7)	0,56
Cálcio Total (mg/dl)	10,3±1,4	10,4±1,5	0,84
Fósforo (mg/dl)	4,7±1,6	5,6±1,3	0,06
PTH (pg/ml)	125 (44-293)	312 (106-590)	0,07
Fosfatase Alcalina (UI/l)	329 (208-441)	292 (147-538)	0,50
Bic (mEq/l)**	21,9±5,8	20,3±4,1	0,35
BV/TV (%)	30,4±9,3	29,4±8,6	0,72
Tb.Th (µm)	125,8±28,8	125,3±19,6	0,16
Tb.N (/mm)	2,4 (2,0-2,7)	2,2 (1,9-2,8)	0,70
Tb.Sp (µm)	310,5±91,6	327,3±118,9	0,80
O.Th (µm)	6,2 (4,9-9,9)	7,3 (4,8-9,6)	0,71
OS/BS (%)	25,9±17,9	26,9±18,5	0,85
OV/BV (%)	3,4 (0,5-5,2)	2,2 (1,0-6,4)	0,92
Ob.S/BS (%)	9,9 (2,7-19,4)	8,1 (3,8-14,4)	0,52
ES/BS (%)	7,9 (2,0-13,7)	6,9 (3,9-10,5)	0,93
OcS/BS (%)	0,7 (0,3-3,7)	1,0 (0,4-1,6)	0,95
MIt (/dias)	37 (16-122)	24 (12-122)	0,43
BFR/BS (mm^3/mm^2/ano)	14,6 (0,4-47,4)	27,4 (0,4-42,0)	0,56

HD- hemodiálise; DP- diálise peritoneal, CAKUT- anomalia congênita do rim e do trato urinário. Os dados estão expressos em forma de (n), média, Dp e mediana intervalo 25-75%. *p <=0,05; **n=38.

Tabela 14- Comparação da histomorfometria e dados laboratoriais de crianças e adolescentes de acordo com o sexo

	Masculino n= 30	Feminino n= 12	p
Idade (anos)	10,8± 4,5	12,5± 4,3	0,24
Branco/Não Branco**	18/9	10/1	0,12
CAKUT/Não-CAKUT	17/13	5/7	0,29
Tempo em diálise (meses)	19(9,7-59,8)	24,5 (10,5-57)	0,34
Diálise HD/DP	19/11	4/8	0,07
Z-score peso/idade**	-2,0±1,0	-2,1±1,2	0,79
Z-score estatura/idade**	-2,4±1,8	-2,7±1,4	0,71
Cálcio Total (mg/dl)	10,1±1,2	10,7±1,7	0,22
Fósforo(mg/dl)	5,1±1,5	4,9±1,4	0,59
PTH (pg/ml)	203 (224-579)	99 (21-339)	0,13
Fosfatase Alcalina (UI/l)	317 (159-490)	172 (147- 351)	0,04*
Bic (mEq/l)**	20,2±5,4	23,5±3,4	0,07
BV/TV (%)	26 (23-32)	34(28-38)	0,10
Tb.Th (µm)	121(110-132)	131(106-137)	0,77
Tb.N (/mm)	2,2(1,9-2,6)	2,5(2,0-3,0)	0,19
Tb.Sp (µm)	330(259-385)	246(212- 351)	0,13
O.Th (µm)	6,0 (4,8-10,3)	7,7 (4,1-9,5)	0,81
OS/BS (%)	29,0±18,8	20,0±14,3	0,14
OV/BV (%)	3,3 (1,3-7.1)	1,7 (0,6-3,3)	0,08
Ob.S/BS (%)	8,9 (4,7-15,4)	8,2 (2,0-15,3)	0,73
ES/BS (%)	8,2(3,2-13,0)	5,5(3,5-8,1)	0,50
OcS/BS (%)	2,1 (0,5-2,3)	0,4 (0,2-1,9)	0,13
MIt (/dias)	26,1 (12-122)	83,6 (15-122)	0,17
BFR/BS (mm^3/mm^2/ano)	20,0 (2.8-48.3)	0.86 (0.4-38.3)	0.20

HD- hemodiálise; DP- diálise peritoneal, CAKUT- anomalia congênita do rim e do trato urinário. Os dados estão expressos em forma de (n), média, Dp e mediana intervalo 25-75%. *p<0,05; **n=38.

Tabela 15- Comparação da histomorfometria, dados clínicos e laboratoriais de crianças e adolescentes de acordo com a modalidade de diálise

	HD n=23	DP n=19	p
Idade (anos)	12,7±3,9	9,6±4,2	0,25
Branco/Não-Branco**	16/6	12/4	0,87
Sexo M/F	19/4	11/8	0,07
CAKUT/Não-CAKUT	11/12	11/8	0,50
Tempo em diálise (meses)	18(9,7- 46,0)	24 (12,0-31,7)	0,76
Z-score peso/idade**	-1,9±1,0	-2,1±1,0	0,79
Z-score estatura/idade**	-2,3±1,6	-2,8±1,8	0,71
Cálcio Total (mg/dl)	10,5±1,4	10,0±1,3	0,29
Fósforo (mg/dl)	5(4,5-6,0)	4,7(3,8- 5,8)	0,28
PTH (pg/ml)	144.5 (41-445)	157 (67-356)	0,73
Fosfatase Alcalina (UI/l)	290 (136-441)	386 (251- 575)	0,18
Bic (mEq/l)**	18,9±5,2	24,3±2,9	0,07
BV/TV (%)	29,2± 8,2	30,8±9,6	0,24
Tb.Th (µm)	126,5±21,8	124,5±28,0	0,99
Tb.N (/mm)	2,2(1,9-2,6)	2,4(1,9-2,8)	0,39
Tb.Sp (µm)	327,4±101,1	310,7±110,3	0,36
O.Th (µm)	6,3 (4,8-9,0)	7,1 (4,8-10,5)	0,83
OS/BS (%)	18,7(10,2- 38,8)	28,8(15,5- 45,3)	0,42
OV/BV (%)	1,9 (0,83-5,9)	3,4 (1,3-5,1)	0,60
Ob.S/BS (%)	6,8 (2,8-12,7)	10,6 (6,3-20,2)	0,06
ES/BS (%)	7,3(3,4-11,7)	8,1(0,2-3,5)	0,77
OcS/BS (%)	0,93 (0,4-1,6)	0,83 (0,2-1,9)	0,95
MIt (/dias)	31,2 (11.4-122)	32,5 (12,9-122)	0,67
BFR/BS (mm^3/mm^2/ano)	14,6 (0,4-47,5)	14,6 (0,4-40,1)	0,88

HD- hemodiálise; DP- diálise peritoneal, CAKUT- anomalia congênita do rim e do trato urinário. Os dados estão expressos em forma de (n), média, Dp e mediana intervalo 25-75%. **n=38.

Por outro lado, crianças não brancas apresentaram menor bicarbonato sérico e tendência a FA mais alta do que crianças brancas. Também observamos maior espessura osteóide, acompanhada por parâmetros de reabsorção e de formação óssea mais elevados nas crianças não brancas. Estes resultados estão apresentados na tabela 16.

Tabela 16- Comparação da histomorfometria, dados clínicos e laboratoriais de crianças e adolescentes de acordo com a raça

	Branca n= 28	**Não Branca n= 10**	**p**
Idade (anos)	11,4 ± 4,2	11,7 ± 4,6	0,89
Sexo (M/F)	18/10	9/1	0,12
Tempo em diálise (meses)	21(12.0-31.7)	14 (7.7-46.0)	0,56
Diálise HD/DP	16/12	6/4	0,87
Cálcio Total (mg/dl)	10,2 ± 1,3	10,4 ± 1,6	0,72
Fósforo (mg/dl)	5,3 ± 1,6	4,4 ± 1,4	0,12
PTH (pg/ml)	145 (46-356)	216 (45-832)	0,40
Fosfatase Alcalina (UI/L)	302 (155-393)	495 (234-725)	0,06
Bic (mEq/l)	22,2 ± 5,1	18,3 ± 3,9	0,03*
BV/TV (%)	28,9 ± 7,9	32,0 ± 11,5	0,36
Tb.Th (µm)	122,8 ± 20,1	135,7 ± 35,5	0,16
Tb.N (/mm)	2,2 (1,9-2,6)	2,3 (2,0-2,8)	0,63
Tb.Sp (µm)	327,0 ± 99,6	310,9 ± 122,7	0,68
O.Th (µm)	5,7 (4,7-8,7)	10,3 (6,8-14,9)	0,02*
OS/BS (%)	24,7 ± 16,1	34,7 ± 23,9	0,14
OV/BV (%)	2,6 (0,5-3,8)	5,7 (1,1-12,2)	0,10
Ob.S/BS (%)	8,1 (2,5-13,8)	13,3 (4,0-22,6)	0,27
ES/BS (%)	6,2 (3,4-8,7)	12,6 (4,8-17,8)	0,02*
OcS/BS (%)	0,7 (0,3-1,9)	1,9 (1,1-3,6)	0,02*
MIt (/dias)	31,8 (15,0-122,0)	74 (10,5-121,7)	0,75
BFR/BS (mm^3/mm^2/ano)	14,6 (0,4-39,2)	38,3 (0,4-113,2)	0,056

HD- hemodiálise; DP- diálise peritoneal, CAKUT- anomalia congênita do rim e do trato urinário. Os dados estão expressos em forma de (n), média, Dp e mediana intervalo 25-75%. *p<0,05.

Em uma análise de regressão logística multivariada, o PTH <300 pg/mL foi associado independentemente à baixa remodelação óssea (RR: 5,34, IC 95%: 1,16-24,51; p = 0,031) em um modelo ajustado para raça, FA e cálcio. O PTH como valor contínuo apresentou significância limítrofe (p = 0,09). Os fatores significativamente associados à mineralização anormal foram idade (RR: 1,51, IC 95%: 1,06-2,16; p = 0,024) e FA (RR: 1,01, IC 95%: 1,00-1,02; p = 0,008), em um modelo ajustado para escores de DMO. A FA permaneceu significativamente associada à mineralização anormal, como variável contínua ou categorizada, com base no melhor ponto de corte (479 UI / mL).

4.3.5 Capacidade do PTH e da FA para prever a condição do TMV

A taxa de formação óssea se correlacionou com o PTH e com a FA, como mostrado na Figura 3A e 3B, respectivamente. O PTH discriminou remodelação baixa, de normal / alta (AUC = 0,74, sensibilidade = 0,60, especificidade = 0,82 para o melhor ponto de corte 151 pg / mL, p = 0,021). Cálcio sérico maior que 10,35 mg/dL, que foi o melhor ponto de corte (AUC = 0,70; sensibilidade = 0,64, especificidade = 0,76, p = 0,028) e PTH < 300 pg/mL (AUC = 0,694; sensibilidade = 0,80 , especificidade = 0,59, p = 0,035) também foram capazes de discriminar remodelação baixa, de normal / alta. Os critérios combinados de PTH < 300 pg/mL e cálcio > 10,35 mg/dL melhoraram a capacidade de prever baixa remodelação (AUC

= 0,74; sensibilidade = 0,60, especificidade 0,88, p = 0,009). A Figura 4 mostra as curvas ROC dos biomarcadores para previsão de baixa remodelação. Com relação à mineralização, PTH, FA (Figura 3C e 3D, respectivamente) e cálcio sérico (r = -0,51, p <0,001) correlacionaram-se com OV / BV.

A Figura 5 mostra a curva ROC do PTH e da FA quanto a capacidade de prever defeitos de mineralização. A AUC, a sensibilidade e a especificidade do PTH e da FA para prever defeitos de mineralização foram 0,75, 0,67 e 0,90 vs. 0,72, 0,58 e 0,93, respectivamente. Os critérios combinados de PTH > 300 pg/mL e FA > 479 UI / L, o melhor ponto de corte, não melhoraram a capacidade de predição (AUC 0,71, sensibilidade 0,42 e especificidade 1,00).

Figura 3- Gráfico de dispersão do PTH e da FA com a taxa de formação óssea e o volume osteóide

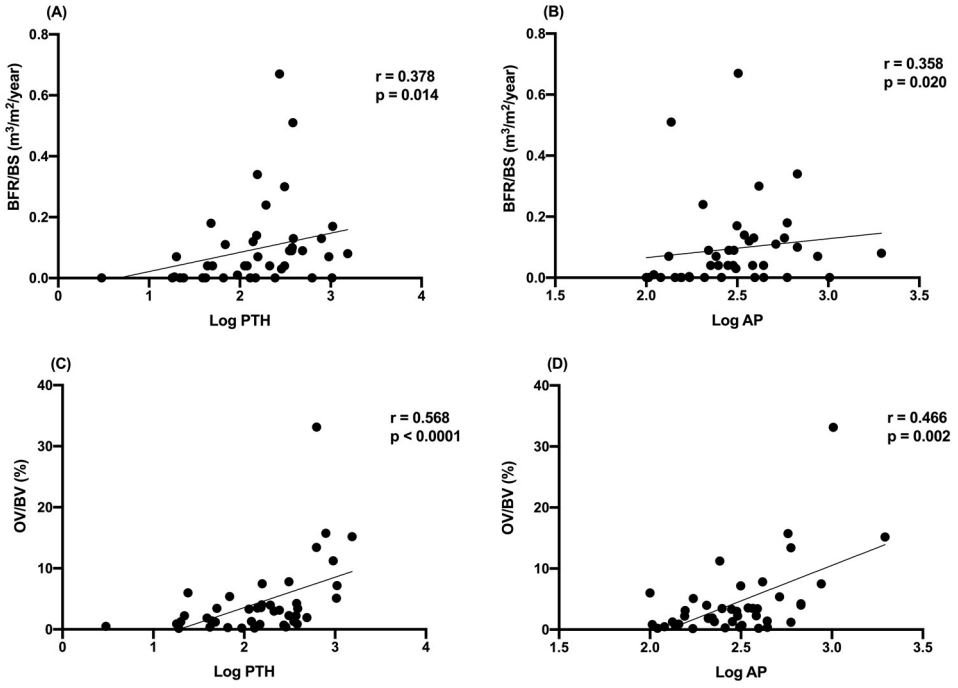


Figura 4- Curva ROC de biomarcadores para previsão de baixa remodelação

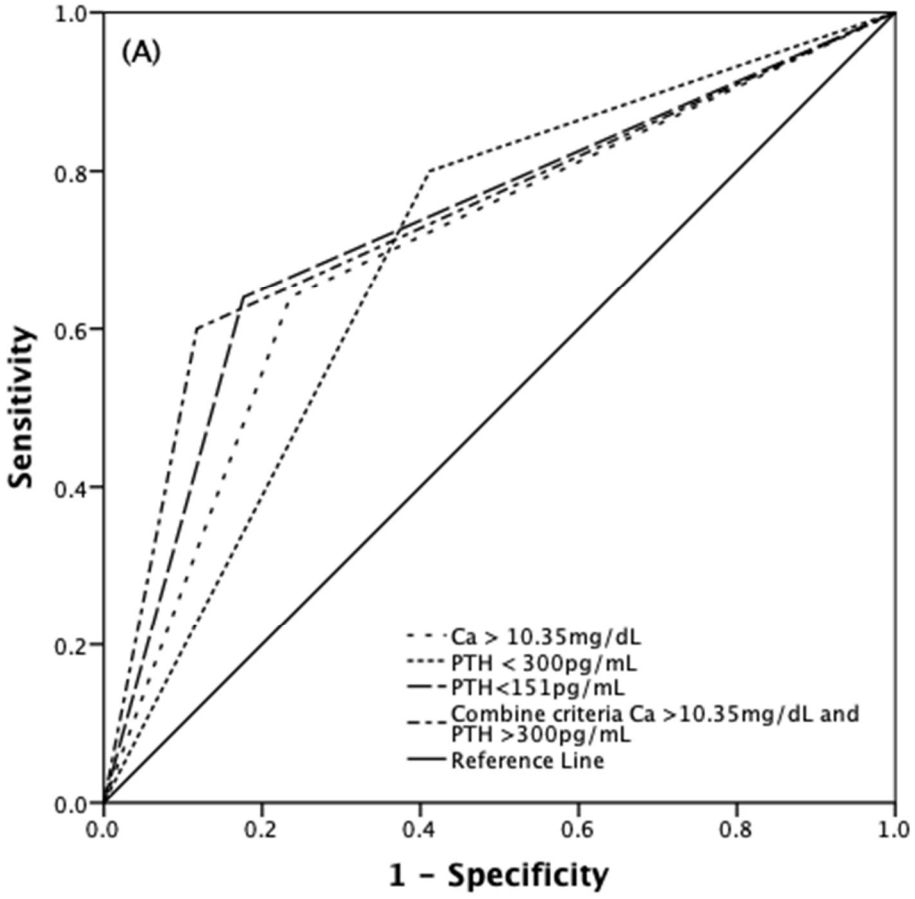
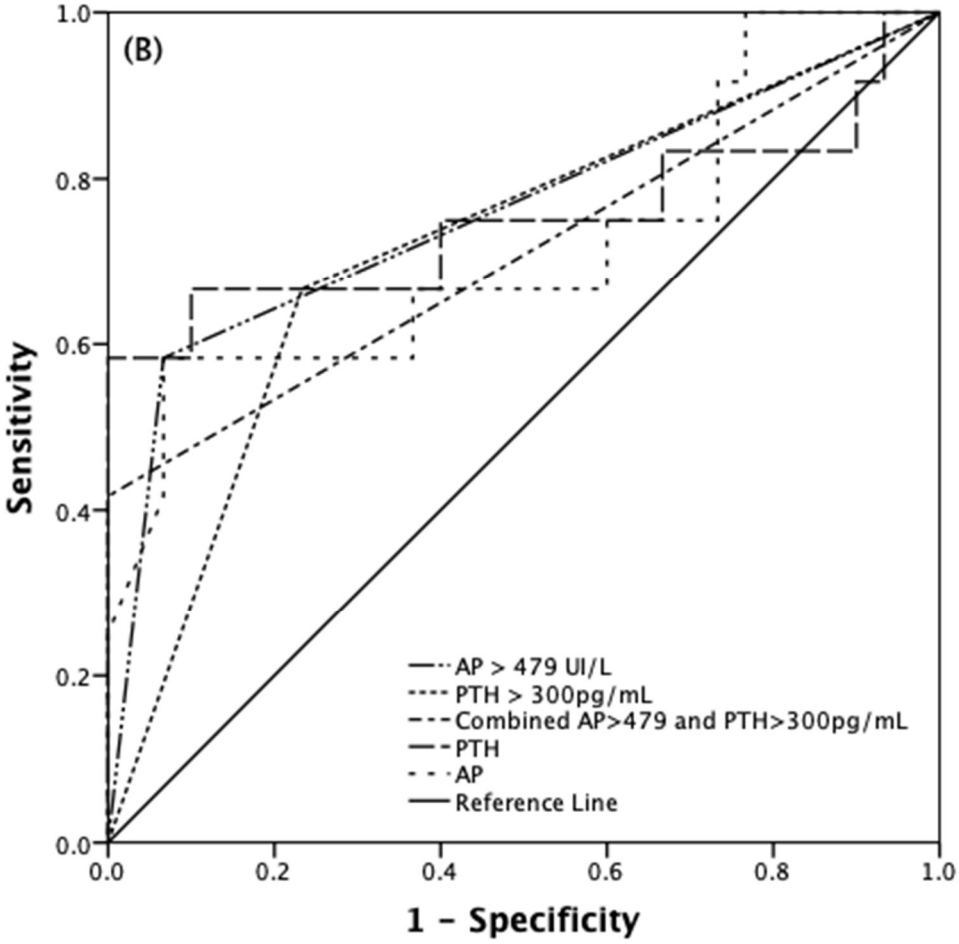


Figura 5- Curva ROC de biomarcadores para previsão de mineralização anormal



5 – DISCUSSÃO

5-DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstramos alta prevalência de doença de baixa remodelação, acompanhada de defeito de mineralização em um terço das crianças com DRC. Poucos casos apresentaram alterações no volume ósseo trabecular. Além disso, fatores como PTH, FA, cálcio, raça, idade e densidade mineral óssea se associaram aos parâmetros TMV. Esse achado confirmou nossa hipótese inicial de que essas e outras variáveis podem interferir na relação entre os marcadores séricos, a remodelação óssea e a mineralização.

Até onde temos conhecimento, este é o primeiro trabalho com casuística brasileira que analisou biópsia óssea em crianças com doença renal crônica pela classificação TMV. Pudemos observar doença óssea de baixa remodelação em 59% dos pacientes, achados que se assemelham aos resultados de Andrade e cols[66] que encontraram 60% de doença de baixa remodelação na sua casuística de crianças brasileiras em hemodiálise e diálise peritoneal. Nossos dados também são semelhantes aos de crianças norte-americanas, descritos por Mathias e cols [61], que encontraram 57% de doença de baixa remodelação em adolescentes e adultos jovens em diálise peritoneal. No entanto, nossos resultados diferem da maioria dos estudos de biópsia óssea em pediatria que mostram doença de alta

remodelação[55,58,,59,60,64,65], mesmo em estágios precoces da DRC, como demonstraram os estudos de Norman em 1980 [58] e Wesseling em 2012[55].

Pouco se sabe sobre a história natural da doença óssea no curso da DRC em crianças e adolescentes. É possível que nessa faixa etária, a alta remodelação esteja presente desde o início da doença, que se perpetue nos pacientes em diálise e que a baixa remodelação seja resultante das terapias com vitamina D e seus análogos. Diferente das crianças, em adultos a doença de baixa remodelação ocorre em uma proporção significativa de pacientes nos estágios iniciais da DRC [76]. Os estudos nessa faixa etária mostram que nesta fase da doença prevalecem condições inibitórias da remodelação óssea, como resistência à ação do PTH, níveis reduzidos de calcitriol, deficiência de hormônios sexuais, diabetes e toxinas urêmicas que inibem a sinalização da via Wnt / b-catenina nos osteócitos e aumentam a expressão de antagonistas desta via Wnt, como a esclerostina [20,77]. Nessas circunstâncias, a doença de alta remodelação ocorreria apenas mais tarde, quando os níveis séricos de PTH fossem capazes de superar a resistência periférica a este hormônio e aos outros fatores inibidores da formação óssea [20]. Assim, com o avanço da DRC, o PTH elevado ativaria o receptor de PTH/PTHrP nos osteócitos suprimindo a esclerostina e aumentando a atividade celular dos osteoblastos e também dos osteoclastos, resultando em um aumento da remodelação óssea [74]. Em

pediatria, Pereira e cols. mostraram aumento da expressão do FGF23 e da DMP1 em todos os pacientes, independentemente dos estágios da DRC, que não se correlacionaram com a remodelação [78]. Estes autores também mostraram que, diferentemente dos adultos, em crianças não há expressão óssea significativa de esclerostina. Portanto, nossa hipótese é de que, de uma maneira geral, crianças com DRC devem apresentar doença de alta remodelação. Estudos que mostram o contrário, como o nosso, avaliaram pacientes que foram submetidos a algum tipo de terapia que diminui a taxa de formação óssea.

Um dos tratamentos que pode modificar a remodelação óssea é a terapia dialítica. Sabe-se que tradicionalmente pacientes em diálise peritoneal apresentam doença de baixa remodelação, possivelmente pelo maior aporte de cálcio no dialisato. Em crianças, os resultados divergem nos diferentes estudos. Na série de Bakkaloglu e cols. todos os pacientes encontravam-se em diálise peritoneal e a prevalência foi de doença de alta remodelação [70]. No estudo de Yalçinkaya e cols. com crianças em diálise peritoneal, a prevalência foi de doença de alta remodelação [65], enquanto que Mathias e cols. mostraram doença de baixa remodelação em pacientes em hemodiálise [61]. No nosso estudo não observamos diferenças quanto a remodelação óssea e a modalidade de diálise. Em adultos brasileiros em dialise peritoneal, Oliveira e cols mostraram que a doença de baixa remodelação foi

prevalente. Neste estudo, não houve associação entre os níveis de cálcio do dialisato e a remodelação óssea. Os autores apontaram os baixos níveis séricos de 25-hidroxi vitamina D e alta expressão da esclerostina como fatores que contribuíram para a baixa remodelação óssea nesses pacientes[79].

Um outro fator que pode induzir baixa remodelação é a intoxicação por alumínio. Historicamente, nas décadas de 1970 e 1980, muito pacientes apresentavam doença de baixa remodelação que foram relacionada à intoxicação pelo alumínio. Felizmente, devido às melhorias nas técnicas de tratamento da água usada para hemodiálise e pelo abandono do uso de quelante de fósforo contendo alumínio, atualmente a intoxicação pelo alumínio é rara[20]. Na nossa série observamos presença de alumínio em 5 biópsias, sendo que 4 delas apresentavam doença de baixa remodelação e 1 doença de alta remodelação. Nenhum paciente fazia uso de quelante de fósforo a base de alumínio.

Na década seguinte (1990), outro fator etiológico envolvido na patogênese da doença óssea de baixa remodelação foi o uso de análogos ativos de vitamina D em altas doses[20]. Em 1994 o grupo de Salusky estudou o efeito do calcitriol na histologia óssea de 14 crianças e adolescentes com osteíte fibrosa. Com o tratamento, a remodelação óssea normalizou em 6 crianças e 6 crianças evoluíram com doença óssea adinâmica[80] No estudo de Bakkaloglu que mostrou

prevalência de doença de alta remodelação, todos os pacientes recebiam quelante de fósforo à base de cálcio no momento da biópsia, mas o calcitriol foi suspenso 4 semanas antes do procedimento [70]. Na nossa casuística e na série de Andrade e cols. as crianças estavam em uso de carbonato de cálcio e de calcitriol [66]. Infelizmente não dispomos dos dados com relação as doses de calcitriol nos nossos pacientes. Na época em que foram realizadas as biópsias não dispúnhamos do sevelamer. Além disto, as diálises eram realizadas com altas concentrações de cálcio no dialisato (3,5mEq/L). É possível que esses fatores em conjunto possam ter influenciado os nossos resultados.

O uso de calcitriol, paricalcitol, doxercalciferol em crianças em diálise pode estar associado à baixa remodelação óssea e ao retardo de crescimento nesses pacientes. O uso de calcitriol reduz a síntese do PTH e a expressão de seu receptor PTH/PTHrP na placa de crescimento epifisário dos ossos longos, o que resulta em alteração na proliferação e na diferenciação do condrócito na placa epifisária [81]. Kuizon e cols mostraram melhora do hiperparatireoidismo secundário em crianças com DRC em uso de calcitriol intermitente. Entretanto, observaram diminuição no escores Z de altura naquelas que desenvolveram doença óssea adinâmica [82]. Mais recentemente Wesseling e cols estudaram o efeito do calcitriol e do doxercalciferol em 51 crianças com doença de alta remodelação. Observaram

que a remodelação normalizou em 72% dos pacientes e apenas um desenvolveu doença adinâmica. No entanto, os parâmetros de mineralização permaneceram alterados em 80% das crianças [83]. O estudo de Schmitt e cols entretanto, mostrou maior incremento de estatura em crianças e adolescentes com PTH mais elevado durante o tratamento com calcitriol [84]. Dessa forma, a terapêutica clássica para o hiperparatireoidismo nos coloca diante de um dilema: se o paciente não é tratado com análogos de vitamina D pode apresentar doença óssea grave, com deformidades e alto risco de fratura. No entanto, o tratamento pode melhorar a remodelação, mas está associado a menor estatura e mineralização deficiente, principalmente se os níveis de PTH permanecerem elevados.

Na nossa casuística, a baixa estatura (escore Z estatura/idade <-2) estava presente em 60,5% das crianças e a mineralização estava alterada em 29% dos pacientes (n=12). Nossas crianças com defeito de mineralização eram mais velhas, com menor estatura, menor densidade mineral óssea e maior PTH e FA. No entanto, o desenho do nosso estudo não nos permitiu concluir se a idade afetou diretamente a mineralização, ou se foi uma consequência do maior tempo em diálise das crianças mais velhas.

Na avaliação do volume ósseo, a comparação com crianças brasileiras saudáveis mostrou que 74% dos nossos pacientes apresentavam volume ósseo

dentro da faixa de normalidade, alto volume em 19% e baixo em 7% dos pacientes. Esses resultados são concordantes com os achados de Waller [69] e Bakkaloglu [70] em crianças, mas difere dos estudos em adultos [28]. No que se refere ao volume ósseo, a raça, ao sexo e a idade, Dos Reis e cols em 2006 estudaram biópsias ósseas de 125 indivíduos de zero a 90 anos. Observaram que mulheres negras e homens brancos apresentavam volume ósseo maior do que mulheres brancas. Observaram também aumento do volume ósseo com o progredir da idade, até os 30 anos[75,85].

Ainda que o volume ósseo (BV/TV) dos nossos pacientes tenha se apresentado dentro da faixa da normalidade, quando avaliamos outros parâmetros estruturais observamos maior número de trabéculas (Tb.N) e menor separação trabecular (Tb.Sp). Este dado nos chamou a atenção quanto a possibilidade de alteração na arquitetura óssea que pudesse contribuir para o maior risco de fraturas, mas infelizmente não dispúnhamos do dado de incidência de fraturas na nossa casuística. Por questões técnicas de qualidade do material da biópsia, não foi possível avaliarmos o osso cortical.

Outro método para avaliar a DMO e prever fraturas é através da DXA[42]. No nosso estudo, 3 pacientes apresentaram baixa DMO à DXA. Os três pacientes eram adolescentes, dos quais, dois do sexo masculino, da raça branca, com níveis séricos de PTH muito elevados (952 e 1538 pg/ml) e muito baixa estatura (Z escore

est/idade -4,25 e -3,63). À histomorfometria os 3 pacientes apresentavam baixa remodelação, mineralização normal e volume ósseo normal. No estudo de Andrade e cols os resultados da DXA foram semelhantes em crianças com alta e baixa remodelação, e em nenhum caso observaram baixa densidade mineral e óssea[66] . No estudo de Waller e cols por sua vez, 8% dos pacientes apresentavam baixa DMO à DXA. Este autor não encontrou correlação entre os achados da DXA e os dados laboratoriais [86]. Curiosamente, nossos pacientes apresentavam níveis séricos de PTH muito elevados com baixa remodelação e mineralização normal. Entretanto, este achado pode ser explicado pelo estudo de Costa e cols, que encontraram uma dissociação entre a resposta da paratireóide e os parâmetros de reabsorção em pacientes com DRC e hiperparatiroidismo secundário, tratados com calcitriol. Os autores observaram diminuição na taxa de formação óssea. No entanto, a reabsorção permaneceu alta naqueles pacientes que foram classificados como não responsivos ao calcitriol e que não tiveram mudanças nos níveis séricos de PTH [87].

Os estudos pediátricos que avaliam a densidade mineral óssea através da DXA em crianças com DRC são escassos e discordantes[88, 89, 90] Essas diferenças podem estar relacionadas ao pequeno número de pacientes nos estudos, às características clínicas dos pacientes, bem como os diferentes tipos de tratamentos para a doença mineral óssea. Observamos uma associação entre Z

escore da DXA e alteração de mineralização, mostrando alterações precoces na histologia óssea, antes mesmo do diagnóstico de baixa densidade mineral óssea (escore Z <-2) à DXA.

Ainda referente aos estudos de histomorfometria na osteodistrofia renal, pouco se sabe sobre o efeito da doença renal primária na remodelação e na mineralização óssea. Yalçinkaya e cols em estudo com 17 crianças, adolescentes e adultos jovens entre 7 e 20 anos, sugeriram que o risco de desenvolver doença de alta remodelação seria maior nas crianças mais velhas, com progressão mais lenta da DRC, onde a doença de base seria um acometimento túbulo-intersticial (CAKUT). Ao contrário, crianças com doenças glomerulares com um curso mais rápido da DRC teriam menor risco de desenvolver doença óssea de alta remodelação[65]. Wesselin e cols[91] avaliaram a associação entre a etiologia da DRC, o metabolismo mineral e a histomorfometria óssea em 207 pacientes com média de idade de 12,7 ± 5,6 anos. A remodelação e o volume ósseo não diferiram entre os grupos. A mineralização estava anormal em pacientes com CAKUT. No entanto na análise de regressão múltipla, a etiologia da doença não foi um preditor independente das variáveis histomorfométricas, e sim, o calcio, o fósforo, a fosfatase alcalina e o PTH. Na nossa casuística, comparamos as CAKUTs com as demais etiologias (não CAKUT). Não encontramos diferenças com relação aos

dados demográficos, ou aos parâmetros histomorfométrico e nem aos dados laboratoriais.

Na avaliação dos parâmetros histomorfométricos de acordo com a idade, o sexo e a modalidade dialítica, não encontramos diferenças. No entanto, com relação à raça, as crianças e adolescentes não brancas apresentavam parâmetros de formação e reabsorção ósseos mais elevados, e uma tendência a uma maior taxa de formação óssea, confirmando o impacto da raça nos parâmetros histomorfométricos ósseos documentados em adultos [85] e recentemente em crianças [92] .

A busca por um marcador bioquímico para prever as alterações da osteodistrofia renal é contínua. Alguns estudos pediátricos foram realizados na tentativa de correlacionar biomarcadores séricos com o padrão ouro, a histomorfometria óssea. Entretanto, até o momento não dispomos de um marcador, que individualmente ou em combinação seja capaz de diagnosticar as alterações de mineralização óssea e/ou de remodelação na DRC. Por estimular diretamente a atividade de osteoblastos, o PTH tem sido avaliado como marcador de remodelação em diversos estudos[55,60,61,62,64,65,66,70]. Embora com ampla variação, em todos os estudos pediátricos, a doença de alta remodelação se caracterizou por níveis de PTH acima do valor normal, sendo os níveis mais elevados nos pacientes com

osteíte fibrosa, enquanto que os pacientes com doença óssea adinâmica apresentaram níveis séricos de PTH mais baixos. No entanto, ainda se desconhece o nível sérico de PTH e de fosfatase alcalina que possam predizer as alterações na mineralização e/ou na remodelação. Vale salientar que em alguns estudos o número de pacientes foi pequeno, com poucas crianças mais jovens, algumas crianças em estudos mais antigos receberam alumínio, as doses de vitamina D foram variáveis, e alguns realizavam diálise com cálcio elevado no dialisato[93]. Em nosso estudo, o PTH e a FA se associaram à remodelação e à mineralização, confirmados pelas curvas ROC e regressão logística, como já demonstrado por outros [64,70]. No entanto, reconhecemos a limitação de seu desempenho para distinguir claramente remodelação alta de baixa, e mineralização normal da anormal.

Este foi o segundo estudo de histomorfometria óssea realizado em nosso país e o primeiro a aplicar a classificação TMV. Como limitações, podemos citar seu desenho retrospectivo, o uso de um repositório de biópsias ósseas de pacientes em diálise realizadas nos anos 2000 e 2001, numa época em que se utilizavam doses maiores de sais de cálcio e calcitriol do que as atuais. Algumas biópsias foram realizadas com agulha de Jamishid® com cortes histológicos pequenos que não nos permitiram ir mais além e analisar o compartimento cortical, além de expressão de proteínas ósseas, que poderiam nos ajudar a avançar no entendimento da

fisiopatologia da osteodistrofia renal pediátrica. Por outro lado, podemos ressaltar os pontos fortes do nosso trabalho como uma casuística representativa, uso da histomorfometria à luz das recomendações atuais com o sistema TMV e a realização de correlações dos achados histomorfométricos com dados de estatura, de etiologia da DRC, dados bioquímicos e de exame de imagem.

Os nossos resultados reforçam a necessidade de se ampliar os conhecimentos sobre a osteodistrofia renal na população pediátrica através de estudos prospectivos de biópsia óssea para melhor entendimento sobre a fisiopatologia, sobre o diagnóstico e para avaliação dos tratamentos da osteodistrofia renal em crianças e adolescentes com doença renal crônica.

6 – CONCLUSÕES

6–CONCLUSÕES

A baixa remodelação óssea foi o achado mais frequente, provavelmente associada ao uso de análogos da vitamina D e sais de cálcio

A mineralização óssea estava anormal em um terço da amostra, e se associou a baixa estatura.

O volume ósseo foi normal na maior parte das biópsias.

Crianças e adolescentes não brancos apresentaram tendência a maior taxa de remodelação óssea.

Não houve diferença dos achados histológicos de acordo com o sexo, a idade , a modalidade dialítica e a etiologia da DRC

O PTH e a fosfatase alcalina não foram bons preditores de remodelação e mineralização, conforme já demonstrado em outros estudos

7 – REFERÊNCIAS

7-REFERÊNCIAS

1. Collaborators GB of DS 2013. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet. 2015;386(9995):743–800.

2. World Human Organization. Mortality and global health estimates: Causes of death: Projections for 2015-2030 [Internet]. [cited 2017 Mar 17]. Available from: apps.who.int/gho/data/node.main

3. SBN. Censo anual da Sociedade Brasileira de Nefrologia-2015 [Internet]. [cited 2017 Mar 17]. Available from: sbn.org.br

4. Mcdonald SP, Craig JC. Long-Term Survival of Children with End-Stage Renal Disease. N Engl J Med. 2004;2654–62.

5. USRDS. US Renal Data System 2016 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United StatesNo Title [Internet]. [cited 2017 Mar 15]. Available from: usrd.org

6. Harambat J, Van Stralen KJ, Kim JJ, Tizard EJ. Epidemiology of chronic kidney disease in children. Pediatr Nephrol. 2012;27(3):363–73.

7. Orr NIT, McDonald SP, McTaggart S, Henning P, Craig JC. Frequency, etiology and treatment of childhood end-stage kidney disease in Australia and New Zealand. Pediatr Nephrol. 2009; 24(9):1719-26

8. Orta-Sibu N, Exeni RA, In: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P YNGC. Latin American. In: Pediatric Nephrology. 2009. p. 1969–1974.

9. E. Klen NSF. Abstract 725: Register of Children and Adolescents in

Dialysis Treatment in Rio de Janeiro. Congress of the International Pediatric Nephrology Association. Pediatr Nephrol. 2010;9(25):1939.

10. Nogueira PCK, Feltran LDS, Camargo MF, Leão ER, Benninghoven JR, Gonçalves NZ, et al. Prevalência estimada da doença renal crônica terminal em crianças no estado de São Paulo. Rev Assoc Med Bras. 2011;57(4):443–9.

11. Konstantyner T, Sesso R, De Camargo MF, De Santis Feltran L, Koch-Nogueira PC. Pediatric chronic dialysis in Brazil: Epidemiology and regional inequalities. PLoS One. 2015;10(8):1–15.

12. Andrassi KM. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Kidney Int Suppl. 2013; 84(3):622-3.

13. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Am J Kidney Dis. 2002; Suppl 1):S1-266

14. Coulthard MG. Maturation of glomerular filtration in preterm and mature babies. Early Hum Dev. 1985; 11(3-4):281-92

15. Schwartz GJ, Work DF. Measurement and estimation of GFR in children and adolescents. Clin J Am Soc Nephrol. 2009. 4(11):1832-43

16. Schwartz GJ, Muñoz A, Schneider MF, Mak R, Kaskel F, Warady AB, et al. New Equations to Estimate GFR in Children with CKD. J Am Soc Nephrol. 2009; 20(3):629-37

17. Hogg RJ, Furth S, Lemley K V., Portman R, Schwartz GJ, Coresh J, et al. National Kidney Foundation’s Kidney Disease Outcomes Quality Initiative Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease in Children and

Adolescents: Evaluation, Classification, and Stratification. Pediatrics. 2003; 111(6 Pt 1):1416-21

18. Greenbaum LA, Warady BA, Furth SL. Current Advances in Chronic Kidney Disease in Children: Growth, Cardiovascular, and Neurocognitive Risk Factors. Semin Nephrol. 2009;29(4):425–34.

19. Cynthia J. Wong, Marva Moxey-Mims, Judith Jerry-Fluker, Bradley A. Warady SLF. CKiD (CKD in Children) Prospective Cohort Study: A Review of Current Findings. Am J Kidney Dis. 2013;60(6):1002–11.

20. Drüeke TB, Massy ZA. Changing bone patterns with progression of chronic kidney disease. Kidney Int. 2016;89(2):289–302.

21. Slatopolsky E, Caglar S, Pennell JP, Taggart DD, Canterbury JM, Reiss E, et al. On the pathogenesis of hyperparathyroidism in chronic experimental renal insufficiency in the dog. J Clin Invest. 1971;50(3):492–9.

22. Gutierrez O, Isakova T, Rhee E, Shah A, Holmes J, Collerone G, et al. Fibroblast Growth Factor-23 Mitigates Hyperphosphatemia but Accentuates Calcitriol Deficiency in Chronic Kidney Disease. J Am Soc Nephrol. 2005; 16(7):2205-15

23. Kuro-O M. Klotho. Pflugers Arch Eur J Physiol. 2010;459(2):333–43.

24. Isakova T, Wahl P, Vargas GS, Gutiérrez OM, Scialla J, Xie H, et al. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. Kidney Int. 2011; 79(12):1370-8

25. Slatopolsky E. The intact nephron hypothesis: The concept and its implications for phosphate management in CKD-related mineral and bone disorder. Kidney Int. 2011;79(suppl. 121):3–8.

26. Vervloet MG, Massy ZA, Brandenburg VM, Mazzaferro S, Cozzolino M, Ureña-Torres P, et al. Bone: A new endocrine organ at the heart of chronic

kidney disease and mineral and bone disorders. Lancet Diabetes Endocrinol. 2014. 2(5):427-36

27. Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Kidney Int. 2006;69(11):1945–53.

28. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease-mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). Kidney Int Suppl. 2009; (113):S1-130

29. Bacchetta J, Harambat J, Cochat P, Salusky IB, Wesseling-Perry K. The consequences of chronic kidney disease on bone metabolism and growth in children. Nephrol Dial Transplant. 2012;27(8):3063–71.

30. Shroff R, Weaver DJ, Mitsnefes MM. Cardiovascular complications in children with chronic kidney disease. Nat Rev Nephrol.. 2011. 13;7 (11):642-9

31. Wesseling-Perry K, Salusky IB. Phosphate binders, vitamin D and calcimimetics in the management of chronic kidney disease-mineral bone disorders (CKD-MBD) in children. Pediatr Nephrol. 2013;28(4):617–25.

32. Wesseling-Perry K. Defective Skeletal Mineralization in Pediatric CKD. Curr Osteoporos Rep. 2015;13(2):98–105.

33. Denburg MR, Tsampalieros AK, De Boer IH, Shults J, Kalkwarf HJ, Zemel BS, et al. Mineral metabolism and cortical volumetric bone mineral density in childhood chronic kidney disease.J Clin Endocrinol Metab. 2013; 98(5):1930-8

34. Groothoff JW, Gruppen MP, Offringa M, Hutten J, Lilien MR, Van de Kar NJ, et al. Mortality and causes of death of end-stage renal disease in

children: A dutch cohort study. Kidney Int. 2002; 61(2):621-9

35. Groothoff JW, Offringa M, Van Eck-Smit BLF, Gruppen MP, Van De Kar NJ, Wolff ED, et al. Severe bone disease and low bone mineral density after juvenile renal failure. Kidney Int. 2003; 63(1):266-75

36. Haffner D, Schaefer F, Nissel R, Wühl E, Tönshoff B, Mehls O. Effect of Growth Hormone Treatment on the Adult Height of Children with Chronic Renal Failure. N Engl J Med. 2000; 28;343(13):923-30

37. Bonthuis M, Busutti M, van Stralen KJ, Jager KJ, Baiko S, Bakkaloğlu S, et al. Mineral metabolism in European children living with a renal transplant: A European society for paediatric nephrology/European renal association–european dialysis and transplant association registry study. Clin J Am Soc Nephrol. 2015; 7;10(5):767-75

38. Helenius I, Remes V, Salminen S, Valta H, Mäkitie O, Holmberg C, et al. Incidence and predictors of fractures in children after solid organ transplantation: A 5-year prospective, population-based study. J Bone Miner Res. 2006; 21(3):380-7

39. Denburg MR, Kumar J, Jemielita T, Brooks ER, Skversky A, Portale AA, et al. Fracture Burden and Risk Factors in Childhood CKD: Results from the CKiD Cohort Study. J Am Soc Nephrol. 2016; 27(2):543-50

40. Pereira RC, Bischoff DS, Yamaguchi D, Salusky IB, Wesseling-Perry K. Micro-CT in the assessment of pediatric renal osteodystrophy by bone histomorphometry. Clin J Am Soc Nephrol. 2016; 7;11(3):481-7

41. Crabtree N, Ward K. Bone Densitometry: Current Status and Future Perspective. Endocrine Development. 2015. 28:72-83

42. Gordon CM, Leonard MB, Zemel BS. 2013 pediatric position development conference: EXECUTIVE summary and reflections. J Clin

Densitom. 2014; 17(2):219-24

43. Terpstra AM, Kalkwarf HJ, Shults J, Zemel BS, Wetzsteon RJ, Foster BJ, et al. Bone Density and Cortical Structure after Pediatric Renal Transplantation. J Am Soc Nephrol. 2012; 23(4):715-26

44. Lima EM, Goodman WG, Kuizon BD, Gales B, Emerick A, Goldin J et al. Bone density measurements in pediatric patients with renal osteodystrophy. Pediatr Nephrol. 2003; 18(6):554-9

45. Marques IDB, Araújo MJCLN, Graciolli FG, Reis LM do., Pereira RM, Custódio MR, et al. Biopsy vs. peripheral computed tomography to assess bone disease in CKD patients on dialysis: differences and similarities. Osteoporos Int. 2017;28(5):1675–83.

46. Bacchetta J, Boutroy S, Vilayphiou N, Ranchin B, Fouque-Aubert A, Basmaison O, et al. Bone assessment in children with chronic kidney disease: Data from two new bone imaging techniques in a single-center pilot study. Pediatr Nephrol. 2011; 26(4):587-95

47. McNerny EMB, Nickolas TL. Bone Quality in Chronic Kidney Disease: Definitions and Diagnostics. Curr Osteoporos Rep. 2017; 15(3):207-213

48. Diamond T, Elder GJ. Is there a practical role for bone biopsy in chronic kidney disease? Nephrology. 2017;22:22–6.

49. Carvalho C, Alves CM, Frazão JM. The role of bone biopsy for the diagnosis of renal osteodystrophy: a short overview and future perspectives. J Nephrol. 2016;29(5):617–26.

50. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, 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(1):2–17.

51. Gomes SA, Dos Reis LM, De Oliveira IB, Noronha IDL, Jorgetti V, Heilberg IP. Usefulness of a quick decalcification of bone sections embedded in methyl metacrylate: An improved method for immunohistochemistry. J Bone Miner Metab. 2008;26(1):110–3.

52. Christov M, Pereira R, Wesseling-Perry K. Bone biopsy in renal osteodystrophy: continued insights into a complex disease. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2013;22(2):210–5.

53. Atkins GJ, Findlay DM. Osteocyte regulation of bone mineral: A little give and take. Osteoporos Int. 2012;23(8):2067–79.

54. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteocytes: Central conductors of bone biology in normal and pathological conditions. Acta Physiol. 2012;204(3):317–30.

55. Wesseling-Perry K, Pereira RC, Tseng C-H, Elashoff R, Zaritsky JJ, Yadin O, et al. Early Skeletal and Biochemical Alterations in Pediatric Chronic Kidney Disease. Clin J Am Soc Nephrol. 2012;7(1):146–52.

56. Hernandez JD, Wesseling K, Pereira R, Gales B, Harrison R, Salusky IB. Technical approach to iliac crest biopsy. Clin J Am Soc Nephrol. 2008;3 Suppl 3(16):164–9.

57. Rauch F. Bone biopsy: Indications and methods. Endocr Dev. 2009;16:49–57.

58. Norman ME, Mazur AT, Borden IV S, Gruskin A, Anast C, Baron R, et al. Early diagnosis of juvenile renal osteodystrophy. J Pediatr. 1980;97(2):226–32.

59. Hodson EM, Evans R a, Dunstan CR, Hills EE, Shaw PF. Quantitative bone histology in children with chronic renal failure. Kidney Int.

1982;21(6):833–9.

60. Salusky IB, Coburn JW, Brill J, Foley J, Slatopolsky E, Fine RN, et al. Bone disease in pediatric patients undergoing dialysis with CAPD or CCPD. Kidney Int. 1988;33:975–82.

61. Mathias R, Salusky I, Harman W, Paredes A, Emans J, Segre G, et al. Renal bone disease in pediatric and young adult patients on hemodialysis in a children's hospital. J Am Soc Nephrol. 1993;3(12):1938–46.

62. Salusky IB, Ramirez JA, Oppenheim W, Gales B, Segre G V, Goodman WG. Biochemical markers of renal osteodystrophy in pediatric patients undergoing CAPD/CCPD. Kidney Int. 1994;45:253–8.

63. Sanchez CP, Salusky IB, Kuizon BD, Ramirez JA, Gales B, Ettenger RB, et al. Bone disease in children and adolescents undergoing successful renal transplantation. Kidney Int. 1998;53(5):1358–64.

64. Ziółkowska H, Pańczyk-Tomaszewska M, DęLbiński A, Polowiec Z, Sawicki A, Sieniawska M. Bone biopsy results and serum bone turnover parameters in uremic children. Acta Paediatr.. 2000;89(6):666–671.

65. Yalçinkaya F, Ince E, Tümer N, Ensari A, Ozkaya N. Spectrum of renal osteodystrophy in children on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Pediatr Int. 2000;42(1):53–7.

66. Andrade MC, Carvalhaes JT, Carvalho AB, Lazarretti-Castro M, Brandão C. Bone mineral density and bone histomorphometry in children on long-term dialysis. Pediatr Nephrol. 2007;22(10):1767–72.

67. Parfitt a. M, Travers R, Rauch F, Glorieux FH. Structural and cellular changes during bone growth in healthy children. Bone. 2000;27(4):487–94.

68. Glorieux FH, Travers R, Taylor A, Bowen JR, Rauch F, Norman M, et al. Normative data for iliac bone histomorphometry in growing children. Bone.

2000;26(2):103–9.

69. Waller S, Shroff R, Freemont AJ, Rees L. Bone histomorphometry in children prior to commencing renal replacement therapy. Pediatr Nephrol. 2008;23(9):1523–9.

70. Bakkaloglu SA, Wesseling-Perry K, Pereira RC, Gales B, Wang HJ, Elashoff RM, et al. Value of the new bone classification system in pediatric renal osteodystrophy. Clin J Am Soc Nephrol. 2010;5(10):1860–6.

71. Katherine Wesseling-Perry. Osteocyte dysfunction and renal osteodystrophy: not just calcium and phosphorus anymore. 2017;(Figure 1):1276–8.

72. No K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Bone Metabolism and Disease in Children With Chronic Kidney DiseaseTitle. AJKD. 2005;46(S1).

73. KDIGO CKD Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease. Kidney Int. 2012; 2(4), 279-335

74. Graciolli FG, Neves KR, Barreto F, Barreto D V., dos Reis LM, Canziani ME, et al. The complexity of chronic kidney disease–mineral and bone disorder across stages of chronic kidney disease. Kidney Int . 2017;1–11.

75. Dos Reis LM, Batalha JR, Muñoz DR, Borelli A, Correa PHS, Carvalho AB, et al. Brazilian normal static bone histomorphometry: Effects of age, sex, and race. J Bone Miner Metab. 2007; 25(6):400-6.

76. Lobão R, Carvalho AB, Cuppari L, Ventura R, Lazaretti-Castro M, Jorgetti V, et al. High prevalence of low bone mineral density in pre-dialysis chronic kidney disease patients: bone histomorphometric analysis. Clin Nephrol. 2004; 62(6):432-9

77. Barreto FC, Barreto DV, Canziani MEF, Tomiyama C, Higa A, Mozar A, et al. Association between indoxyl sulfate and bone histomorphometry in pre-

dialysis chronic kidney disease patients. J Bras Nefrol. 2014; 36(3):289-96

78. Pereira RC, Juppner H, Azucena-Serrano CE, Yadin O, Salusky IB, Wesseling-Perry K. Patterns of FGF-23, DMP1, and MEPE expression in patients with chronic kidney disease. Bone. 2009;45(6):1161–8.

79. de Oliveira RA, Barreto FC, Mendes M, dos Reis LM, Castro JH, Britto ZML, et al. Peritoneal dialysis per se is a risk factor for sclerostin-associated adynamic bone disease. Kidney Int. 2015;87(5):1039–45.

80. Goodman WG, Ramirez JA, Belin TR, Chon Y, Gales B, Segre G V., et al. Development of adynamic bone in patients with secondary hyperparathyroidism after intermittent calcitriol therapy. Kidney Int. 1994; 46(4):1160-6

81. Sanchez CP. Modulation of endochondral bone formation: Roles of growth hormone, 1,25-dihydroxyvitamin D and hyperparathyroidism. In: Pediatric Nephrology. 2000. 14(7):646-9

82. Kuizon BD, Goodman WG, Jüppner H, Boechat I, Nelson P, Gales B, et al. Diminished linear growth during intermittent calcitriol therapy in children undergoing CCPD. Kidney Int. 1998; 53(1):205-11

83. Wesseling-Perry K, Pereira RC, Sahney S, Gales B, Wang H-J, Elashoff R, et al. Calcitriol and doxercalciferol are equivalent in controlling bone turnover, suppressing parathyroid hormone, and increasing fibroblast growth factor-23 in secondary hyperparathyroidism. Kidney Int. 2011;79(1):112–9.

84. Schmitt CP, Ardissino G, Testa S, Claris-Appiani A, Mehls O, Michelis K, et al. Growth in children with chronic renal failure on intermittent versus daily calcitriol. Pediatr Nephrol. 2003; 18(5):440-4

85. Jorgetti V, dos Reis LM, Ott SM. Ethnic differences in bone and

mineral metabolism in healthy people and patients with CKD. Kidney Int. 2014;85(6):1283–9.

86. Waller S, Ridout D, Rees L. Bone mineral density in children with chronic renal failure. Pediatr Nephrol. 2007; 22(1):121-7

87. Falcão Pedrosa Costa A, Machado dos Reis L, Custódio Ribeiro M, Affonso Moysés RM, Jorgetti V. Effects of calcitriol on parathyroid function and on bone remodelling in secondary hyperparathyroidism. Nephrol Dial Transplant. 2003;18(4):743-9

88. Bakr AM. Bone mineral density and bone turnover markers in children with chronic renal failure. Pediatr Nephrol. 2004; 19(12):1390-3

89. Ahmed SF, Russell S, Rashid R, Beattie TJ, Murphy A V., Ramage IJ, et al. Bone mineral content, corrected for height or bone area, measured by DXA is not reduced in children with chronic renal disease or in hypoparathyroidism. Pediatr Nephrol. 2005; 20(10):1466-72

90. Schmitt CP, Mehls O. Mineral and bone disorders in children with chronic kidney disease. Nat Rev Nephrol. 2011;7(11):624–34.

91. Sirimongkolchaiyakul O; Wesseling-Perry K; Pereira RC SI. American Society of Nephrology Abstract Supplement. J Am Soc Nephrol. 2017;28:917.

92. Laster M, Pereira RC, Salusky IB. Racial differences in bone histomorphometry in children and young adults treated with dialysis. Bone. 2019;127:114-9.].

93. Rees L. What parathyroid hormone levels should we aim for in children with stage 5 chronic kidney disease; what is the evidence? Pediatr Nephrol. 2008;23(2):179–84.

8-APÊNDICE

8- APÊNDICE

Artigo Submetido a revista Pediatric Nephrology

Pediatric Nephrology

Association of parathormone and alkaline phosphatase with bone turnover and mineralization in children with CKD: effect of age, gender and race

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PNEP-D-19-00592
Full Title:	Association of parathormone and alkaline phosphatase with bone turnover and mineralization in children with CKD: effect of age, gender and race
Article Type:	Original Article
Corresponding Author:	ROSA Maria Affonso Moysés, M.D., Ph.D Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina Sao Paulo, Sao Paulo BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Emilia Maria Dantas Soeiro, M.D.
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Emilia Maria Dantas Soeiro, M.D.
	Lucimary Castro Sylvestre
	Rejane P Bernardes
	Rosilene Motta Elias
	Luciene Machado dos Reis
	Vanda Jorgetti
	Rosa Maria Affonso Moysés, M.D, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Funding Information:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico — Dr Rosa Maria Affonso Moysés
Abstract:	Abstract Studies investigating bone histology in children with chronic kidney disease (CKD) are scarce. Forty-two patients, mean age 11.3 ± 4.3 years with 5D CKD, underwent double tetracycline labeling bone biopsy and the relationship between clinical features, biochemical markers, and bone densitometry (DXA) was investigated. Low bone turnover was present in 59% of patients, abnormal mineralization in 29%, and low bone volume in 7% of patients. Higher bone formation rate was found in non-caucasian patients, whereas abnormal mineralization occurred in older and shorter children. We found no impact of gender and etiology of renal disease in our population. PTH and alkaline phosphatase (AP) showed a positive correlation with bone turnover. ROC curve analysis showed a fair performance of biomarkers to predict TMV status. PTH and calcium predicted low turnover (AUC 0.74, sensitivity 0.60 and specificity 0.88). PTH also predicted abnormal mineralization (AUC 0.75, sensitivity 0.67 and specificity 0.90). Albeit PTH and AP were associated with turnover and mineralization, we recognize the limitation of their performance to clearly distinguish high from low turnover and normal from abnormal mineralization. Our results reinforce the need to expand knowledge about renal osteodystrophy in pediatric population through prospective bone biopsy studies.
Suggested Reviewers:	Isidro Salusky ISalusky@mednet.ucla.edu expert on CKD-MBD

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Association of parathormone and alkaline phosphatase with bone turnover and mineralization in children with CKD: effect of age, gender and race

Soeiro EMD[1,2,3]; Castro L[4]; Menezes R[4]; Elias, RM[1]; dos Reis LM[1]; Jorgetti V[1]; Moysés RMA[1]

1- Laboratório de Investigação Médica 16, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil

2- Faculdade Pernambucana de Saúde, Brazil

3- Instituto de Medicina Integral de Pernambuco, Brazil

4- Hospital Pequeno Príncipe, Brasil

Corresponding author:

Rosa M. A. Moysés

LIM 16 - Nephrology Department

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Av. Dr. Arnaldo, 455, 3º andar, sala 3342, CEP 01246-903

São Paulo, SP, Brazil

rosa.moyses@uol.com.br

Abstract

Studies investigating bone histology in children with chronic kidney disease (CKD) are scarce. Forty-two patients, mean age 11.3 ± 4.3 years with 5D CKD, underwent double tetracycline labeling bone biopsy and the relationship between clinical features, biochemical markers, and bone densitometry (DXA) was investigated. Low bone turnover was present in 59% of patients, abnormal mineralization in 29%, and low bone volume in 7% of patients. Higher bone formation rate was found in non-caucasian patients, whereas abnormal mineralization occurred in older and shorter children. We found no impact of gender and etiology of renal disease in our population. PTH and alkaline phosphatase (AP) showed a positive correlation with bone turnover. ROC curve analysis showed a fair performance of biomarkers to predict TMV status. PTH and calcium predicted low turnover (AUC 0.74, sensitivity 0.60 and specificity 0.88). PTH also predicted abnormal mineralization (AUC 0.75, sensitivity 0.67 and specificity 0.90). Albeit PTH and AP were associated with turnover and mineralization, we recognize the limitation of their performance to clearly distinguish high from low turnover and normal from abnormal mineralization. Our results reinforce the need to expand knowledge about renal osteodystrophy in pediatric population through prospective bone biopsy studies.

Key words: Chronic kidney disease; Bone diseases, Metabolic; Bone biopsy; Histomorphometry; Renal osteodystrophy

Introduction

Mineral and bone disorders in the context of CKD affect children causing multiples unfavorable outcomes including but not restricted to fractures, pain, bone deformities and growth failure that affect the quality of life of these children and adolescents, which in turn perpetuate into adulthood [1]. The recognition of renal osteodystrophy (ROD) is extremely important, and bone biopsy, which is considered the gold standard method, is required to make the diagnosis. Bone biopsy is a safe and well-tolerated procedure that helps to understand the pathophysiology and course of bone disease, to associate the histological findings with clinical symptoms of pain, fracture, bone deformities, and to determine the effectiveness of the therapy. In 2006, the KDIGO guidelines recommended the classification of the ROD be based on parameters of Turnover, Mineralization, and Volume: the TMV system [2]. However, there are few studies in the pediatric population that performed bone histomorphometric analysis based on TMV criteria [3-5]. The search for a biochemical marker to predict changes in bone turnover and mineralization is continuous. Studies in the pediatric population have shown that high serum parathormone (PTH) and alkaline phosphatase (AP) may characterize a high turnover disease, whereas low PTH and AP suggest adynamic bone disease [6-10]. However, there is no cut-off for serum PTH and AP that can predict turnover and mineralization with certainty in children as well as in adults [11-13]. This might be explained by the diversity among studies regarding age [6, 9], kidney disease etiology [6], race [14], dialysis modality [6, 7, 9], and clinical treatment [15]. In this study, we aimed to evaluate the association of bone histomorphometry

and double-energy x-ray absorptiometry (DXA) with possible interference factors such as age, race, and etiology of CKD in children and adolescents. We also addressed the turnover and mineralization prediction capability of bone turnover markers (BTM) in this population.

Patient population

In this retrospective study, we analyzed bone histomorphometry of children from 1 to 18 years old, on a regular dialysis program at Pequeno Príncipe Children's Hospital, Curitiba, Brazil. All bone biopsy (n = 59) and dual-energy x-ray absorptiometry (DXA; n = 33) procedures for either diagnosis or guidance of therapy between 2001 and 2003 were included. All patients had informed consent signed by their legal guardian. Clinical data were obtained from their medical records at the time of the bone biopsy. The local Ethics Committee approved the study (#77530117.0.3001.0065).

Laboratory Data

PTH (pg/ml) was measured by electrochemiluminometric method. Alkaline phosphatase (IU/L) analysis was performed by automated kinetic method. Calcium (mg/dl) and phosphorus (mg/dl) were measured by automated colorimetric method. Reference values were expressed according to the recommendations of K/DOQI and KDIGO [16, 17].

Bone densitometry

Whole-body DXA was performed by a HOLOGIG densitometer (Hologic Inc, Bedford, MA, USA) with V8.17a:3 software (Hologic, Waltham, MA, USA). DXA results were expressed as the number of standard deviations from the appropriate normal mean (Z-score), according to gender and age range and corrected for height. Z-scores ≤ -2 were considered as bone mineral density lower than expected for age [18].

Bone Biopsy

Bone biopsy was performed on anteroposterior iliac crest under anesthesia with a Jamshidi® needle. Prior to biopsy, patients received a course of double-labeling tetracycline (10 mg/kg/d) for 2 days, with a 10-day interval, giving a total dose of 40 mg/kg. The biopsy was performed 3 to 5 days after the end of the antibiotic, in a protocol adapted from Salusky et al [19]. The obtained bone fragment was stored in 70% alcohol and fixed in 100% ethanol, dehydrated and embedded in methyl methacrylate, 5µm thick sections were stained with toluidine blue, pH 6.4, and unstained 10µm sections were obtained for analysis of dynamic parameters under the ultraviolet light microscope [20].

Histomorphometry

Histomorphometric analysis was performed using a semi-automated method with the Nikon microscope, Labophot-2a, cursor, Osteomeasure software digitizer plate (Osteometrics Inc., Atlanta, GA, USA). Histomorphometric parameters were divided into structural, static and dynamic according

to the American Society of Bone and Mineral Research standardized nomenclature [21]. Static histomorphometric parameters were compared with healthy Brazilian children and adolescents [22] and dynamic parameters with normal controls according to Glorieux et al. [23].

Turnover, Mineralization and Volume (TMV) System Classification

Histomorphometric analysis of biopsies followed the recommendations of KDIGO by the TMV system [2]. High turnover was considered when the bone formation rate (BFR/BS) was 1 standard deviation above the average of normal age-related controls. Low turnover was considered when the BFR/BS was less than 1 standard deviation from the average of normal controls according to age [23]. Abnormal mineralization was considered when osteoid thickness (O.Th) and mineralization lag time (Mlt) were 1 standard deviation above average normal controls according to age [22, 23]. For the analysis of bone volume, (BV/TV), a sample composed of 26 healthy, age-related, Brazilian children and adolescents was considered as a normal reference. Low bone volume was considered when the value was less than 1 deviation from the mean for age, and high bone volume when the value was 1 deviation above the average for the age group [22].

Statistical Analysis

Shapiro-Wilk test was used to determine normal data. Continuous variables were expressed as mean and standard deviation, or median and percentiles (25-75), as appropriate. We used Student's t-test or

Mann-Whitney to compare parametric and non-parametric data between groups, respectively. Categorical data were analyzed by the Chi-square test with significance analysis. Pearson's or Spearman's correlation coefficient was used to evaluate the correlation between continuous variables according to parametric and nonparametric distribution, respectively. The ROC curve was constructed to analyze the sensitivity and specificity of biochemical data in predicting the TMV parameters of histomorphometry. The best cut-off was chosen by Youden's index to maximize both, sensitivity and specificity. Statistical analysis was performed using the SPSS program (Statistical Package for the Social Sciences, version 25). A risk of $\alpha \leq 0.05$ for Type I error was considered for the entire study.

RESULTS

Patient Demographic, Biochemical and DXA characteristics

From the initial 59 bone fragments of children, we excluded 11 due to poor technical condition and 6 due to missing clinical and laboratory data. Final analyses included 42 samples and their medical records. The mean age was 11.3 ± 4.3 years (71.4% boys and 73.6% Caucasian). Primary cause of kidney disease was congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) in 52% (posterior urethral valve-10, vesicoureteral reflux-5, bladder extrophy-2, Prunne-Belly syndrome-2, renal agenesis-1, multicystic kidney-1, neurogenic bladder-1), glomerulopathies in 29% and other causes in the remaining 19% of cases (uremic hemolytic syndrome-2, nephronophthisis-2, polycystic disease renal-1, nephropathic cystinosis-1, acute interstitial nephritis-1, neonatal sepsis-1). Renal replacement

therapy was hemodialysis in 57% and peritoneal dialysis in 43%. Three patients had undergone kidney transplantation. Z-score ≤ -2 for weight/age and height/age was found in 57.8% and 60.5% of them, respectively. Calcium carbonate and calcitriol were prescribed to 97% and 90% of patients, respectively. The median PTH was 157 pg/ml (ranging from 49 to 379) and the median of alkaline phosphatase was 301 UI/L (ranging from 173 to 441). Although serum calcium (10.3 ± 1.4 mg/dl) and phosphate (5.1 ± 1.5 mg/dl) were within the reference range, hypercalcemia, hyperphosphatemia and hypophosphatemia were found in 36%, 19% and 7% of cases, respectively. Mean BMD Z-score was -0.33 ± 1.37, and BMD below the expected average was found in 9% of cases.

Bone Histomophometry and the TMV classification

Bone trabecular volume and thickness were within the normal range. However, we found an increased number of bone trabeculae and decreased trabecular separation, accompanied by increased osteoid, osteoblastic and osteoclastic surfaces (Table 1). Although mean bone formation rate was within the normal range, low bone turnover was seen in 25 patients (59.5%), and high bone turnover was seen in 7 patients (16.7%) (Figure 1). Twelve patients had a mineralization defect (29%) and 3 (9%) had low bone volume (Figure 1). Supplementary Table S1 shows individual histomorphometric data based on TMV classification.

Ability of PTH and AP to predict TMV status

Bone formation rate correlated with PTH and AP, as shown in Figure 2A and 2B, respectively. PTH discriminated high/normal from low turnover (AUC= 0.74, sensitivity= 0.60, specificity= 0.82 for the best cutoff 151 pg/mL, p=0.021). Serum calcium higher than 10.35 mg/dL, which was the best cut-off, (AUC= 0.70; sensitivity= 0.64, specificity= 0.76, p=0.028) and PTH lower than 300 pg/mL (AUC= 0.694; sensitivity= 0.80, specificity= 0.59, p=0.035) were also capable to predict high/normal from low turnover. The combined criteria of PTH < 300 pg/mL and calcium > 10.35 mg/dL improved the prediction of low turnover status (AUC= 0.74; sensitivity= 0.60, specificity 0.88, p=0.009). Figure 3A shows the ROC curves of predicted biomarkers of low turnover.

With respect to mineralization, PTH, AP (Figure 2C and 2D, respectively), and serum calcium (r= -0.51, p <0.001) correlated with OV/BV. The capability to predict mineralization defect by PTH and AP is shown in the ROC curve illustrated in Figure 2B. The AUC, sensitivity and specificity of PTH and AP to predict mineralization defect was 0.75, 0.67, and 0.90 vs. 0.72, 0.58, and 0.93, respectively. The combined criteria of PTH > 300pg/mL and an AP higher than the 479 UI/L, the best cut-off, did not improve the prediction ability (AUC 0.71, sensitivity 0.42 and specificity 1.00).

Relationship between clinical, demographic, DXA and Bone TMV data by etiology of renal disease, age, sex, and race

As shown in Table 2, children with low turnover had lower PTH and AP, and a trend towards higher serum calcium. Abnormal mineralization was more likely to occur in older children, accompanied by

lower height/age Z-score, lower BMD Z-score, as well as higher PTH and AP. We also noted a trend toward higher serum AP in those patients with high trabecular bone volume.

Children with CAKUT disease did not differ from those with a non-CAKUT disease in terms of clinical, laboratory and histomorphometric data (Table S2). We did not find either significant histomorphometric differences across different ages, gender or dialysis modality (Tables S3, S4, and S5 respectively). Conversely, Non-Caucasian children presented lower serum bicarbonate and a trend toward higher AP than Caucasian children (Table 3). We also noted higher osteoid thickness, accompanied by higher resorption parameters and bone formation rate in the first group.

In a multivariate logistic regression, PTH < 300pg/mL was independently associated with low bone turnover (RR: 5.34, 95% CI: 1.16-24.51; p=0.031) in a model adjusted for race, AP and calcium. PTH as a continuous value was at borderline significance (p=0.09). Factors significantly associated with abnormal mineralization were age (RR: 1.51, 95% CI: 1.06-2.16; p=0.024) and AP (RR: 1.01, 95% CI: 1.00-1.02; p=0.008), in a model adjusted for BMD scores. AP remained significantly associated with abnormal mineralization either as a continuous or categorized variable based on the best cutoff (479 UI/mL).

DISCUSSION

In this study, we demonstrated a high prevalence of low bone turnover, accompanied by a mineralization defect in one-third of the children with CKD. The loss of trabecular bone was seen in

few cases. In addition, besides PTH, other factors that were associated with parameters of TMV status were AP, calcium, race, age and bone mineral density. This finding confirmed our initial hypothesis that these and other variables might interfere in the relationship between BTM and bone turnover and mineralization.

The natural history of CKD-MBD in children is far from being completely understood, but usually, it is characterized by high turnover bone disease, as shown in most the pediatric bone biopsy studies [3, 9, 10, 19, 24, 25], even at early stages of CKD [3, 24]. However, similar to our results, Andrade et al [26] found 60% of low turnover disease in Brazilian children on hemodialysis and peritoneal dialysis. Our data are also similar to those of North American children, described by Mathias et al [6]. We postulate that high bone turnover in these children has been present since the onset of kidney disease, which is perpetuated in dialysis, and low bone turnover may be a result of active vitamin D and its analogs therapies. Unlike children, in adults in the early stages of CKD [27] there is inhibitory signaling in osteocytes [28, 29] and high turnover disease would occur only later when serum PTH promotes an increase of cellular activity of osteoblasts and osteoclasts, resulting in increased bone turnover [8, 11]. The use of active vitamin D analogs can be involved in the pathogenesis of the low turnover bone disease [8, 28]. In our series, at that time of the biopsies, almost all children were on calcium carbonate and calcitriol therapy, sevelamer hydrochloride was not available, and dialysis was performed with high concentrations of calcium in the dialysate (1.75 mmol/L), which might have influenced our results [30].

We also have found that non-caucasian children had a trend toward a higher bone formation rate, confirming the impact of race on bone histomorphometric parameters, which has already been documented in adults [31] and recently in children [14]. Little is known about the effect of primary renal disease on bone turnover and mineralization. Yalçinkaya et al. suggested that the risk of developing the high turnover disease is higher in older children with slower progression of CKD (CAKUT), in contrast to those with glomerular diseases who exhibit a faster course of CKD [10]. However, in agreement with a previous study [32] we found no differences between CAKUT and non-CAKUT disease on bone parameters.

Our children with mineralization defect were older, with lower stature, lower BMD, and had higher PTH and AP. The design of our study prevented us to conclude whether age directly affected the mineralization or if it was a consequence of greater time on dialysis of the older children. However, we could find a clear association between PTH and AP and mineralization in our population, suggesting that, in children, hyperparathyroidism and high bone turnover are frequently associated with a mineralization defect. Wesseling et al. have shown that calcitriol and doxercalciferol decreased bone turnover in children with hyperparathyroidism. However, mineralization remained altered in 80% of them [15]. In our series, short stature was present in 60.5% of children and was associated with abnormal mineralization, suggesting that changes in mineralization might have contributed to their short stature.

In the analysis of bone volume, our results are consistent with Waller [4], Bakkaloglu [5] and Andrade [26], confirming that the decrease in bone trabecular volume is an unusual finding in pediatric CKD. However, we must keep in mind that this histomorphometric analysis does not include the cortical bone and that children with CKD have an increased fracture risk [33].

To date, a marker that, individually or in combination, can diagnose changes in bone mineralization and/or turnover has not been identified yet. In our study, serum PTH and AP were associated with turnover and mineralization, confirmed by the ROC curves and logistic regression, as already shown by others [5, 9]. However, we recognize the limitation of their performance to clearly distinguish high from low turnover and normal from abnormal mineralization.

The limitations of our study are the retrospective design, the use of a bone biopsy repository of dialysis patients, who were under high doses of calcium and calcitriol salts prescription; we do not have data on calcitriol doses; some biopsies were performed with a Jamishid® needle with small histological sections impairing the cortical compartment evaluation, as well as bone protein expression, which would give information on the pathophysiology of pediatric renal osteodystrophy. The strengths of our study are the representative sample size, the use of histomorphometry in light of current recommendations with the TMV system, and the correlation of histomorphometric findings with clinical and demographic data such as height, CKD etiology, biochemical biomarkers and imaging exam (DXA).

Our results reinforce the need to expand knowledge about renal osteodystrophy in pediatric population through prospective bone biopsy studies to better understand the pathophysiology, diagnosis and treatment of this condition in children and adolescents with CKD. Although few centers around the world have expertise in bone histomorphometry, interest in bone biopsy, particularly in children, needs to be reinforced.

Acknowledgments:

RME, VJ and RM are supported by CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant numbers 305106/2018-0, 303684/2013-5 and, 304249/2013-0, respectively). This financial support had no role in the study design, collection, analysis and interpretation of the data, the writing of the report, and the decision to submit the report for publication.

References:

[1] Wesseling-Perry K. Defective skeletal mineralization in pediatric CKD. Curr Osteoporos Rep. 2015;13:98-105.

[2] Moe S, Drueke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Kidney Int. 2006;69:1945-53.

[3] Wesseling-Perry K, Pereira RC, Tseng CH, Elashoff R, Zaritsky JJ, Yadin O, et al. Early skeletal and biochemical alterations in pediatric chronic kidney disease. Clin J Am Soc Nephrol. 2012;7:146-52.

[4] Waller S, Shroff R, Freemont AJ, Rees L. Bone histomorphometry in children prior to commencing renal replacement therapy. Pediatr Nephrol. 2008;23:1523-9.

[5] Bakkaloglu SA, Wesseling-Perry K, Pereira RC, Gales B, Wang HJ, Elashoff RM, et al. Value of the new bone classification system in pediatric renal osteodystrophy. Clin J Am Soc Nephrol. 2010;5:1860-6.

[6] Mathias R, Salusky I, Harman W, Paredes A, Emans J, Segre G, et al. Renal bone disease in pediatric and young adult patients on hemodialysis in a children's hospital. J Am Soc Nephrol. 1993;3:1938-46.

[7] Salusky IB, Ramirez JA, Oppenheim W, Gales B, Segre GV, Goodman WG. Biochemical markers of renal osteodystrophy in pediatric patients undergoing CAPD/CCPD. Kidney Int. 1994;45:253-8.

[8] Goodman WG, Ramirez JA, Belin TR, Chon Y, Gales B, Segre GV, et al. Development of adynamic bone in patients with secondary hyperparathyroidism after intermittent calcitriol therapy. Kidney Int. 1994;46:1160-6.

[9] Ziolkowska H, Paniczyk-Tomaszewska M, Debinski A, Polowiec Z, Sawicki A, Sieniawska M. Bone biopsy results and serum bone turnover parameters in uremic children. Acta Paediatr. 2000;89:666-71.

[10] Yalcinkaya F, Ince E, Tumer N, Ensari A, Ozkaya N. Spectrum of renal osteodystrophy in children on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Pediatr Int. 2000;42:53-7.

[11] Graciolli FG, Neves KR, Barreto F, Barreto DV, Dos Reis LM, Canziani ME, et al. The complexity of chronic kidney disease-mineral and bone disorder across stages of chronic kidney disease. Kidney Int. 2017;91:1436-46.

[12] Sprague SM, Bellorin-Font E, Jorgetti V, Carvalho AB, Malluche HH, Ferreira A, et al. Diagnostic Accuracy of Bone Turnover Markers and Bone Histology in Patients With CKD Treated by Dialysis. Am J Kidney Dis. 2016;67:559-66.

[13] Barreto FC, Barreto DV, Moyses RM, Neves KR, Canziani ME, Draibe SA, et al. K/DOQI-recommended intact PTH levels do not prevent low-turnover bone disease in hemodialysis patients. Kidney Int. 2008;73:771-7.
[14] Laster M, Pereira RC, Salusky IB. Racial differences in bone histomorphometry in children and young adults treated with dialysis. Bone. 2019;127:114-9.
[15] Wesseling-Perry K, Pereira RC, Sahney S, Gales B, Wang HJ, Elashoff R, et al. Calcitriol and doxercalciferol are equivalent in controlling bone turnover, suppressing parathyroid hormone, and increasing fibroblast growth factor-23 in secondary hyperparathyroidism. Kidney Int. 2011;79:112-9.
[16] Langman CB S, IB. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Bone Metabolism and Disease in Children with Chronic Kidney Disease: Work Group Membership. Am J Kidney Dis. 2005;4.
[17] Drueke TB, Parfrey PS. Summary of the KDIGO guideline on anemia and comment: reading between the (guide)line(s). Kidney Int. 2012;82:952-60.
[18] Gordon CM, Leonard MB, Zemel BS, International Society for Clinical D. 2013 Pediatric Position Development Conference: executive summary and reflections. J Clin Densitom. 2014;17:219-24.
[19] Salusky IB, Coburn JW, Brill J, Foley J, Slatopolsky E, Fine RN, et al. Bone disease in pediatric patients undergoing dialysis with CAPD or CCPD. Kidney Int. 1988;33:975-82.
[20] Barreto DV, Barreto Fde C, de Carvalho AB, Cuppari L, Draibe SA, Dalboni MA, et al. Phosphate binder impact on bone remodeling and coronary calcification--results from the BRiC study. Nephron Clin Pract. 2008;110:c273-83.
[21] Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, 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.
[22] Dos Reis LM, Batalha JR, Munoz DR, Borelli A, Correa PH, Carvalho AB, et al. Brazilian normal static bone histomorphometry: effects of age, sex, and race. J Bone Miner Metab. 2007;25:400-6.
[23] Glorieux FH, Travers R, Taylor A, Bowen JR, Rauch F, Norman M, et al. Normative data for iliac bone histomorphometry in growing children. Bone. 2000;26:103-9.
[24] Norman ME, Mazur AT, Borden St, Gruskin A, Anast C, Baron R, et al. Early diagnosis of juvenile renal osteodystrophy. J Pediatr. 1980;97:226-32.
[25] Hodson EM, Evans RA, Dunstan CR, Hills EE, Shaw PF. Quantitative bone histology in children with chronic renal failure. Kidney Int. 1982;21:833-9.
[26] Andrade MC, Carvalhaes JT, Carvalho AB, Lazarretti-Castro M, Brandao C. Bone mineral density and bone histomorphometry in children on long-term dialysis. Pediatr Nephrol. 2007;22:1767-72.
[27] Lobao R, Carvalho AB, Cuppari L, Ventura R, Lazaretti-Castro M, Jorgetti V, et al. High prevalence of low bone mineral density in pre-dialysis chronic kidney disease patients: bone histomorphometric analysis. Clin Nephrol. 2004;62:432-9.
[28] Drueke TB, Massy ZA. Changing bone patterns with progression of chronic kidney disease. Kidney Int. 2016;89:289-302.

[29] de Oliveira RA, Barreto FC, Mendes M, dos Reis LM, Castro JH, Britto ZM, et al. Peritoneal dialysis per se is a risk factor for sclerostin-associated adynamic bone disease. Kidney Int. 2015;87:1039-45.
[30] Sanchez CP. Modulation of endochondral bone formation: roles of growth hormone, 1,25-dihydroxyvitamin D and hyperparathyroidism. Pediatr Nephrol. 2000;14:646-9.
[31] Jorgetti V, dos Reis LM, Ott SM. Ethnic differences in bone and mineral metabolism in healthy people and patients with CKD. Kidney Int. 2014;85:1283-9.
[32] Sirimongkolchaiyakul O e-PK, Gales B, Chow G, Pereira RC, Salusky IB. Effects of Primary Kidney Disease on Bone Histomorphometry in Pediatric Dialysis Patients. J Am Soc Nephrol. 2017;28:1.
[33] Denburg MR, Kumar J, Jemielita T, Brooks ER, Skversky A, Portale AA, et al. Fracture Burden and Risk Factors in Childhood CKD: Results from the CKiD Cohort Study. J Am Soc Nephrol. 2016;27:543-50.

- **FIGURE LEGENDS**

Figure 1. Proportion of Patients according to TMV classification
Low bone turnover was frequent in our population. We also observed approximately 1/3 of patients with abnormal mineralization and inadequate bone volume.

Figure 2. Relationship between the biomarkers PTH and AP and bone parameters of formation (bone formation rate) and mineralization (osteoid volume).
PTH = parathormone; AP = alkaline phosphatase; BFR/BS = bone formation rate; OV/BV = osteoid volume.

Figure 3. ROC curves for turnover (A) and mineralization (B)
Combined PTH and Calcium levels improved the prediction of low bone turnover (A), whereas combined PTH and AP did not improve the prediction of abnormal mineralization (B). PTH = parathormone; AP = alkaline phosphatase

Table 2-Clinical and laboratory parameters according to TMV system

	Turnover			Mineralization			Volume			
	Low (n=25)	**Normal/High (n=17)**	**p**	**Normal (n=30)**	**Abnormal (n = 12)**	**p**	**Low (n =3)**	**Normal (n = 31)**	**High (n = 8)**	**p**
Age (yrs)	11.0 ± 4.5	11.8 ± 4.2	0.55	10.5 ± 4.4	13.4 ± 3.5	**0.05**	11.2 ± 4.0	14.6 ± 2.3	10.2 ± 5.7	0.33
Dialysis										
HD	14	9		18	5		2	18	3	
PD	11	8	0.84	14	5	0.72	1	13	5	0.53
Race*			0.12							
Caucasian	19	9		21	7		1	24	3	
Non-caucasian	4	6		6	4	0.15	1	5	4	0.07
W/A Z-score*	-2.1 ± 1.0	-1.7 ± 1.0	0.21	-1.8 ± 0.98	-2.4 ± 1.15	0.15	-2.9 ± 0.59	-1.9 ± 1.0	-2.0 ± 1.1	0.47
H/A Z-score*	-2.5 ± 1.6	-2.7 ± 1.6	0.88	-2.2 ± 1.7	-3.4 ± 0	**0.04**	-2.5 ± 1.5	-4.2 ± 0.1	-2.1 ± 2.2	0.33
BMD Z-score*	-0.19 ± 1.4	-0.52 ± 1.2	0.49	0.001 ± 1.0	-1.1 ± 1.7	**0.026**	-0.23 ± 1.0	-2.3 ± 1.7	-0.08 ± 2.2	0.26
Ca (mg/dl)	10.5 ± 1.5	9.8 ± 1.0	**0.05**	10.5 ± 1.1	9.8 ± 1.9	0.14	10.4 ± 1.4	9.5 ± 0.8	10.1 ± 1.5	0.58
P (mg/dl)	5.1 ± 1.6	5.0 ± 1.4	0.85	5.1 ± 1.7	5.1 ± 0.9	0.94	5.1 ± 1.5	5.0 ± 1.1	4.8 ± 1.4	0.85
PTH (pg/ml)	113(31-265)	352(154-438)	**0.005**	144(47-292)	625(91-1013)	**0.01**	153(44-352)	489(371-489)	138 (19-547)	0.13
AP (UI/l)	242(149-349)	367(149-389)	**0.015**	282(15-385)	544(190-824)	**0.03**	284(155-389)	242(220-242)	555(273-931)	**0.05**
Bic (mEq/l)**	22.3 ± 5.3	19.8 ± 4.7	0.19	21.6 ± 5.1	20.1 ± 5.0	0.4	21.3 ± 5.2	20.7 ± 2.9	20.8 ± 5.4	0.96

HD = hemodialysis; PD = peritoneal dialysis; H/A = height/age; BMD= bone mineral densitometry; Ca = calcium; P = phosphate; PTH = parathormone; AP = alkaline phosphatase, Bic=bicarbonate. Data are expressed as (n), mean ± SD, or median (25-75%); *n = 38**;** ** n=33.

Table 3 - Comparison of clinical, laboratorial and histomorphometric data of Caucasian and Non-Caucasian children and adolescents

	Caucasian n= 28	**Non-Caucasian n= 10**	**p**
Age (years)	11.4 ± 4.2	11.7 ± 4.6	0.89
Gender (M/F)	18/10	9/1	0.12
Time in dialysis (months)	21(12.0-31.7)	14 (7.7-46.0)	0.56
Dialysis HD/DP	16/12	6/4	0.87
Total calcium (mg/dl)	10.2 ± 1.3	10.4 ± 1.6	0.72
Phosphorus (mg/dl)	5.3 ± 1.6	4.4 ± 1.4	0.12
PTH (pg/ml)	145 (46-356)	216 (45-832)	0.40
Alkaline Phosphatase (UI/L)	302 (155-393)	495 (234-725)	**0.06**
Bic (mEq/l)**	22.2 ± 5.1	18.3 ± 3.9	**0.03**
BV/TV (%)	28.9 ± 7.9	32.0 ± 11.5	0.36
Tb.Th (µm)	122.8 ± 20.1	135.7 ± 35.5	0.16
Tb.N (/mm)	2.2 (1.9-2.6)	2.3 (2.0-2.8)	0.63
Tb.Sp (µm)	327.0 ± 99.6	310.9 ± 122.7	0.68
O.Th (µm)	5.7 (4.7-8.7)	10.3 (6.8-14.9)	**0.02**
OS/BS (%)	24.7 ± 16.1	34.7 ± 23.9	0.14
OV/BV (%)	2.6 (0.5-3.8)	5.7 (1.1-12.2)	0.10
Ob.S/BS (%)	8.1 (2.5-13.8)	13.3 (4.0-22.6)	0.27
ES/BS (%)	6.2 (3.4-8.7)	12.6 (4.8-17.8)	**0.02**
OcS/BS (%)	0.7 (0.3-1.9)	1.9 (1.1-3.6)	**0.02**
Mlt (/days)	31.8 (15.0-122.0)	74 (10.5-121.7)	0.75
BFR/BS (m^3/m^2/years)	14.6 (0.4-39.2)	38.3 (0.4-113.2)	**0.056**

HD= hemodialysis; PD= peritoneal dialysis, M= male, F= female, PTH= parathormone . BV/TV= bone volume, Tb.Th= trabecular thickness, Tb.N= trabecular number, Tb.Sp= trabecular separation, O.Th= osteoid thickness, OS/BS= osteoid surface, OV/BV= osteoid volume, Ob.S/BS= osteoblastic surface, ES/BS= eroded surface, Oc.S/BS= osteoclastic surface, Mlt= mineralization lag time, BFR/BS= bone formation rate. Data are expressed as (n), mean ± SD or median (25-75%); *n = 38**;** ** n=33.

Figure 1. Proportion of Patients according to TMV classification

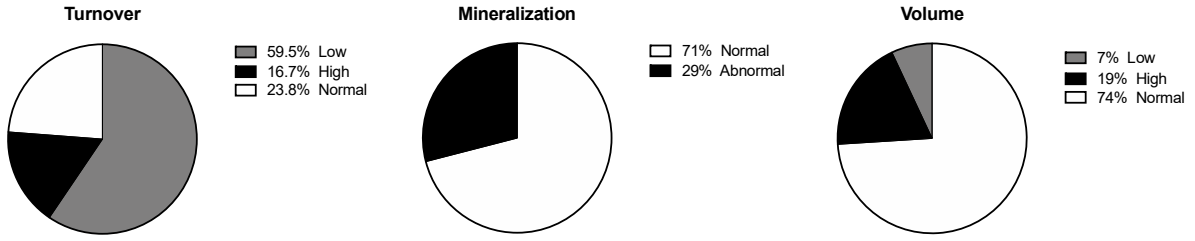


Figure 2. Scatter plot of PTH and AP with bone formation rate and Osteoid volume

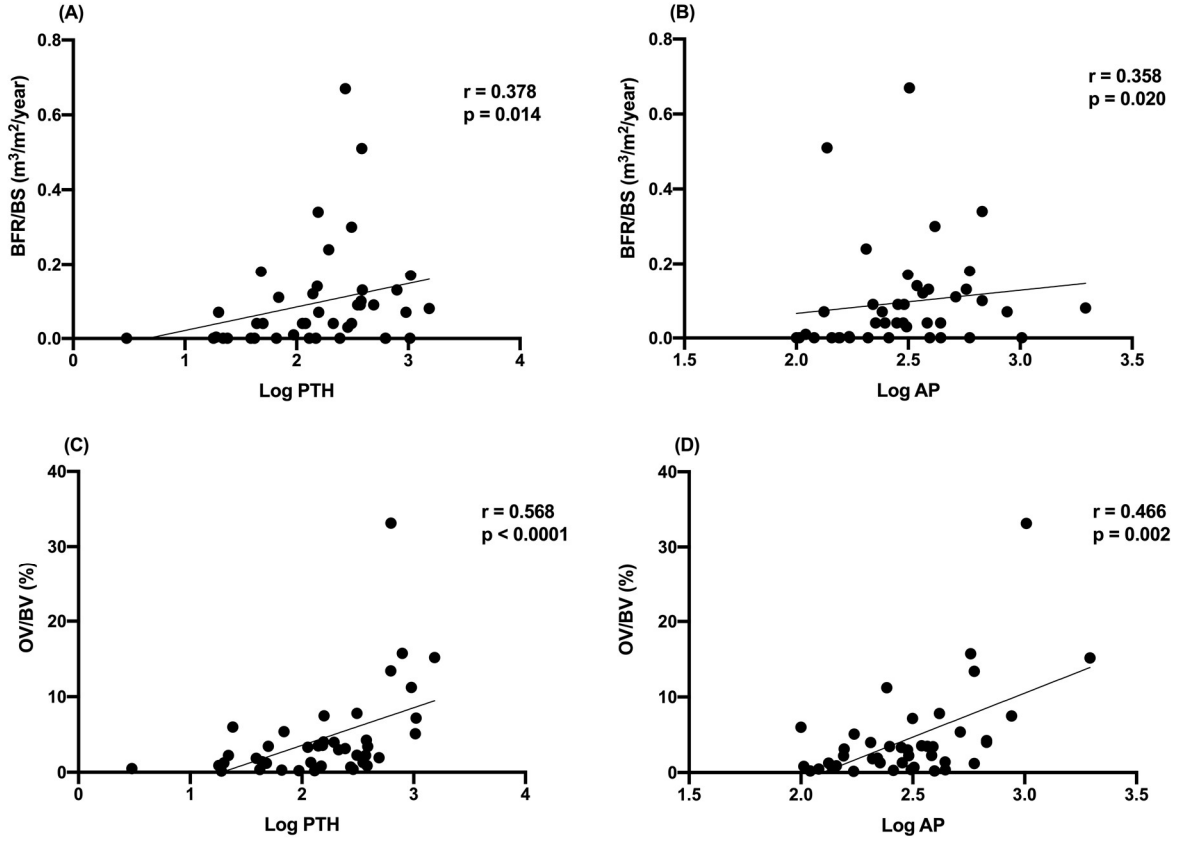
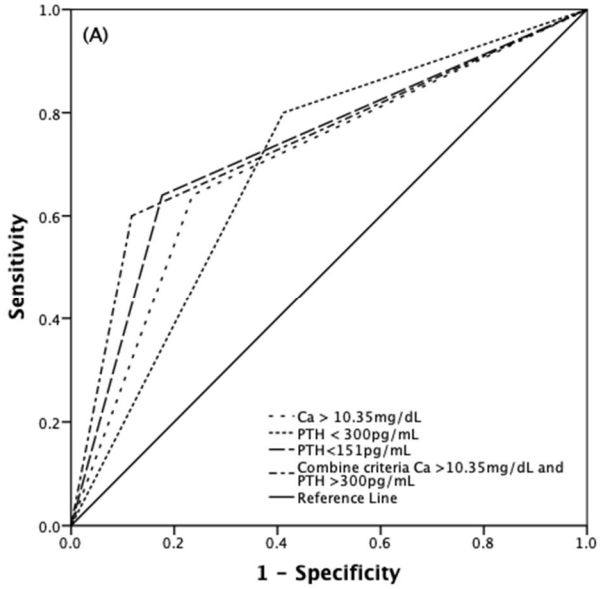


Figure 3. ROC curves for turnover (A) and mineralization (B)



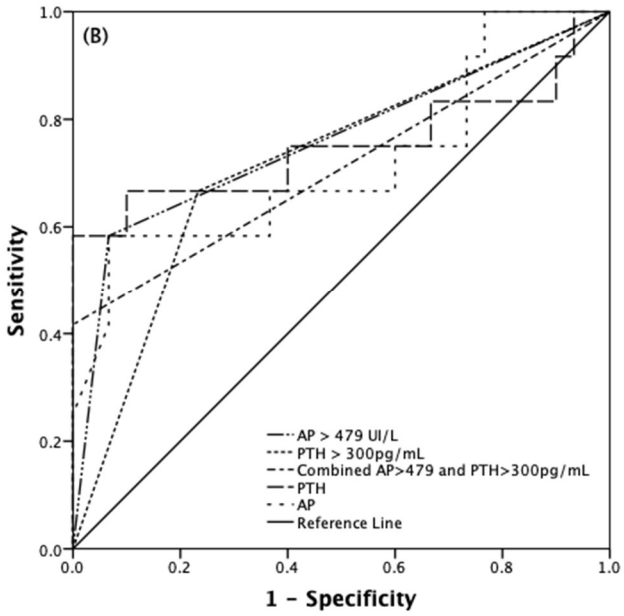


Table S1 - Patient histomorphometric data according to TMV classification

Patient	Age (yrs)	BFR/BS	T	Mlt	O.Th	M	BV/TV	V
1	8	Low	Low	Increased	High	Abnormal	Normal	Normal
2	6	High	High	Normal	High	Normal	High	High
3	9	Low	Low	Increased	Normal	Normal	Normal	Normal
4	10	Normal	Normal	Increased	High	Abnormal	High	High
5	11	Normal	Normal	Increased	High	Abnormal	Normal	Normal
6	10	Low	Low	Increased	Normal	Normal	Normal	Normal
7	12	Normal	Normal	Normal	Low	Normal	Low	Low
8	16	Low	Low	Increased	Normal	Abnormal	Low	Low
9	17	High	High	Increased	High	Abnormal	Normal	Normal
10	10	Low	Low	Increased	Normal	Normal	Normal	Normal
11	3	Low	Low	Normal	Low	Normal	High	High
12	10	Low	Low	Increased	Normal	Normal	Normal	Normal
13	16	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Low	Low
14	16	Low	Low	Normal	Low	Normal	Normal	Normal
15	12	High	High	Low	Normal	Normal	High	High
16	9	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
17	13	Normal	Normal	Low	Noraml	Normal	Normal	Normal
18	15	Low	Low	Normal	Low	Normal	Normal	Normal
19	11	Low	Low	Increased	High	Abnormal	High	High
20	6	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
21	14	Low	Low	Increased	Low	Normal	Normal	Normal
22	6	Low	Low	Increased	Normal	Normal	Normal	Normal
23	9	Low	Low	Increased	High	Abnormal	Normal	Normal
24	18	Low	Low	Increased	High	Abnormal	High	High
25	17	Low	Low	Increased	Normal	Normal	Normal	Normal
26	3	Low	Low	Increased	Normal	Normal	Normal	Normal
27	4	High	High	Normal	High	Normal	High	High
28	8	Low	Low	Increased	Low	Normal	Normal	Normal
29	17	Low	Low	Increased	Normal	Normal	Normal	Normal
30	18	Normal	Normal	Increased	High	Abnormal	High	High
31	11	Low	Low	Low	Low	Normal	Normal	Normal
32	11	Low	Low	Increased	Normal	Normal	Normal	Normal
33	3	Low	Low	Increased	Normal	Normal	Normal	Normal
34	13	Low	Low	Increased	Low	Normal	Normal	Normal
35	14	High	High	Low	Low	Normal	Normal	Normal
36	14	Low	Low	Increased	High	Abnormal	Normal	Normal
37	16	Low	Low	Increased	High	Abnormal	Normal	Normal
38	14	Normal	Normal	Normal	High	Normal	Normal	Normal
39	18	High	High	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
40	13	Normal	Normal	Increased	High	Abnormal	Normal	Normal
41	8	High	High	Normal	High	Normal	Normal	Normal
42	7	Low	Low	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal

BFR/BS= bone formation rate (m^3/m^2/year), T= turnover, Mlt= mineralization lag time (days), O.Th= osteoid thickness (µm), M= mineralization, BV/TV= bone volume (%), V= volume.

Table S2- Comparison of clinical, laboratorial and histomorphometric data of children and adolescents with CAKUT and Non-CAKUT disease

	Non-CAKUT n= 20	**CAKUT n= 22**	**p**
Age (years)	12.2 ± 3.9	10.5 ± 4.7	0.16
Time in dialysis (months)	21(11.2-47)	19 (8.5-28)	0.67
Race *			
Caucasian	16	12	
Non-caucasian	4	6	0.35
Gender (m/f)	13/7	17/5	0.37
Dialysis HD/DP	12/8	11/11	0.51
Total calcium (mg/dl)	10.3 ± 1.7	10.2 ± 1.0	0.75
Phosphorus (mg/dl)	5.2 ± 1.8	4.9 ± 1.1	0.49
PTH (pg/ml)	144.5(41.4-375.5)	203.5(96.6-385)	0.49
Alkaline Phosphatase (UI/l)	307 (159-490)	292 (197- 441)	0.87
Bic (mEq/l)**	20.2 ± 5.6	22.3 ± 4.4	0.21
BV/TV (%)	30.4 (24.2-38.0)	27.2(23.6-33.4)	0.49
Tb.Th (µm)	125.9(111.3-133.5)	118.6(108.5-145.4)	0.51
Tb.N (/mm)	2.4 ± 0.6	2.3 ± 0.5	0.67
Tb.Sp (µm)	318.1 ± 112.1	318.9 ± 99.9	0.97
O.Th (µm)	7.5 (4.6-11.3)	6.5 (4.8-9.0)	0.72
OS/BS (%)	24.2 ± 13.4	29.1 ± 20.5	0.16
OV/BV (%)	2.8 (0.6-6.7)	2.6 (1.1-4.2)	0.84
Ob.S/BS (%)	9.0 (2.5-19.3)	8.0 (4.7-14.5)	0.80
ES/BS (%)	7.8(4.1-16.3)	6.3(2.1-10.2)	0.19
OcS/BS (%)	1.2 (0.4-3.5)	0.7 (0.3-1.7)	0.13
Mlt (/days)	29.8 (13.9-122.0)	33.8 (11.8-122.0)	0.66
BFR/BS (m^3/m^2/years)	20.1 (0.3-42.8)	14.6 (0.3-52.0)	0.81

CAKUT= congenital anomalies of the kidney and urinary tract, HD= hemodialysis; PD= peritoneal dialysis, m= male, f= female, PTH= parathormone, Bic= bicarbonate, BV/TV= bone volume, Tb.Th= trabecular thickness, Tb.N= trabecular number, Tb.Sp= trabecular separation, O.Th= osteoid thickness, OS/BS= osteoid surface, OV/BV= osteoid volume, Ob.S/BS= osteoblastic surface, ES/BS= eroded surface, Oc.S/BS= osteoclastic surface, Mlt= mineralization lag time, BFR/BS= bone formation rate. Data are expressed as (n), mean ± SD or median (25-75%); * n= 38; ** n=33.

Table S3 - Comparison of clinical, laboratorial and histomorphometric data according to age: ≤ 12 years old or >12 years old.

	≤ 12 years old n= 22	**> 12 years old n= 20**	**p**
Age (years)	7.9±2.7	15.1±2.0	0.89
Gender (M/F)	17/5	13/7	0.38
Caucasian/Non-Caucasian*	15/5	13/5	0.85
CAKUT/Non-CAKUT	12/6	10/6	0.96
Time in dialysis (months)	14 (7-28)	14 (8-46)	**0.04**
Dialysis HD/DP	9/13	14/6	0.06
Z-scores Weight/age*	-1.8±0.94	-2.18±1.1	0.37
Z-scores Height/age*	-2.8(-4.2- -1.0)	-2.1(-4.1- -1.7)	0.56
Total calcium (mg/dl)	10.3±1.4	10.4±1.5	0.84
Phosphorus (mg/dl)	4.7±1.6	5.6±1.3	0.06
PTH (pg/ml)	125 (44-293)	312 (106-590)	0.07
Alkaline Phosphatase (UI/l)	329 (208-441)	292 (147-538)	0.50
Bic (mEq/l)**	21.9±5.8	20.3±4.1	0.35
BV/TV (%)	30.4±9.3	29.4±8.6	0.72
Tb.Th (µm)	125.8±28.8	125.3±19.6	0.16
Tb.N (/mm)	2.4 (2.0-2.7)	2.2 (1.9-2.8)	0.70
Tb.Sp (µm)	310.5±91.6	327.3±118.9	0.80
O.Th (µm)	6.2 (4.9-9.9)	7.3 (4.8-9.6)	0.71
OS/BS (%)	25.9±17.9	26.9±18.5	0.85
OV/BV (%)	3.4 (0.5-5.2)	2.2 (1.0-6.4)	0.92
Ob.S/BS (%)	9.9 (2.7-19.4)	8.1 (3.8-14.4)	0.52
ES/BS (%)	7.9 (2.0-13.7)	6.9 (3.9-10.5)	0.93
OcS/BS (%)	0.7 (0.3-3.7)	1.0 (0.4-1.6)	0.95
Mlt (/days)	37 (16-122)	24 (12-122)	0.43
BFR/BS (m^3/m^2/years)	14.6 (0.4-47.4)	27.4 (0.4-42.0)	0.56

CAKUT= congenital anomalies of the kidney and urinary tract; HD= hemodialysis; PD= peritoneal dialysis; M= male; F= female; PTH= parathormone; Bic= bicarbonate; BV/TV= bone volume; Tb.Th= trabecular thickness; Tb.N= trabecular number; Tb.Sp= trabecular separation; O.Th= osteoid thickness; OS/BS= osteoid surface; OV/BV= osteoid volume; Ob.S/BS= osteoblastic surface; ES/BS= eroded surface; Oc.S/BS= osteoclastic surface; Mlt= mineralization lag time; BFR/BS= bone formation rate. Data are expressed as (n), mean ± SD or median (25-75%); *n=38, **n=33.

Table S4. Comparison of clinical, laboratory and histomorphometric data according to gender

	Male n= 30	**Female n= 12**	**p**
Age (years)	10.8± 4.5	12.5± 4.3	0.24
Caucasian/Non-caucasian*	18/9	10/1	0.12
CAKUT/Non-CAKUT	17/13	5/7	0.29
Time in dialysis (months)	19(9.7-59.8)	24.5 (10.5-57)	0.34
Dialysis HD/PD	19/11	4/8	0.07
Z-score Weight/age*	-2.0±1.0	-2.1±1.2	0.79
Z-score Height/age*	-2.4±1.8	-2.7±1.4	0.71
Total calcium (mg/dl)	10.1±1.2	10.7±1.7	0.22
Phosphorus (mg/dl)	5.1±1.5	4.9±1.4	0.59
PTH (pg/ml)	203 (224-579)	99 (21-339)	0.13
Alkaline Phosphatase (UI/l)	317 (159-490)	172 (147- 351)	**0.04**
Bic (mEq/l)**	20.2±5.4	23.5±3.4	0.07
BV/TV (%)	26 (23-32)	34(28-38)	0.10
Tb.Th (µm)	121(110-132)	131(106-137)	0.77
Tb.N (/mm)	2.2(1.9-2.6)	2.5(2.0-3.0)	0.19
Tb.Sp (µm)	330(259-385)	246(212- 351)	0.13
O.Th (µm)	6.0 (4.8-10.3)	7.7 (4.1-9.5)	0.81
OS/BS (%)	29.0±18.8	20.0±14.3	0.14
OV/BV (%)	3.3 (1.3-7.1)	1.7 (0.6-3.3)	0.08
Ob.S/BS (%)	8.9 (4.7-15.4)	8.2 (2.0-15.3)	0.73
ES/BS (%)	8.2(3.2-13.0)	5.5(3.5-8.1)	0.50
OcS/BS (%)	2.1 (0.5-2.3)	0.4 (0.2-1.9)	0.13
Mlt (/days)	26.1 (12-122)	83.6 (15-122)	0.17
BFR/BS (m^3/m^2/years)	20.0 (2.8-48.3)	0.86 (0.4-38.3)	0.20

CAKUT= congenital anomalies of the kidney and urinary tract; HD= hemodialysis; PD= peritoneal dialysis; PTH= parathormone; Bic= bicarbonate; BV/TV= bone volume; Tb.Th= trabecular thickness; Tb.N= trabecular number; Tb.Sp= trabecular separation; O.Th= osteoid thickness; OS/BS= osteoid surface; OV/BV= osteoid volume; Ob.S/BS= osteoblastic surface; ES/BS= eroded surface; Oc.S/BS= osteoclastic surface; Mlt= mineralization lag time; BFR/BS= bone formation rate. Data are expressed as (n), mean ± SD or median (25-75%); *n=38; **n=33.

Table S5- Comparison of clinical, laboratorial and histomorphometric data of children and adolescents according to dialysis modality

	HD n=23	DP n=19	p
Age (years)	12.7±3.9	9.6±4.2	0.25
Caucasian/Non-caucasian*	16/6	12/4	0.87
Gender M/F	19/4	11/8	0.07
CAKUT/Non-CAKUT	11/12	11/8	0.50
Time in dialysis (months)	18(9.7- 46.0)	24 (12.0-31.7)	0.76
Z-score Weight/age*	-1.9±1.0	-2.1±1.0	0.79
Z-score Height/age*	-2.3±1.6	-2.8±1.8	0.71
Total calcium (mg/dl)	10.5±1.4	10.0±1.3	0.29
Phosphorus (mg/dl)	5(4.5-6.0)	4.7(3.8- 5.8)	0.28
PTH (pg/ml)	144.5 (41-445)	157 (67-356)	0.73
Alkaline Phosphatase (UI/l)	290 (136-441)	386 (251- 575)	0.18
Bic (mEq/l)**	18.9±5.2	24.3±2.9	0.07
BV/TV (%)	29.2± 8.2	30.8±9.6	0.24
Tb.Th (µm)	126.5±21.8	124.5±28.0	0.99
Tb.N (/mm)	2.2(1.9-2.6)	2.4(1.9-2.8)	0.39
Tb.Sp (µm)	327.4±101.1	310.7±110.3	0.36
O.Th (µm)	6.3 (4.8-9.0)	7.1 (4.8-10.5)	0.83
OS/BS (%)	18.7(10.2- 38.8)	28.8(15.5- 45.3)	0.42
OV/BV (%)	1.9 (0.83-5.9)	3.4 (1.3-5.1)	0.60
Ob.S/BS (%)	6.8 (2.8-12.7)	10.6 (6.3-20.2)	0.06
ES/BS (%)	7.3(3.4-11.7)	8.1(0.2-3.5)	0.77
OcS/BS (%)	0.93 (0.4-1.6)	0.83 (0.2-1.9)	0.95
Mlt (/days)	31.2 (11.4-122)	32.5 (12.9-122)	0.67
BFR/BS (m^3/m^2/years)	14.6 (0.4-47.5)	14.6 (0.4-40.1)	0.88

CAKUT= congenital anomalies of the kidney and urinary tract; HD= hemodialysis; PD= peritoneal dialysis; M= male; F= female; PTH= parathormone; Bic= bicarbonate; BV/TV= bone volume; Tb.Th= trabecular thickness; Tb.N= trabecular number; Tb.Sp= trabecular separation; O.Th= osteoid thickness; OS/BS= osteoid surface; OV/BV= osteoid volume; Ob.S/BS= osteoblastic surface; ES/BS= eroded surface; Oc.S/BS= osteoclastic surface; Mlt= mineralization lag time; BFR/BS= bone formation rate. Data are expressed as (n), mean ± SD and median (25-75%). *n=38; **n=33.