ROXANA DE FÁTIMA CAMELO DE ALBUQUERQUE

**Tratamento cirúrgico do hiperparatireoidismo secundário:
fatores que influenciam o funcionamento do autoimplante**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bueno de Oliveira

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Albuquerque, Roxana de Fátima Camelo de
Tratamento cirúrgico do hiperparatireoidismo secundário : fatores que influenciam o funcionamento do autoimplante / Roxana de Fátima Camelo de Albuquerque. -- São Paulo, 2014.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.

Orientador: Rodrigo Bueno de Oliveira.

Descritores: 1.Calcificação vascular 2.Insuficiência renal crônica
3.Proteína Klotho 4.Hiperparatireoidismo secundário 5.Paratireoidectomia
6.Hormônio paratiróideo 7.Vitamina D

USP/FM/DBD-461/14

ROXANA DE FÁTIMA CAMELO DE ALBUQUERQUE

Tratamento cirúrgico do hiperparatireoidismo secundário: fatores que influenciam o funcionamento do autoimplante

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof. (a) Dr. (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. (a) Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. (a) Dr (a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Ailton e Maria de Fátima, que me ensinaram que através do estudo e do trabalho, somos capazes, sim, de realizar nossos sonhos, respeitando sempre o próximo e valorizando a família.

À minha irmã, Michelle, minha companheira, que tanto me ajudou e que me inspira pelo cuidado com seus pacientes, por sua bondade e integridade.

Aos meus pacientes, que me ensinam todos os dias; por eles continuo tentando ser uma médica e um ser humano melhor a cada dia.

À Deus, em agradecimento à missão a mim concedida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rodrigo Bueno de Oliveira, meu orientador, pelo empenho dedicado à elaboração deste trabalho, pelo suporte, pelas suas correções e incentivos.

À Dra. Vanda Jorgetti, minha primeira orientadora, muito obrigada pelo apoio, e por acreditar em mim, principalmente nessa reta final. Agradeço não só todos os conhecimentos científicos adquiridos com o convívio durante esses anos, mas também, levarei comigo seu exemplo de dedicação profissional e à pesquisa, assim como, de ser humano simples que respeita e se preocupa com o paciente e com os colegas de trabalho, estando sempre disposta a ajudar.

Às doutoras Melani Ribeiro Custódio e Rosa Maria Affonso Moysés que tanto me ajudaram no laboratório de Fisiologia Renal e no Ambulatório de Osteodistrofia Renal com conhecimentos que tentarei disseminar. Muito obrigada a Dra. Denise Malheiros pelo suporte junto ao Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas.

Agradeço a Luciene Machado dos Reis, pelo apoio na imunohistoquímica, mas, principalmente, pelo carinho, pela companhia, pelas palavras de força e otimismo. Wagner Vasques Dominguez, muito obrigada pela ajuda, principalmente na minha qualificação, pela companhia, pela sua sinceridade e paciência. Fabiana Graciolli, obrigada pela força, ajuda na imunohistoquímica, pela companhia, pelos papos. O convívio com vocês três foi fortalecedor para mim.

Agradeço aos meus colegas pós-graduandos pelo incentivo e pela ajuda no atendimento aos pacientes no ambulatório: Luciene Magalhães, Patrícia Goldenstein, Juliana Ferreira, Guaraciaba Ferrari, Rodrigo Azevedo, Melissa Pinheiro, Geovanna Pires e Maria Júlia Araújo. Apreendi muito com todos vocês.

Muito obrigada à Rita de Cassia T. Martin e Ivone B. Oliveira pelo enorme apoio na realização das imunohistoquímicas, parte tão importante desta pesquisa. Serei eternamente grata.

Obrigada às funcionárias do ambulatório de Nefrologia do Hospital das Clínicas: Ivna, Mônica, Flávia e Débora, pela atenção e por serem sempre tão colaborativas e amáveis.

Obrigada às queridas: Verônica Gouveia, Priscila Seravalli, Tatiana Aniteli, Rackel Mota, Flávia Machado, Camilla Fanelli, Flávia Siqueira, Simone Alarcon, Raquel Cavallari, foi muito bom compartilhar com vocês as dores e as delícias do universo acadêmico. Permanecemos firmes e fortes no propósito.

A toda a equipe do LIM 16, que com certeza, contribuiu, de alguma forma, para eu chegar até aqui.

Agradeço à *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP) pelo suporte financeiro à realização dessa pesquisa.

Aos amigos: Vanessa Nascimento, Luiza Araújo, Patrícia Montenegro, Luciene Magalhães e Gilberto Carvalho. Vocês me deram força para prosseguir apesar de todos os obstáculos que surgiram ao longo dessa caminhada. Muito obrigada, vocês foram únicos.

E, finalmente, à minha família, agradeço por sempre acreditarem em mim, pelo amor, paciência e conforto oferecidos nesse momento tão importante de minha vida.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.

Chico Xavier

RESUMO

Albuquerque RFC. Tratamento cirúrgico do hiperparatireoidismo secundário: fatores que influenciam o funcionamento do autoimplante [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2014. 79 f.

O hiperparatireoidismo secundário à doença renal crônica (HPS) acomete inúmeros pacientes. Não existe consenso sobre qual tipo de paratireoidectomia (PTx) se associa com melhores resultados. Na PTx total com autoimplante (PTx-AI) especula-se se o número de fragmentos implantados melhora desfechos clínicos. Trinta e seis (36) pacientes com HPS foram randomizados para PTx-AI com 45 ou 90 fragmentos de paratireoide. Prospectivamente, avaliamos os fatores clínicos, bioquímicos e anatomopatológicos que influenciaram a função do AI. No início do estudo (t0), o Grupo-45 (N = 28) e Grupo-90 (N = 8) eram semelhantes, com exceção dos níveis séricos de fosfato. Após 12 meses (t12), os níveis séricos de PTH do enxerto e sistêmico correlacionaram-se com o cálcio iônico (Cai)-t0 ($r^2 = 0,442$, $p = 0,016$; $r^2 = 0,450$, $p = 0,008$, respectivamente). A duração da fome óssea correlacionou-se com fosfatase alcalina (FA)-t0 ($r^2 = 0,593$, $p = 0,001$). Nas células paratireoideanas, a expressão de PCNA correlacionou-se com o tempo em hemodiálise ($r^2 = 0,437$, $p = 0,016$); a expressão do receptor-1 do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR1) com FA-t0 ($r^2 = -0,758$; $p = 0,0001$); o receptor de vitamina-D (VDR) com Cai-t0 ($r^2 = -0,464$, $p = 0,007$) e carga cumulativa de Ca elemento ($r^2 = -0,359$, $p = 0,04$); o receptor sensível ao Ca (CaSR) com menor uso de calcitriol ($r^2 = -0,445$, $p = 0,049$); e o Klotho com a dose de vitamina D pré-PTx ($r^2 = 0,811$, $p = 0,027$) e com fosfato-t0 ($r^2 = -0,528$, $p = 0,017$). Houve progressão do escore de calcificação vascular [0,53 (0 - 4) vs. 1,1 (0 - 8); $p = 0,04$], que se correlacionou com a carga cumulativa de Ca elemento ($r^2 = 0,605$, $p = 0,006$) e com o fosfato-t0 ($r^2 = 0,503$; $p = 0,028$). Em conclusão, a PTx independentemente do número de AI controlou o HPS; porém parece piorar a calcificação vascular. Os níveis séricos de PTH pós-PTx ou

evolução para hipo- ou normoparatiroidismo não foram influenciados pelo número de AI, nem por outros parâmetros bioquímicos e tão pouco pela densidade de expressão de PCNA, CaSR, VDR, FGFR1 ou Klotho nas células paratireoideanas.

Descritores: calcificação vascular; hiperparatiroidismo secundário; hormônio paratireóideo; insuficiência renal crônica; paratireoidectomia; proteína Klotho; vitamina D.

ABSTRACT

Albuquerque RFC. Surgical treatment of secondary hyperparathyroidism: factors influencing the functioning of auto transplant [Dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2014. 79 s.

Hyperparathyroidism secondary to chronic kidney disease (SHP) affects many patients. There is no consensus about what kind of parathyroidectomy (PTx) is associated with better results. In total PTx with auto transplant (PTx-AT) it is speculated that the number of implanted fragments improves clinical outcomes. Third six (36) patients with refractory SHP were randomized to PTx-AT with 45 or 90 parathyroid fragments. We prospectively evaluated the clinical, biochemical and pathological factors influencing AT function. At baseline (t0) Group-45 (N = 28) and Group-90 (N = 8) were similar, except for serum phosphate levels. After 12 months (t12), PTH levels of graft and systemic correlated with ionic calcium (Cai) t0 ($r^2 = 0.442$, $p = 0.016$; $r^2 = 0.450$, $p = 0.008$, respectively). The duration of hungry bone syndrome correlated with alkaline phosphatase (AP) -t0 ($r^2 = 0.593$, $p = 0.001$). In parathyroid cells, PCNA expression correlated with time on hemodialysis ($r^2 = 0.437$, $p = 0.016$), expression of receptor-1 of fibroblast growth factor (FGFR1) with AP-t0 ($r^2 = -0.758$; $p = 0.0001$), vitamin D receptor (VDR) with Cai t0 ($r^2 = -0.464$, $p = 0.007$) and cumulative elemental Ca load ($r^2 = -0.359$, $p = 0.04$), Ca sensing receptor (CaSR) with less use of calcitriol ($r^2 = -0.445$, $p = 0.049$), and Klotho with the dose of vitamin D pre-PTx ($r^2 = 0.811$, $p = 0.027$) and phosphate-t0 ($r^2 = -0.528$, $p = 0.017$). There was progression of vascular calcification score [0.53 (0 to 4) vs. 1.1 (0 to 8); $p = 0.04$] which correlated with cumulative elemental Ca load ($r^2 = 0.605$, $p = 0.006$) and with phosphate-t0 ($r^2 = 0.503$; $p = 0.028$). In conclusion, PTx controlled refractory SHP regardless of the number of AT; however, it seems to worsening vascular calcification. Serum levels of PTH or post-PTx evolution of hypo- or normoparathyroidism were not influenced by the number of AT or other

biochemical parameters, nor by the density of PCNA expression, CaSR, VDR, FGFR1 or Klotho in parathyroid cells.

Descriptors: hyperparathyroidism, secondary; Klotho protein; parathyroid hormone; parathyroidectomy; renal insufficiency chronic; vascular calcification; vitamin D.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Curva cálcio-paratormônio.....	4
Figura 2 -	Adaptações do tecido paratireóideo frente aos distúrbios mineral e ósseo na doença renal crônica.....	7
Figura 3 -	Padrão de expressão de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) avaliado pela técnica de imunohistoquímica. A (aumento de 100x), B (400x, detalhe: 1000x), hiperplasia difusa; C (100x) e D (400x, detalhe: 1000x), hiperplasia nodular.....	33
Figura 4 -	Padrão de expressão de receptor sensível ao cálcio (CaSR) avaliado pela técnica de imunohistoquímica. E (aumento de 100x), F (400x, detalhe: 1000x), hiperplasia difusa; G (100x) e H (400x, detalhe: 1000x), hiperplasia nodular.....	34
Figura 5 -	Padrão de expressão de receptor da vitamina D (VDR) avaliado pela técnica de imunohistoquímica. I (aumento de 100x), J (400x, detalhe: 1000x), hiperplasia difusa; K (100x) e L (400x, detalhe: 1000x), hiperplasia nodular.....	35
Figura 6 -	Padrão de expressão de receptor-1 do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR1) avaliado pela técnica de imunohistoquímica. M (aumento de 100x), N (400x, detalhe: 1000x), hiperplasia difusa; O (100x) e P (400x, detalhe: 1000x), hiperplasia nodular.....	36
Figura 7 -	Padrão de expressão de Klotho avaliado pela técnica de imunohistoquímica. Q (aumento de 100x), R (400x, detalhe: 1000x), hiperplasia difusa; S (100x) e T (400x, detalhe: 1000x), hiperplasia nodular.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características clínicas e demográficas no início do estudo de todos os pacientes e separados por grupo, de acordo com o número de fragmentos do auto-implante	29
Tabela 2 -	Características bioquímicas no início do estudo de todos os pacientes e separados por grupo, de acordo com o número de fragmentos do auto-implante	30
Tabela 3 -	Perfil de expressão de diferentes marcadores avaliados pela técnica de imunohistoquímica em tecido paratireoideano no início do estudo, de todos os pacientes e separados por grupo, de acordo com o número de fragmentos do auto-implante...	32
Tabela 4 -	Características demográficas e clínicas 12 meses pós-PTx de todos os pacientes e separados por grupo, de acordo com o número de fragmentos do auto-implante	41
Tabela 5 -	Características clínicas e bioquímicas 12 meses pós-PTx de todos os pacientes e separados por grupo, de acordo com o número de fragmentos do auto-implante	42
Tabela 6 -	Frequência de pacientes com exames bioquímicos considerados em relação a sua meta terapêutica, no início e 12 meses pós-PTx de todos os pacientes e separados por grupo, de acordo com o número de fragmentos do auto-implante.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25-OHVitD, calcitriol
25-OHVitD, calcidiol
AI, autoimplante
Ca, cálcio
CaSR, receptor sensível ao cálcio
CCP, cirurgia de cabeça e pescoço
Da, Dalton
DMO, distúrbio mineral e ósseo
DRC, doença renal crônica
FGF23, fator de crescimento de fibroblastos-23
FGFR1, receptor-1 de fator de crescimento de fibroblastos
FA, fosfatase alcalina
FAV, fístula arteriovenosa
HC, Hospital das Clínicas
HD, hemodiálise
Hdif, hiperplasia difusa
Hnod, hiperplasia nodular
HPS, hiperparatireoidismo secundário
IMC, índice de massa corporal
KDIGO, *Kidney Disease Improving Global Outcomes*
KDOQI, *Clinical Practice Guidelines for Bone Metabolism and Disease in Chronic Kidney Disease*
Na, sódio
PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular
Pit-1 ou Pit-2, co-transportador de Na/P
P, fosfato
PTH, paratormônio
USP, Universidade de São Paulo
VDR, receptor da vitamina D

SUMÁRIO

Lista de Figuras	I
Lista de Tabelas	II
Lista de abreviaturas e siglas	III
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Anatomia e fisiologia das glândulas paratireoides	3
1.2. Adaptação do tecido paratireóideo frente aos DMO-DRC.... ..	6
1.3. Tratamento do HPS	9
1.3.1. Tratamento clínico do HPS.....	9
1.3.2. Tratamento cirúrgico do HPS	10
1.4. Avaliação do funcionamento do AI de tecido paratireóideo com base nos níveis séricos do PTH do enxerto e PTH sistêmico	12
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	15
3.1. Características do estudo	15
3.2. Critérios de inclusão e exclusão	15
3.3. Seleção dos pacientes	16
3.4. Análise de características clínicas, demográficas, laboratoriais e de exames de imagem	17
3.5. Análise histológica e imunohistoquímica do tecido paratireóideo...	20
3.6. Análise estatística	26

4. RESULTADOS	27
4.1. Pacientes e evolução	27
4.2. Características demográficas, clínicas , laboratoriais e de exames de imagem no início do estudo.....	28
4.3. Análise histológica e imunohistoquímica	31
4.4. Características demográficas, clínicas, laboratoriais e de exames de imagem no final do seguimento (12 meses pós-PTx)	38
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXOS	62
Anexo A. Artigo completo submetido para publicação	62

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é caracterizada pela perda progressiva e irreversível das funções renais. Frequentemente é acompanhada de complicações como os distúrbios do metabolismo mineral e ósseo (DMO), que englobam calcificação vascular, alterações bioquímicas e hormonais, e a osteodistrofia renal.^{1,2}

Dentre as alterações bioquímicas e hormonais clássicas que envolvem os DMO-DRC, destacam-se o comprometimento da síntese de calcitriol, com consequente diminuição da absorção intestinal de cálcio (Ca) e tendência à hipocalcemia, e a redução da excreção renal de fosfato (P). Essas alterações levariam ao aumento da síntese e secreção do paratormônio (PTH), por meio da hiperplasia das células das glândulas paratireoides. Ao conjunto dessas alterações denomina-se hiperparatireoidismo secundário (HPS).^{3,4}

Nas últimas décadas a compreensão sobre a fisiopatologia do HPS aumentou significativamente. Compreende-se melhor o papel do Ca, P, vitamina D nativa, vitamina D ativada (calcitriol), do fator de crescimento de fibroblastos-23 (FGF23) e seu receptor (FGFR) e da proteína Klotho.⁵⁻⁹

Da mesma forma, hoje existem mais opções terapêuticas para o controle do HPS. Nos últimos 20 anos, análogos dos receptores da

vitamina D ativada, novos quelantes de P e calcimiméticos passaram a compor as diferentes opções de tratamento clínico para o HPS.¹⁰

No entanto, parcela significativa desses pacientes evolui para uma forma grave de HPS não responsiva ao tratamento clínico, sendo indicada então a paratireoidectomia cirúrgica (PTx).¹¹

Apesar da existência de diferentes tipos de técnicas e táticas cirúrgicas de PTx, ainda restam inúmeras dúvidas sobre qual a melhor estratégia a ser adotada visando o controle do HPS e suas complicações. Por exemplo, desconhece-se qual deve ser a massa de tecido paratireóideo a ser utilizada no autoimplante (AI) em um paciente submetido a PTx total, que resultaria em um nível adequado de secreção de PTH, controle dos níveis séricos de Ca e P, bem como na manutenção de uma remodelação óssea próxima a de um indivíduo normal. Da mesma forma, não se sabe quais são os fatores determinantes do funcionamento do AI de tecido paratireoideano nesses pacientes.

Nas próximas sessões descreveremos aspectos que envolvem a fisiopatologia, manifestações clínicas e o tratamento clínico e cirúrgico do HPS, bem como as razões que motivaram o desenvolvimento e execução desse presente estudo clínico prospectivo.

1.1. Anatomia e fisiologia das glândulas paratireoides

As glândulas paratireoides localizam-se na região cervical anterior, na face posterior e nos pólos superiores e inferiores da glândula tireoide. Em geral, são em numero de quatro, medindo cada uma cerca de 3 x 6 mm, com peso de 0,4 gramas cada. Dois tipos de células são reconhecidos: as células principais e as oxifílicas. As células principais predominam. São menores, tem forma poligonal com núcleo vesiculoso e citoplasma fracamente acidófilo. Estas células são secretoras de PTH. As células oxifílicas são maiores do que as principais, com citoplasma contendo grânulos acidófilos em grande quantidade. Suas funções não estão completamente esclarecidas.¹²

Os níveis séricos de Ca regulam diretamente a síntese de PTH pelas células das paratireoides, através de sua ligação com o receptor sensível ao Ca (CaSR), presente nas células das paratireoides. A hipocalcemia estimula a síntese e secreção do PTH, além de promover a proliferação destas células.¹³⁻¹⁶

A relação entre os níveis séricos de Ca e PTH é representada por uma curva sigmoidal inversa, que reflete a enorme variação do PTH frente a pequenas variações do Ca. As células paratireoideanas são capazes de aumentar a secreção de PTH em segundos, o que ajuda a

manter os níveis de Ca dentro de uma estreita faixa de normalidade. Especula-se, que a produção de PTH seja influenciada por uma mudança na polaridade elétrica da membrana dessas células frente à queda dos níveis séricos de Ca (Figura 1).¹⁷

Figura 1. Curva cálcio-paratormônio.*

PTH, paratormônio; [Ca], concentração sérica de cálcio.* Adaptado da referência 17.

O P é outro regulador positivo da produção do PTH, por meio de mecanismos não completamente compreendidos. Há 16 anos foi descrita uma família de proteínas transportadoras (SLC20) envolvidas no co-transporte de sódio (Na) e P. Os co-transportadores Pit-1 e Pit-2 (anteriormente, Na/P tipo III), apresentam alta afinidade pelo P. Sua expressão foi demonstrada nas células de diversos tecidos, entre eles, o paratireoideano.¹⁸ Assim, é possível que esses co-transportadores participem da fisiopatologia do HPS.

Recentemente, demonstrou-se que a proteína Klotho e o FGFR tipo 1 (FGFR1) são expressos nas células das paratireoides.^{19,20} Klotho atua na bomba Na/K/ATPase expressa nestas células. Quanto ao FGF23 sabe-se que esse hormônio atua na síntese do PTH, diretamente via complexo Klotho-FGFR e ativação da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), e indiretamente, por inibição da síntese de calcitriol.^{20,21} Um estudo em pacientes urêmicos submetidos a PTx sugere que a redução da expressão do complexo Klotho-FGFR1 em tecido de paratireoide com hiperplasia poderia explicar a resistência à ação local de FGF23, bem como os níveis elevados deste hormônio observada nestes pacientes.²²

1.2. Adaptações do tecido paratireóideo frente aos DMO-DRC

As células das glândulas paratireóides sofrem um processo adaptativo de hiperplasia, consequente aos DMO-DRC. Essa adaptação corresponde a dois tipos de hiperplasia tecidual: difusa e/ou nodular. Na hiperplasia difusa (Hdif) a proliferação celular é generalizada e uniforme, enquanto que na nodular (Hnod), a proliferação ganha a consistência de nódulos envolvidos por uma cápsula fibrosa. A Hnod é considerada a forma mais avançada da hiperplasia, sendo observada nas glândulas com maior peso.²³⁻²⁵

A proliferação das células das glândulas paratireóides é um processo dinâmico, sendo que em uma mesma glândula podemos observar os dois tipos de hiperplasia. A Hnod é funcionalmente autônoma devido à mudança no tipo de crescimento celular, passando de policlonal para monoclonal (Figura 2).

Figura 2. Adaptações do tecido paratireóideo frente aos distúrbios mineral e ósseo na doença renal crônica.*

* Adaptado da referência 25.

Tominaga e colaboradores observaram que nas regiões com Hdif o crescimento é do tipo policlonal, enquanto, na Hnod, monoclonal. Os fatores envolvidos na transformação de policlonal para monoclonal são pouco conhecidos, mas, provavelmente, influenciados por diversos fatores presentes na uremia, dentre eles: alterações na reparação do DNA celular e a ativação de genes aceleradores e/ou inibidores do crescimento tumoral.^{26,27}

Estas alterações adaptativas, principalmente as formações nodulares, cursam com a redução da expressão de receptores de vitamina D (VDR) e receptores sensíveis ao Ca (CaSR), o que explicaria pelo menos parcialmente, a resistência ao tratamento do HPS com o uso de calcitriol.^{25,28}

Métodos de imunohistoquímica podem auxiliar na compreensão da diferenciação entre os tipos de hiperplasia, qualidade do tecido, e da expressão de receptores como o VDR e CaSR, ou de proteínas como Klotho e FGFR1. O antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA) pode ser útil na distinção entre Hdif e Hnod. Trata-se de uma proteína com peso molecular de 36 kDa, cuja função é auxiliar a DNA polimerase na replicação e reparação do DNA. É sintetizada durante o final das fases G1 e S do ciclo celular e sua expressão pode estar aumentada na hiperplasia, principalmente na Hnod.²⁹⁻³²

A avaliação por imunohistoquímica da expressão desses receptores e proteínas no tecido paratireóideo podem ajudar na compreensão do funcionamento do AI em pacientes submetidos à PTx, com importantes desdobramentos para o tratamento do HPS.

1.3. Tratamento do HPS

1.3.1. Tratamento clínico do HPS

O tratamento clínico do HPS depende da categoria de DRC. Nas fases mais avançadas da DRC, baseia-se no controle dos níveis séricos de Ca, P, reposição de vitamina D nativa, uso de calcitriol ou análogos da vitamina D ativada e calcimiméticos.²

Os sais de Ca podem contribuir para a normalização dos níveis séricos de Ca, e quando utilizado junto com as refeições atua como agente quelante, reduzindo a concentração sérica de P. Quanto à hiperfosfatemia, o tratamento baseia-se na restrição dietética de alimentos ricos em P, no uso de quelantes de P, e em estratégias de diálise para aumentar a massa extraída de P. O calcitriol ou seus análogos atuam nos receptores VDR das células paratireoideanas, diminuindo a síntese e secreção do PTH. Pode atuar no aumento da absorção intestinal de Ca, contribuindo para a normalização da calcemia. Os calcimiméticos aumentam a sensibilidade dos receptores sensíveis ao Ca, diminuindo assim a síntese e secreção do PTH.^{2,10}

Um número significativo de pacientes não responde ao tratamento clínico, evoluindo com manifestações graves do HPS. Nesse contexto, a opção terapêutica é a PTx.

1.3.2. *Tratamento cirúrgico do HPS*

A PTx cirúrgica visa diminuir a quantidade de tecido paratireoideano, controlando assim a produção excessiva do PTH. As recomendações da Sociedade Brasileira de Nefrologia para a realização de PTx consideram o nível sérico de PTH persistentemente acima de 9 vezes o limite superior do método de dosagem, acompanhado de hipercalcemia e/ou hiperfosfatemia refratárias ao tratamento clínico, presença de glândulas maiores que 1,0 cm³ ao ultrassom, calcificações extra-ósseas ou arteriopatias urêmicas calcificantes, e doença óssea avançada, progressiva e debilitante.¹⁰

A PTx é indicada para 1% a 30% dos pacientes com até 10 anos de tratamento com hemodiálise (HD) e em até cerca de 40% dos pacientes com mais de 10 anos dessa terapia.^{11,33}

Diversas técnicas cirúrgicas são propostas para a PTx: total com ou sem AI autólogo de tecido paratireoideano, e subtotal, na qual a maior parte do tecido paratireoideo é retirada. Não existe consenso de qual é a melhor técnica, bem como qual conduz ao melhor desfecho em termos de recorrência ou persistência do HPS, evolução para hipoparatiroidismo, doença óssea adinâmica, calcificação vascular, ou melhor sobrevida.^{34,35}

Na PTx total com AI os fragmentos são geralmente implantados sob a fáscia muscular do antebraço contralateral à fístula arteriovenosa (FAV), fáscia do músculo deltoide ou ainda no subcutâneo da região pré-esternal. A PTx total com AI em antebraço é a técnica mais utilizada no Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Uma das razões para a preferência por esta técnica decorre da facilidade e segurança na remoção dos fragmentos nos casos de recidiva da doença, uma vez que na PTx subtotal é necessária uma nova intervenção na região cervical sob anestesia geral, o que aumenta a morbidade e mortalidade do procedimento.³⁵⁻³⁷

Vale ressaltar que após a PTx total com AI, a função do enxerto é imprevisível, ou seja, os fragmentos podem produzir pouco PTH resultando em um quadro de hipoparatiroidismo, ou se tornarem hiperfuncionantes, levando a recorrência da doença. Porém, especula-se que fatores como a hipercalcemia, que levaria a supressão da secreção de PTH, e o tipo de hiperplasia presente nos fragmentos implantados, podem influenciar no funcionamento do enxerto. Tecido de AI com hiperplasia nodular se associam à piores desfechos, como hipoparatiroidismo, persistência ou recorrência da doença.^{35,38}

1.4 Avaliação do funcionamento do AI de tecido paratireóideo com base nos níveis séricos do PTH do enxerto e PTH sistêmico

Na Ptx total com AI em antebraço analisam-se os níveis séricos do PTH a partir de amostra de sangue colhido por punção da veia logo acima da área do AI (“PTH do enxerto”), e de uma veia no membro superior contralateral (“PTH sistêmico”).

Podemos caracterizar a recidiva do HPS quando os níveis séricos de PTH sistêmico encontram-se persistentemente elevados (>9 vezes o limite superior do método de dosagem), associados ou não a ocorrência de sintomas. Os sinais e sintomas mais comuns são dor óssea e articular, dor e fraqueza muscular, fraturas ósseas e prurido.^{2,10}

Os níveis séricos ideais de PTH para que a remodelação óssea dos pacientes fique próxima ao de um indivíduo normal ainda são motivo de controvérsia. Segundo as diretrizes do KDOQI (*Clinical Practice Guidelines for Bone Metabolism and Disease in Chronic Kidney Disease*) esses níveis deveriam ficar entre 150 e 300 pg/mL. Por outro lado, o KDIGO (*Kidney Disease Improving Global Outcomes*) sugere valor entre 2 e 9 vezes o limite superior da normalidade do método de dosagem.^{39,2}

Na literatura não existe definição quanto ao número ideal de fragmentos que devem ser implantados na PTx com AI, bem como quais são os fatores preditores do funcionamento dos fragmentos.^{34,35} Especulamos também se a carga cumulativas de cálcio elemento e de calcitriol administradas durante o tratamento da fome óssea subsequente à realização da PTx, poderiam exercer influencia sobre o funcionamento do AI.

Faltam estudos que comparem qual é a quantidade adequada de fragmentos e qualidade do tecido a serem enxertados que estariam associados a um melhor controle dos níveis séricos de Ca, P, PTH, e remodelação óssea, bem como melhora da calcificação vascular, no período pós-PTx. Da mesma forma, não é claro se fatores exógenos como medicações utilizadas no período de fome óssea poderiam influenciar o funcionamento do AI no período pós-PTx.

Diante do exposto, decidimos avaliar por um período de 12 meses pacientes com HPS refratário ao tratamento clínico que foram submetidos à PTx total com o AI de distinta quantidade de fragmentos de tecido paratireóideo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os fatores que influenciam a função do AI de tecido paratireóideo em pacientes com HPS submetidos à PTx total com AI (PTx-AI), bem como desfechos clínicos envolvendo funcionamento do AI.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Determinar quais são os efeitos da massa de tecido paratireóideo enxertada (número de fragmentos) sobre o funcionamento do AI pós-PTx e desfechos clínicos;

2.2.2. Determinar qual é o impacto da carga cumulativa de cálcio elemento e de calcitriol administrados no período de fome óssea sobre a função do AI.

2.2.3. Analisar as características anatomopatológicas da glândula usada no AI, quanto ao tipo histológico (Hdif e/ou Hnod), nível de proliferação celular analisada pela expressão de PCNA, e expressão de CaSR, VDR, FGFR1 e proteína Klotho.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Características do estudo

Trata-se de um estudo clínico, prospectivo com um período de seguimento mínimo de 12 meses, randomizado, realizado em pacientes com DRC categoria 5 em HD e em seguimento no ambulatório de DMO-DRC do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP, sob protocolo nº 0882/2011.

3.2. Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão foram: idade superior a 18 anos, ser portador de DRC categoria 5 em HD com indicação de tratamento cirúrgico do HPS.

Os critérios de exclusão foram: pacientes transplantados renais ou que transplantaram no primeiro ano pós-PTx, pacientes com intercorrências significativas no período pós-operatório (choque séptico, hipotensão prolongada e infecção no local do AI), pacientes que reimplantaram a glândula criopreservada antes de completar um ano de PTx, ou pacientes que abandonaram o seguimento.

3.3. Seleção dos pacientes

No período de janeiro de 2012 a julho de 2013, 68 pacientes com DRC categoria 5 em HD, provenientes do Ambulatório de DMO-DRC do Serviço de Nefrologia do HC-FMUSP foram submetidos à três diferentes modalidades de PTx pelo Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço (CCP) do HC-FMUSP:

- Grupo-45: paratireoidectomia total com AI de 45 fragmentos de tecido da paratireoide;
- Grupo-90: paratireoidectomia total com AI de 90 fragmentos de tecido da paratireoide;
- Grupo subtotal: paratireoidectomia subtotal.

No presente estudo analisamos exclusivamente os pacientes dos Grupos 45 e 90. Ressaltamos que no período de janeiro a junho de 2012 foram no incluídos Grupo-45, 12 pacientes (17,6 %) que não seguiram critérios de randomização, pois se constituíam em um grupo preliminar (piloto) de nosso estudo, que posteriormente decidimos incluir no estudo principal. A partir de Julho de 2012 até Julho de 2013, todos os pacientes incluídos no estudo obedeceram à lista de randomização simples, gerada em planilha do Excel. O tipo de operação foi registrado em um envelope lacrado, aberto somente após a indução anestésica. O

nefrologista e o cirurgião não sabiam qual era o tipo de operação a ser empregada até esse momento.

A PTx foi realizada de acordo com a técnica de Wells modificada, que consiste na retirada total das glândulas, seguida por imediato AI de fragmentos de paratireoide na musculatura braquiorradial do membro não dominante e de preferência em posição contralateral a presença da FAV. Os fragmentos são colocados em uma ou duas pequenas aberturas entre a fáscia e o músculo denominada lojas.^{40,41}

Vale ressaltar que no presente estudo os cirurgiões selecionavam os fragmentos de tecido de paratireoide para realizar o AI que evidenciavam a menor quantidade de áreas nodulares ao exame macroscópico.

3.4. Análise de características clínicas, demográficas, laboratoriais e de exames de imagem

As características clínicas analisadas foram: idade, gênero, raça, índice de massa corporal (IMC), etiologia da DRC, tipo de diálise, tempo em diálise, dor óssea pré- e pós-PTx, fratura óssea pré- ou pós-PTx, e tratamento prévio do HPS (uso de carbonato de cálcio, calcitriol, sevelamer ou colecalciferol).

As dosagens bioquímicas analisadas tanto no período pré-PTx quanto no seguimento de 12 meses foram: Ca ionizável, P, fosfatase

alcalina (FA), PTH e calcidiol (25-OHVitD). Após a PTx os níveis de PTH foram analisados a partir de amostras obtidas nos dois braços; consideramos a dosagem de PTH do antebraço contralateral ao do AI como aquela correspondente aos níveis séricos sistêmicos de PTH.

Os níveis séricos de PTH e de 25-OHVitD foram dosados no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular da Disciplina de Endocrinologia da FMUSP. O método empregado na análise do PTH foi o eletroquimioluminométrico [valor de referência (VR): 15 a 65 pg/mL]; o método empregado na análise da 25-OHVitD foi o de quimioimunoensaio (VR: 30 a 100 ng/mL).

As dosagens de Ca total, Ca ionizável, P e FA foram realizadas no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP. Os VR foram de: Ca total, 8,60 a 10,20; Ca ionizável, 4,60 a 5,30 mg/dL; P, 2,7 a 4,5 mg/dL; e FA, 40 a 129 U/L.

A detecção e quantificação de calcificação vascular foi realizada a partir da análise de radiografias de mãos e quadril pelo escore proposto por Adragão e colaboradores (escore com variação de 0 a 8 pontos), aplicado nos períodos pré- e pós-PTx.⁴² As imagens solicitadas para a análise da calcificação vascular foram obtidas em intervalo de até 24 meses pré- ou 24 meses pós-PTx. As radiografias foram analisadas sempre pelo mesmo observador.

Durante o seguimento de um ano os retornos ambulatoriais foram semanais no primeiro mês, quinzenais no segundo mês, quinzenais ou mensais no terceiro mês, mensais do quarto ao sexto mês, trimestrais do sexto mês em diante, até completar um ano de seguimento.

O tempo de duração da fome óssea foi definido como o período imediatamente após a PTx-AI e até o momento no qual os níveis séricos de FA atingiram valores normais para o método (com ou sem o uso de calcitriol), e/ou quando ocorreu a cessação da necessidade de suplementação com sais de Ca para manter a calcemia dentro de níveis séricos adequados.

Definimos hipoparatiroidismo pós-PTx quando o nível sérico de PTH sistêmico após 12 meses de seguimento permaneceu abaixo duas vezes o VR para o método (<130 pg/mL). Definimos persistência do HPS, quando o paciente apresentou níveis séricos de PTH sistêmico acima de 9 vezes o VR para o método (585 pg/mL), após o mesmo período de seguimento.

Definimos dor óssea como uma experiência sensorial e emocional desagradável, localizada na maior parte do esqueleto, mas principalmente no esqueleto apendicular, de característica profunda, com intensidade suficiente para requerer o uso de analgésicos na maior parte dos dias ao longo das semanas.

A cada retorno avaliamos as queixas, sinais e sintomas de cada paciente, resultados dos exames laboratoriais e as medicações em uso. Foram registradas as doses cumulativas de Ca elemento (gramas/dia) e de calcitriol (microgramas/dia) usadas desde o primeiro dia após a PTx-AI até o término do período de fome óssea.

3.5. Análise histológica e imunohistoquímica do tecido paratireóideo

As glândulas obtidas no procedimento cirúrgico foram analisadas no Serviço de Anatomia Patologia do HC-FMUSP e classificadas quanto ao tipo predominante de proliferação, ou seja, Hdif ou Hnod.

Parte da glândula usada no AI foi analisada no nosso laboratório, a partir de cortes histológicos para a realização de imunohistoquímica. Nesses cortes analisamos a expressão de PCNA, CaSR, VDR, FGFR1 e Klotho.

A técnica de imunohistoquímica compreende várias etapas descritas a seguir:

Desparafinização e exposição antigênica: inicialmente retiramos a parafina das lâminas. Para tanto, as mesmas, permaneceram 30 minutos em estufa a 60°C, quando foram então imersas em Xilol durante 9 minutos, por 3 vezes. Em seguida, foram colocadas em álcool absoluto 100% por 5 minutos (2 vezes), álcool 96% por 3 minutos (2

vezes), e por 5 minutos água destilada. Na etapa seguinte, as lâminas foram hidratadas com solução salina tris-tamponada (TBS, pH=7,6). Essa solução é preparada misturando-se Tris-HCl a 0,5M (Sigma, Saint Louis, EUA) em pH=7,6, acrescida de cloreto de sódio (NaCl) a 0,15M (Merck, Darmstadt, Alemanha), na proporção de 1:10 e usada para avaliar a expressão do PCNA e da proteína Klotho. Quanto a expressão de VDR e CaSR o tampão usado foi solução Tris-salina e tween 20 TBST (TBS 0,05% de tween ou *Dako wash buffer* 1x). A recuperação antigênica se fez por aquecimento em forno de micro-ondas, panela de pressão ou a panela a vapor. Para tanto, as lâminas foram imersas em tampão citrato (2,1g de ácido cítrico monohidratado dissolvido em 1000 ml de água destilada, ajustando o pH=6,0, com NaOH). Para as reações de PCNA, usamos forno micro-ondas por 15 minutos. Para o VDR, panela de pressão por 3 minutos e para o Klotho e o CaSR panela de vapor por 30 minutos.

Descrição das técnicas de imunohistoquímica: as reações de imunohistoquímica para identificação da expressão de VDR e Klotho foram realizadas pelo método de imunoperoxidase com o “kit” Vectastain ABC, *horseradish-peroxidase* (HRP), complexo Avidina/Biotina (Vector, Burlingame, CA, EUA). O ensaio utilizado para CaSR foi Vectastain ABC, complexo Avidina/Biotina Fosfatase Alcalina (Vector, Burlingame,

CA, EUA), e para o PCNA e FGFR1 foi o LSAB – *Labeled Streptavidin-Biotin Method* (Dako, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Após exposição antigênica bloqueamos a peroxidase endógena com solução de 3% de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em álcool metílico (CH_3OH), exceto para o CaSR. Em seguida realizamos o bloqueio da avidina e da biotina endógenas durante 15 minutos cada um, empregando bloqueio Avidina/Biotina (Vector, Burlingame, CA, EUA), seguido do bloqueio inespecífico com soro não-imune de cavalo (Vector, Burlingame, CA, EUA), na diluição de 1:20, durante 30 minutos, com o exceção do VDR, onde usamos soro não-imune de coelho (Vector, Burlingame, CA, EUA) na diluição 1:20, durante 30 minutos.

Os cortes para PCNA foram, incubados com anticorpo monoclonal produzido em camundongo anti-PCNA (Clone PC10, DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) na diluição de 1:100, *overnight*, a 4°C, em câmara úmida. Em seguida os cortes foram incubados com “kit” LSAB (Dako Glostrup, Dinamarca). Para visualização da positividade das células utilizamos o AEC como substrato cromogênico. Após a revelação, os cortes foram contra-corados com Methyl Green (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). As células (núcleos) que expressam PCNA apresentam cor vermelha acastanhada.

Os cortes para CaSR foram incubados com anticorpo monoclonal

produzido em camundongo anti-CaSR (Thermo Scientific, IL, USA) na diluição de 1:1000 em tampão TBST com 1% de BSA, *overnight*, a 4°C em câmara úmida. Depois disso os cortes foram incubados com anti-imunoglobulina de camundongo, produzida em cavalo, conjugado com biotina (BA-2001, Vector, Burlingame, CA, EUA) na diluição de 1:100 em tampão TBST com 1% de BSA, durante 60 minutos seguida de nova incubação com o complexo Vectastain Avidina/Biotina Fosfatase Alcalina (Vector, Burlingame, CA, EUA) por mais 30 minutos. O substrato cromogênico utilizado foi *Fast-red*, por 10 minutos. Após a revelação, os cortes foram contra-corados com Hemalumbre de Mayer (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). As células que expressam CaSR apresentam cor vermelha.

Os cortes para VDR foram incubados com anticorpo monoclonal produzido em rato anti-VDR (Thermo Scientific, Illinois, EUA) na diluição de 1:500 em tampão TBST e em BSA 1%, *overnight*, 4°C, em câmara úmida. Depois dessa etapa, foram incubados com anti-rato, produzido em coelho, conjugado com biotina (BA-4000, Vector, Burlingame, CA, EUA) na diluição de 1:1000 em tampão TBST e em BSA 1%, durante 30 minutos seguida de nova incubação com o complexo Vectastain ABC-HRP (Vector, Burlingame, CA, EUA) durante 30 minutos. O substrato cromogênico utilizado foi 3,3-Diaminobenzina (DAB) por 5 minutos. Após a revelação, os cortes foram contra-corados com Methyl Green

(DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca). As células (núcleos) que expressam VDR apresentam cor marrom.

Os cortes para Klotho foram incubados com anticorpo monoclonal produzido em camundongo anti-Klotho (R&D Systems, EUA) na diluição de 1:20 em tampão TBS com 1% de BSA, *overnight*, 4°C, em câmara úmida. Depois dessa etapa os cortes foram incubados com anti-camundongo, produzido em cabra, conjugado com biotina (BA-9500, Vector, Burlingame, CA, EUA) na diluição de 1:1000 em tampão TBS com 1% de BSA, durante 45 minutos seguida de nova incubação com o complexo Vectastain ABC-HRP (Vector, Burlingame, CA, EUA) durante 30 minutos. O substrato cromogênico utilizado foi o 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC) por 15 minutos. Após a revelação, os cortes foram contra-corados com Hemalumbre de Mayer. As células que expressam essa proteína apresentam cor vermelha acastanhada.

Para avaliar o FGFR1 os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal produzido em coelho anti-FGFR1 (Flg C-15, Santa Cruz, Temecula, CA, EUA) na diluição de 1:600, *overnight*, a 4°C, em câmara úmida. A seguir foram incubados com *biotinylated link universal* (“kit” LSAB Dako), durante 10 minutos, seguida de nova incubação com o complexo estreptavidina peroxidase durante 10 minutos. Para visualização da positividade das células utilizamos o AEC como

substrato cromogênico. Após a revelação, os cortes foram contra-corados com hemalumbre de Mayer. As células (núcleos) que expressam FGFR1 apresentam cor vermelha acastanhada.

A quantificação das células que expressam PCNA e VDR foi realizada sob aumento de 400x utilizando o microscópio Nikon Eclipse 50i. Analisamos 20 campos nos quais contamos as células positivas em cada campo. O valor final foi expresso em células positivas por campo de 0,2376 mm².

Para quantificar a expressão de CaSR, FGFR1 e Klotho usamos o mesmo microscópio, com aumento de 400x. Registramos fotos de 20 campos consecutivos com câmera digital Nikon Digital Sight por meio do programa NIS-elements F, versão 2.30 (Nikon Instruments, Inc., Melville, NY, USA). As marcações positivas em cada campo foram quantificadas automaticamente por meio do programa *Image ProPlus*, versão 7.0 (MediaCybernetics, Inc., Rockville, MD, USA).

3.6. *Análise Estatística*

Os resultados foram analisados quanto a sua natureza categórica ou contínua, e quanto ao seu tipo de distribuição (paramétrica e não-paramétrica), de maneira descritiva, comparativa e relacional. Variáveis com distribuição normal foram expressas como média e desvio padrão, e aquelas que não tinham distribuição normal foram expressas em mediana e intervalo interquartil, ou média e valor mínimo e máximo.

As médias das variáveis com distribuição paramétrica foram comparadas entre os grupos por meio do teste t de Student, enquanto a mediana daquelas com distribuição não-paramétrica com o teste de Mann-Whitney. Comparações entre variáveis categóricas foram realizadas pelo teste do Qui-quadrado. Correlações entre dados foram realizadas pelo teste de Spearman.

Os resultados foram analisados empregando-se o programa SPSS 16.0 (IBM Inc., Armonk, NY, USA). Consideramos como estatisticamente significativo o nível bi-caudal de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. *Pacientes e evolução*

Um total de 52 pacientes foi randomizado entre o Grupo-45 e Grupo-90. Durante o seguimento, foram excluídos: um paciente (N=1, Grupo-45) por reimplante precoce de tecido paratireoideano devido à hipoparatiroidismo pós-PTx, um paciente (N=1, Grupo-90) por persistência de HPS devido a paratireoide ectópica, quatro (N=4, sendo 2 pacientes do Grupo-45 e 2 pacientes do Grupo-90) por transplante renal, e nove (N=9, sendo 5 pacientes do Grupo-45 e 4 pacientes do Grupo-90) por abandono do seguimento ambulatorial antes de um ano. No período do estudo um paciente (N=1, Grupo 45) evoluiu à óbito devido sepse de foco abdominal, o que correspondeu a uma taxa de mortalidade do estudo de 2,7 mortes por 100 pacientes-ano.

Trinta e seis (N=36) pacientes completaram o estudo, sendo vinte e oito (28) do Grupo-45, e oito (8) do Grupo-90.

4.2. *Características demográficas, clínicas, laboratoriais e de exames de imagem no início do estudo*

As características clínicas, demográficas, bioquímicas e de imagem dos dois grupos foram semelhantes no início do estudo (t0), exceto para os níveis séricos de P (Tabelas 1 e 2).

Todos os pacientes realizavam HD com concentração de Ca no dialisato igual a 3,5 mEq/L. Para o controle da hiperfosfatemia, a maioria (22 pacientes, 59%) utilizava cloridrato de sevelamer e apenas dois utilizavam carbonato de cálcio como quelante de P (2, 5,5%); sete pacientes recebiam calcitriol intermitente na forma de pulsoterapia (7, 19,4%), e doze faziam reposição com vitamina D previamente à PTx (12, 33%). Apenas 1 (um) paciente do Grupo 45 foi diagnosticado com tumor marrom por meio de exame de imagem.

Considerando todos os pacientes em conjunto, no t0 observamos correlações negativas entre nível sérico de calcidiol e IMC ($r^2 = -0,55$; $p = 0,034$), calcidiol e FA ($r^2 = -0,595$; $p = 0,002$). Detectamos correlação positiva entre os níveis séricos de FA e PTH ($r^2 = 0,503$; $p = 0,002$), FA e IMC ($r^2 = 0,434$; $p = 0,039$). A idade correlacionou-se positivamente com o escore de calcificação vascular ($r^2 = 0,378$; $p = 0,047$), e tempo de hemodiálise ($r^2 = 0,404$; $p = 0,015$).

Tabela 1. Características clínicas, demográficas, e de exames de imagem no início do estudo de todos os pacientes e separados por grupo, de acordo com o número de fragmentos do auto-implante.

Parâmetro	Total (N=36)	Grupo-45 (N=28)	Grupo-90 (N=8)	P
Idade (anos)	49 ± 11	48 ± 10	50 ± 14	0,73
Sexo (feminino, %)	19 (53)	17 (47)	2 (5)	0,69
Raça (branca, %)	19 (53)	14 (39)	5 (14)	0,46
Etiologia DRC (N)				0,59
Hipertensão arterial	17	14	3	
Diabete melito	2	2	0	
Glomerulonefrite	13	9	4	
Doença policística	2	1	1	
Tempo de hemodiálise (meses)	90,6 ± 38,8	88,4 ± 35,5	99 ± 51	0,60
Calcitriol pré-PTx (N, %)	14 (39)	10 (28)	4 (11)	0,70
Vitamina D pré-PTx (N, %)	14 (39)	10 (28)	4 (11)	0,70
Dose de vitamina D (UI/semana)	14.571 ± 7.176	12.600 ± 7.456	16.000 ± 6.733	0,57
Fratura pré-PTx (N, %)	2 (6)	1 (3)	1 (3)	0,40
Dor óssea (N, %)	27 (75)	20 (55)	7 (19)	0,65
Escore de calcificação vascular (UA)	0,53 (0 a 4)	0,65 (0 a 4)	0	0,20
Índice de massa corporal (kg/m ²)	25 ± 4	25,5 ± 4,4	24 ± 3,8	0,50

DRC, doença renal crônica; PTx, paratireoidectomia; UA, unidades arbitrárias; UI, unidades internacionais. Dados expressos em média ± DP, média e valor mínimo e máximo, ou mediana e intervalos interquartil (percentil 25-75).

Tabela 2. Características bioquímicas no início do estudo de todos os pacientes e separadas por grupo, de acordo com o número de fragmentos do auto-implante.

Parâmetro	Total (N=36)	Grupo-45 (N=28)	Grupo-90 (N=8)	P
Cálcio iônico (mEq/L)	5 ± 0,8	5 ± 0,8	5 ± 0,8	0,94
Cálcio total (mg/dl)	9,6 ± 0,7	9,6 ± 0,6	9,6 ± 0,9	0,87
Fosfato (mg/dl)	4,8 ± 1,2	5,1 ± 1,1*	3,8 ± 1,1	0,009
Paratormônio (pg/ml)	1.770 ± 867	1.832 ± 840	1.551 ± 992	0,42
Fosfatase alcalina (UI/L)	286 (228-842)	307 (234–873)	282 (142-392)	0,32
Calcidiol (ng/dl)	23 ± 11	23,4 ± 11,6	20,2 ± 8,4	0,5

UI, unidades internacionais; Dados expressos em média ± desvio-padrão ou mediana e intervalos interquartil (percentil 25-75). *p = 0,009 Grupo-45 vs. Grupo-90.

4.3. Análise histológica e imunohistoquímica

Com relação aos resultados anatomopatológicos as amostras foram classificadas em Hdif em 24 (65%) pacientes, de acordo com critérios do Serviço de Anatomia Patológica do HC-FMUSP. O tipo de hiperplasia não teve relação com a classificação evolutiva dos pacientes para hipo- ou normoparatireoidismo ($p = 0,292$), nível sérico de PTH ($p = 0,09$) e FA pós-PTx ($p = 0,529$), duração da fome óssea ($p = 0,582$), expressão de PCNA ($p = 0,374$), CaSR ($p = 0,704$), VDR ($p = 0,197$), FGFR1 ($p = 0,243$) e Klotho ($p = 0,105$).

A análise imunohistoquímica do tecido paratireoideano revelou que a média ou mediana de expressão de PCNA, CaSR, VDR, FGFR1 e Klotho, por 20 campos analisados no fragmento do AI, não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos (Tabela 3). Devido à qualidade do tecido utilizado nas preparações histológicas para imunohistoquímica o número de amostras analisadas variou entre 12 e 25 no Grupo-45, e entre 7 a 8 no Grupo-90.

As Figuras 3 a 7 demonstram as marcações por imunohistoquímica quanto a expressão de PCNA, CaSR, VDR, FGFR1 e Klotho no tecido paratireoideo.

Tabela 3. Perfil de expressão de diferentes marcadores avaliados pela técnica de imunohistoquímica em tecido paratireóideo no início do estudo, de todos os pacientes e separados por grupo, de acordo com o número de fragmentos do auto-implante.

Parâmetro	Total	Grupo-45	Grupo-90	P
Hiperplasia difusa (N, %)	24 (65)	17 (46)	7 (19)	0,44
PCNA (célula/campo)	7,6 (3,4–18)	7,2 (3,4–18)	10,6 (3,4–29)	0,56
CaSR (%/campo)	20,7 ± 13,5	17,3 ± 12,3	27,7 ± 14	0,79
VDR (célula/campo)	5,9 (1–10,6)	6,1 (1–10,7)	4,6 (1–9,5)	0,56
FGFR1 (%/campo)	19 ± 9,4	16,2 ± 10	23,5 ± 6,9	0,21
Klotho (%/campo)	0,11 (0,02–2,53)	0,1 (0,02–1,3)	0,95 (0,02–4,7)	0,43

PCNA, antígeno de núcleo celular proliferativo; CaSR, receptor sensível ao cálcio; VDR, receptor de vitamina D; FGFR1, receptor-1 de fator de crescimento de fibroblastos. Dados expressos em média ± desvio-padrão ou mediana e intervalos interquartil (percentil 25-75) relativos à porcentagem de tecido por campo com aumento de 400x.

Figura 3. Padrão de expressão de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) avaliado pela técnica de imunohistoquímica. A (aumento de 100x), B (400x, detalhe: 1000x), hiperplasia difusa; C (100x) e D (400x, detalhe: 1000x), hiperplasia nodular.

Figura 4. Padrão de expressão de receptor sensível ao cálcio (CaSR) avaliado pela técnica de imunohistoquímica. E (aumento de 100x), F (400x, detalhe: 1000x), hiperplasia difusa; G (100x) e H (400x, detalhe: 1000x), hiperplasia nodular.

Figura 5. Padrão de expressão de receptor da vitamina D (VDR) avaliado pela técnica de imunohistoquímica. I (aumento de 100x), J (400x, detalhe: 1000x), hiperplasia difusa; K (100x) e L (400x, detalhe: 1000x), hiperplasia nodular.

Figura 6. Padrão de expressão de receptor-1 do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR1) avaliado pela técnica de imunohistoquímica. M (aumento de 100x), N (400x, detalhe: 1000x), hiperplasia difusa; O (100x) e P (400x, detalhe: 1000x), hiperplasia nodular.

Figura 7. Padrão de expressão de Klotho avaliado pela técnica de imunohistoquímica. Q (aumento de 100x), R (400x, detalhe: 1000x), hiperplasia difusa; S (100x) e T (400x, detalhe: 1000x), hiperplasia nodular.

4.3. Características demográficas, clínicas, laboratoriais e de exames de imagem no final do seguimento (12 meses pós-PTx)

Não observamos diferenças significativas quanto aos níveis séricos de Ca, Cai, P, FA, PTH do enxerto, PTH sistêmico, calcidiol e doses cumulativas de cálcio elemento e calcitriol entre os dois grupos estudados. Da mesma maneira, não observamos diferenças entre os dois grupos em relação à duração ou persistência da fome óssea, ocorrência de fraturas ósseas patológicas, persistência de dor óssea, calcificação vascular ou gravidade do quadro clínico (Tabelas 4 e 5).

Considerando todos os pacientes analisados em conjunto, no final do estudo (t12) observamos correlações entre níveis séricos de PTH do enxerto no t12 com o PTH sistêmico no t12 ($r^2 = 0,646$; $p = 0,0001$), e entre PTH do enxerto no t12 com Cai e CaT no t0 ($r^2 = 0,556$; $p = 0,002$; $r^2 = 0,442$; $p = 0,016$, respectivamente). O PTH sistêmico apresentou correlação com os níveis séricos de Cai no t0 ($r^2 = 0,450$; $p = 0,008$). Não observamos correlações significativas entre os níveis séricos de PTH com a carga cumulativa de cálcio elemento, calcitriol, P, FA, duração da fome óssea ou padrão de expressão tecidual de PCNA, CasR, VDR, FGFR1 e Klotho.

A duração da fome óssea se correlacionou com os níveis séricos FA no t0 ($r^2 = 0,593$; $p = 0,001$), e de FA no t12 ($r^2 = 0,656$; $p = 0,001$), mas não com os níveis séricos de PTH, Ca, P, calcidiol ou padrão de expressão tecidual de PCNA, CasR, VDR, FGFR1 e Klotho. O nível sérico de FA no t12 se correlacionou com o tempo de diálise ($r^2 = 0,347$, $p = 0,045$).

A expressão de VDR nas células paratireoideanas se correlacionou com os níveis séricos de Cai no início do estudo ($r^2 = -0,464$; $p = 0,007$), Cai e CaT no t12 ($r^2 = 0,410$; $p = 0,018$; $r^2 = 0,358$; $p = 0,044$, respectivamente), e negativamente com a carga cumulativa de Ca elemento no t12 ($r^2 = -0,359$; $p = 0,04$). A expressão de CaSR esteve negativamente correlacionada com a carga cumulativa de calcitriol no t12 ($r^2 = -0,445$; $p = 0,049$). A expressão de FGFR1 esteve correlacionada com os níveis de FA no t0 ($r^2 = -0,758$; $p = 0,0001$). A expressão de PCNA esteve correlacionada com o tempo de hemodiálise ($r^2 = 0,437$; $p = 0,016$), e com os níveis séricos de CaT no t0 ($r^2 = 0,454$; $p = 0,015$).

Quanto à expressão de Klotho detectamos uma correlação positiva com a dose de vitamina D administrada pré-PTx ($r^2 = 0,811$; $p = 0,027$), e negativa com os níveis séricos de P no t0 ($r^2 = -0,528$; $p = 0,017$).

O escore de calcificação vascular pós-PTx correlacionou-se positivamente com a carga cumulativa de Ca elemento no t12 ($r^2 = 0,605$; $p = 0,006$), com o P no t0 ($r^2 = 0,503$; $p = 0,028$), e com o escore de calcificação vascular pré-PTx ($r^2 = 0,575$; $p = 0,020$). Observou-se progressão da calcificação vascular no período de análise dos escores [0,53 (0 a 4) vs. 1,1 (0 a 8), $p = 0,04$]; não houve diferenças entre os grupos na progressão da calcificação vascular.

Considerando a classificação evolutiva dos pacientes para hipo- ou normoparatiroidismo, a comparação de médias não revelou diferenças em relação às diferentes variáveis clínicas, bioquímicas, de imagem, e histológicas estudadas. A categoria evolutiva recorrência de hiperparatiroidismo não apresentou nenhuma ocorrência (N=0).

A Tabela 6 mostra a frequência de pacientes com exames bioquímicos considerados em relação a sua meta terapêutica, no t0 e t12, de todos os pacientes e separados por grupo de acordo com o número de fragmentos do AI.

Tabela 4. Características demográficas, clínicas e de exames de imagem 12 meses pós-PTx de todos os pacientes e separados por grupo, de acordo com o número de fragmentos do auto-implante.

Parâmetro	Total (N=36)	Grupo-45 (N=28)	Grupo-90 (N=8)	P
Fratura pós-PTx (n, %)	1 (3)	1 (3)	0 (0)	0,78
Dor óssea pós-PTx (n, %)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA
Escore de calcificação vascular (UA)	1,1 (0 a 8)	1,3 (0 a 8)	0,5 (0 a 2)	0,66
Tempo de síndrome de fome óssea (dias)	182 ± 134	200 ± 141	118 ± 81	0,12
Persistência de fome óssea (n, %)	7 (19)	6 (16)	1 (3)	0,46
Evolução para hipoparatiroidismo (n, %)	23 (64)	19 (53)	4 (11)	0,23
Evolução para normoparatiroidismo (n, %)	12 (33)	8 (22)	4 (11)	0,25
Evolução para hiperparatiroidismo (n, %)	0	0	0	NA

NA, não aplicável; PTH, hormônio da paratireoide; PTx, paratireoidectomia; UA, unidades arbitrárias. Dados expressos em média ± desvio-padrão, média e valor mínimo e máximo, ou mediana e intervalos interquartil (percentil 25-75).

Tabela 5. Características clínicas e bioquímicas 12 meses pós-PTx de todos os pacientes e separadas por Grupo, de acordo com o número de fragmentos do auto-implante.

Parâmetro	Total (N=36)	Grupo-45 (N=28)	Grupo-90 (N=8)	P
Ca iônico (mEq/L)	4,3 ± 0,5	4,3 ± 0,5	4,2 ± 0,5	0,70
Ca total (mg/dl)	8,3 ± 1	8,3 ± 1	8,4 ± 0,9	0,74
Fosfato (mg/dl)	4,0 ± 1,2	4,0 ± 1,3	4,1 ± 0,7	0,79
Fosfatase alcalina (UI/L)	89,5 (62–123)	91,5 (68–123)	59 (50-127)	0,25
Calcidiol (ng/ml)	32,3 ± 10,4	31,4 ± 10,7	34,7 ± 10,2	0,53
PTH enxerto (pg/ml)	1.657 ± 1.914	1.585 ± 1.848	1.945 ± 2.330	0,69
PTH sistêmico (pg/ml)	125 ± 105	113 ± 92	163 ± 143	0,25
Carga de cumulativa calcitriol (µg)	386 ± 276	375 ± 269	423 ± 316	0,67
Carga cumulativa de Ca elemento (g)	4.398 (1.932–8.400)	5.292 (1.588-9.518)	2.795 (1.932-5.830)	0,37

PTH, hormônio da paratireóide, Ca, cálcio. Dados expressos em média ± desvio-padrão ou mediana e intervalos interquartil (percentil 25-75).

Tabela 6. Frequência de pacientes com exames bioquímicos considerados em relação a sua meta terapêutica, no início e 12 meses pós-PTx de todos os pacientes e separados por grupo, de acordo com o número de fragmentos do auto-implante.

Início

	Total (N=36)	Grupo-45 (N=28)	Grupo-90 (N=8)	P
Cálcio total $\geq 10,2$ (mg/dl) (n, %)	9 (24)	7 (19)	2 (5)	1,00
Fosfato $\geq 5,5$ mg/dl (n, %)	9 (24)	9 (24)	0 (0)	0,08
Paratormônio ≥ 150 e ≤ 300 (pg/ml) (n, %)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA
Paratormônio ≥ 2 e $\leq 9 \times$ Isn	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA
Deficiência calcidiol (n, %)	12 (33)	9 (25)	3 (8)	0,64
Insuficiência calcidiol (n, %)	9 (25)	7 (20)	2 (5)	1,00

12 meses pós-PTx

Cálcio total $\geq 10,2$ (mg/dl) (n, %)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA
Fosfato $\geq 5,5$ mg/dl (n, %)	3 (8)	3 (8)	0 (0)	0,56
Paratormônio ≥ 150 e ≤ 300 (pg/ml) (n, %)	7 (19)	5 (14)	2 (5)	1,00
Paratormônio ≥ 2 e $\leq 9 \times$ Isn (n, %)	12 (32)	8 (22)	4 (10)	0,44
Deficiência calcidiol (n, %)	13 (36)	10 (28)	3 (8)	0,47
Insuficiência calcidiol (n, %)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA

NA, não aplicável; Isn, limite superior da normalidade para o método. Dados expressos em frequência e porcentagem de ocorrência.

5. DISCUSSÃO

Os principais resultados do presente estudo envolvendo pacientes com HPS grave submetidos à PTx-AI foram:

- (1) A PTx-AI resultou em melhor controle dos sintomas, alterações bioquímicas e hormonais relacionados aos DMO-DRC; entretanto, observamos piora da calcificação vascular potencialmente relacionada com a carga cumulativa de Ca elemento usada para o tratamento da fome óssea, bem como com os níveis séricos de P no início do estudo;
- (2) O funcionamento do AI, refletido por meio dos níveis séricos de PTH pós-PTx, não foi influenciado pela massa de tecido do AI (45 ou 90 fragmentos), tipo de hiperplasia, ou densidade de expressão de PCNA, CaSR, VDR, FGFR1 ou Klotho;
- (3) A classificação evolutiva para hipo- ou normoparatiroidismo pós-PTx não foi influenciada por nenhum parâmetro demográfico, clínico ou bioquímico estudado;
- (4) Os níveis séricos de FA no t0 associaram-se com a duração da fome óssea e expressão de FGFR1 no tecido paratireoideano; a expressão de CaSR teve relação como menor uso de calcitriol no período de fome óssea; a expressão de PCNA esteve relacionada com o tempo de hemodiálise e níveis séricos de CaT no t0; a expressão de Klotho associou-se com a dose de vitamina D nutricional utilizada pré-PTx-AI e nível sérico de P no t0.

A partir de 2005, observou-se uma redução importante da taxa de realização de PTx para o tratamento de HPS em diversas partes do mundo. Esse decréscimo foi associado com a introdução de novos medicamentos para o tratamento clínico do HPS, como o paricalcitol e cloridrato de cinacalcete.^{43,44}

Apesar de o tratamento clínico resultar em controle do HPS em grande número dos pacientes, resultados em termos do desfecho mortalidade são difíceis de serem demonstrados.⁴⁵ Soma-se a esse fato, que parcela significativa de pacientes não respondem ao tratamento clínico ou não tem acesso a drogas como paricalcitol ou cloridrato de cinacalcete. Esses fatores contribuem para que um grande número de pacientes evolua para formas graves de HPS com, com indicação de PTx.^{46,47} Estima-se que 10.7% ou 3.463 pacientes em diálise no Brasil tenham indicação de PTx devido a HPS com níveis de PTH superiores a 1.000 pg/ml.¹¹

Existem evidências que a PTx reduza a mortalidade em pacientes com HPS grave não-responsivo a tratamento clínico.⁴⁸⁻⁵⁰ Nosso estudo não avaliou morte como desfecho primário. Contudo, observamos uma taxa de mortalidade de 2,7 mortes por 100 pacientes-ano.⁴⁸ Além disso, registramos remissão total do sintoma dor óssea, o que está associado com melhora da qualidade desses pacientes.⁵¹

Em nosso estudo o escore de calcificação vascular, avaliado por meio de radiografias das mãos e bacia, apresentou progressão significativa [0,53 (0 a 4) vs. 1,1 (0 a 8), $p = 0,04$], o que corresponde a um aumento de 107% em relação ao início do estudo. Como os pacientes estudados receberam quase 4,5 kg de Ca elemento ao longo do seguimento de 12 meses [4.398 g (1.932–8.400)] e a carga cumulativa de Ca elemento usada no tratamento da fome óssea pós-PTx esteve relacionada à esse escore, acreditamos que exista uma relação causal entre esses fatores.

De fato, o bloqueio parcial ou total da remodelação óssea induzido por queda abrupta e sustentada do PTH subsequente à PTx, pode resultar na deposição de Ca nos vasos. Resta esclarecer se a progressão da calcificação vascular observada nesse estudo foi maior do que aquela observada em pacientes com HPS em tratamento clínico ótimo, ou mesmo, parcial. Uma analogia pode ser feita com estudos que avaliaram progressão de calcificação vascular em pacientes com HPS em tratamento clínico.

Nakayama e colaboradores observaram em 33 pacientes em HD com HPS tratados com hidrocloreto de cinacalcete e análogos da vitamina D, que o índice de área calcificada da aorta avaliada por meio de tomografia computadorizada com *multidetector* (TCMD) progrediu cerca de 16% em 12 meses.⁵² Em uma análise *post-hoc* do estudo

ADVANCE que avaliou a progressão de calcificação vascular detectada por meio de TCMD em 360 pacientes e HD com HPS, observou-se após 52 semanas uma progressão da calcificação vascular de 31,3% em coronárias e 33,1% em aorta torácica no grupo controle.⁵³

A PTx é um tratamento efetivo e seguro para o HPS refratário ao tratamento clínico. Geralmente a escolha da técnica é definida pela preferência e experiência do cirurgião.^{37,54} Em princípio a PTx deveria corrigir os níveis excessivos de PTH na direção de manter um nível adequado desse hormônio, de modo que os pacientes não desenvolvessem hipoparatiroidismo, baixa remodelação óssea e doença óssea adinâmica.⁵⁵

Os estudos atualmente disponíveis na literatura referem-se à PTx como uma técnica que leva à baixa ocorrência de hipoparatiroidismo pós-PTx.^{41, 56-57} No entanto, usando como referência os valores de PTH sugeridos pelo KDIGO,² encontraríamos nesses estudos a ocorrência de hipoparatiroidismo em mais de 2/3 dos casos. Portanto, é válido postular que uma maior massa de Al poderia reduzir a prevalência de hipoparatiroidismo pós-PTx.

Poucos trabalhos compararam os efeitos da quantidade e qualidade do Al na PTx total. Habitualmente, a massa de tecido implantado na PTx-Al é próxima aquela descrita por Wells (20

fragmentos de 1 ou 2 mm²)⁴⁰, 30,⁵⁸ ou até 45 fragmentos 2 mm², como é realizado habitualmente no Serviço de CCP do HC-FMUSP.⁴¹

No melhor do nosso conhecimento esse é o primeiro estudo clínico prospectivo que testou a hipótese que diferentes massas de AI podem resultar em diferentes desfechos, e principalmente, pesquisar os fatores que determinam o funcionamento do AI.

De acordo com nossos resultados o funcionamento do AI não foi influenciado pela massa de tecido do AI (45 ou 90 fragmentos). Apesar de observarmos no Grupo-90, ao final do seguimento, um nível sérico de PTH sistêmico 44% maior, e de PTH do enxerto 23% maior em relação ao Grupo-45, essas diferenças não foram significativas. Pitt e colaboradores também não observaram diferença dos efeitos da massa de tecido paratireoideano remanescente na PTx subtotal ou PTx-AI em relação à desfechos ligados ao PTH, em pacientes com hiperparatireoidismo terciário.⁵⁹

Da mesma forma, o tipo de hiperplasia, ou densidade de expressão de PCNA, CaSR, VDR, FGFR1 ou Klotho, e diversos parâmetros demográficos, clínicos e bioquímicos estudados não se mostraram determinantes do funcionamento do AI em nosso estudo. No entanto, temos que considerar que a nossa coorte de pacientes apresentavam HPS extremamente grave, com referenciamento tardio e dificuldade no acesso ao tratamento clínico e cirúrgico. Isso pode

explicar a taxa semelhante entre os grupos de evolução para hipo- ou normoparatiroidismo.

No entanto, as correlações observadas nesse estudo entre parâmetros clínicos, laboratoriais e de imagem, com a expressão de proteínas e receptores no tecido paratireoideano permite a geração de hipóteses interessantes.

Os níveis séricos de FA no início do estudo apresentaram relação com a duração da fome óssea, fato já descrito na literatura.⁶⁰ Porém, a sua relação negativa com a expressão de FGFR1 no tecido paratireoideano, pode sinalizar maior gravidade da doença. Acredita-se que pacientes desenvolvem HPS tenham resistência à ação de FGF23.^{21,61} Uma hipótese é que a redução da densidade de expressão do FGFR1 e do Klotho contribuiriam para elevar os níveis de FGF23. No entanto nesse estudo não analisamos os níveis séricos de FGF23, que geralmente estão muito elevados nos pacientes com DRC.

Em nosso estudo, a expressão de Klotho parece sofrer influência positiva da vitamina D nutricional e negativa dos níveis séricos de P. Sabe-se que com a progressão da DRC, ocorre redução da expressão de Klotho na paratireoide.^{21,31} Krajisnik e colaboradores descreveram que células de paratireoide bovinas tratadas com compostos ativos de vitamina D podem aumentar a expressão de Klotho, embora os autores não tenham observado efeito do P na sua expressão.²¹

No melhor do nosso conhecimento, nosso estudo é o primeiro a mostrar *in vivo* potenciais efeitos da reposição de vitamina D sobre a expressão de Klotho em paratireoides humanas.

Talvez esse fenômeno tenha utilidade no sentido de reduzir a resistência ao FGF23, por meio da reposição de vitamina D nativa, resultando no aumento da expressão de seu cofator, Klotho. No entanto, até o momento o significado clínico da modulação do eixo Klotho-FGFR1 no HPS é desconhecido.

Encontramos uma expressão reduzida de CaSR no tecido paratireoideano, o que está em linha com o descrito na literatura.^{31,62} A relação negativa entre a densidade de expressão de CaSR e carga cumulativa de calcitriol provavelmente sinaliza maior gravidade do HPS. A correlação entre aumento da expressão de PCNA com o tempo em HD e CaT no t0 também sugerem maior gravidade do HPS.

Nosso estudo apresenta limitações. O número de pacientes é relativamente pequeno. Incluímos no Grupo-45 12 pacientes sem seguir a lista de randomização. Porém, os resultados no início do estudo mostram que os grupos estavam balanceados quanto às variáveis, clínicas, demográficas e bioquímicas, com exceção dos níveis de P. Vale ressaltar que quando excluímos os pacientes que não foram randomizados os resultados se mantiveram.

Outra limitação foi a gravidade dos pacientes incluídos no nosso estudo, fato que deve ser considerado na interpretação dos resultados. Por exemplo, no Japão a abordagem clínica e cirúrgica do HPS é distinta da medicina praticada no Ocidente: a estratégia é evitar o desenvolvimento de HPS. Considera-se como aceitável na DRC categoria 5 valores de PTH entre 60 e 240 pg/ml, sendo que a PTx é indicada quando esses valores estão superiores à 500 pg/ml ou mesmo em níveis inferiores, se há dificuldade no controle do P e/ou Ca sérico. O racional é que em longo prazo níveis elevados de PTH podem resultar em maior mortalidade.⁶³

Possivelmente, indicar e realizar PTx-AI de forma mais precoce, utilizando para AI um tecido com menor grau de alterações teciduais adaptativas permitiria uma melhor discriminação dos fatores envolvidos no funcionamento do AI, além, de resultar em menor ocorrência de hipoparatiroidismo pós-PTx, e conseqüentemente, menor prevalência de doença óssea adinâmica, calcificação vascular, e talvez, mortalidade. Finalmente, utilizamos para a avaliação da calcificação vascular um método com sensibilidade e especificidade inferior em relação ao padrão-ouro.

6. CONCLUSÕES

Em conclusão, esse é o primeiro estudo clínico que avaliou prospectivamente os efeitos do AI com diferentes quantidades de fragmentos de tecido paratireoideano em pacientes com HPS muito grave submetidos à PTx-AI. A PTx-AI esteve associada a um melhor controle dos DMO-DRC nessa coorte de pacientes. O número de fragmentos do AI não exerceu influência sobre o comportamento evolutivo dos níveis de PTH. Não observamos relação entre a carga cumulativa de Ca elemento e calcitriol administrados no período de fome óssea e efeitos sobre o funcionamento do AI. As características histológicas do tecido paratireoideano implantado, a expressão de proteínas e receptores, bem como parâmetros clínicos, demográficos e laboratoriais estudados não parecem influenciar o funcionamento do AI nessa coorte de pacientes com HPS muito grave. Ocorreu progressão significativa da calcificação vascular, potencialmente relacionada com a PTx, sobrecarga de Ca elemento e P. O uso de vitamina D, e a restrição de P podem modular a expressão de Klotho no tecido paratireóideo.

REFERÊNCIAS[#]

1. Eknoyan G, Lameire N, Barsoum R et al. The burden of kidney disease:improving global outcomes. *Kidney Int* , 2004; 66: 1310–14.
2. 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 International* 2009; 76 (Suppl 113): S1–S130.
3. Gutierrez O, Isakowa T, Rhee E, et al. Fibroblast Growth Factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2205:15.
4. Reichel H, Deibert B, Schmidt-Gayk H, et al. Calcium metabolism in early chronic renal failure: implications for the pathogenesis of hyperparathyroidism. *Nephrol Dial Transplant*. 1991;6:162-9.
5. Lenglet A, Liabeuf S, Guffroy P, et al. Use of nicotinamide to treat hyperphosphatemia in dialysis patients. *Drugs R D* 2013; 13:165-73.
6. Hu MC, Kuro-o M, Moe OW. Klotho and chronic kidney disease. *Contrib Nephrol* 2013; 180:47-63.
7. Koizumi M, Komaba H, Fukagawa M. Parathyroid function in chronic kidney disease: role of FGF23-Klotho axis. *Contrib Nephrol* 2013;180:110-23.

8. Galassi A, Bellasi A, Auricchio S, et al. Which vitamin D in CKD-MBD? The time of burning questions. *Biomed Res Int* 2013; 2013:864012.
9. Herrero JA, López-Gómez JM, Maduell F, et al. Activation of vitamin D receptors in the optimization of hyperparathyroidism secondary to dialysis. *Nefrologia* 2013; 33:571-84.
10. Gueiros JE, Hernandez FR, Karohl C, et al. Prevention and treatment of secondary hyperparathyroidism in CKD. *J Bras Nefrol.* 2011;33:197-204.
11. Oliveira RB, Silva EM, Charpinel DMF, et al. Situação do hiperparatireoidismo secundário autônomo no Brasil: dados do Censo Brasileiro de Paratireoidectomia. *J Bras Nefrol.* 2011; 33:457-2.
12. Young B, Heath JW, Stevens A, Burkitt HG. *Wheater's functional histology: a text and colour atlas* (5th ed.). Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier, 2006; p 337.
13. J. R. Gilmour. The normal histology of the parathyroid glands. *J Pathol Bacteriol* 2005; 48:187-222.
14. Sanderson PH, Marshall F, III Wilson RE. Calcium and phosphorus homeostasis in the parathyroidectomized dog : evaluation by means of ethylenediaminetetra acetate and calcium tolerance tests. *J Clin Invest* 1960; 39:662-70.

15. MacCallum WG, Voegtlin C. On the relation of tetany to the parathyroid glands and to calcium metabolism. *J Exptl Med* 1909; 11:118-51.
16. Brown EM, Gamba G, Riccardi D. Cloning and characterization of an extracellular $\text{Ca}(2+)$ -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*. 1993; 366(6455):575-80.
17. Moyses RMA, dos Reis LM, Jorgetti V. Distúrbios do cálcio e do fósforo. In *Bases fisiológicas da Nefrologia*. Zatz R (Ed.). Atheneu: São Paulo. 2011; pp 251-271.
18. Tatsumi S, Segawa H, Morita K, et al. Molecular cloning and hormonal regulation of Pit-1, a sodium-dependent phosphate cotransporter from rat parathyroid glands. *Endocrinology* 1998; 139:1692–9.
19. Ben Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, et al. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *J Clin Invest* 2007; 117: 4003–8.
20. Krajisnik T, Bjorklund P, Marsell R, et al. Fibroblast growth factor-23 regulates parathyroid hormone and 1 α -hydroxylase expression in cultured bovine parathyroid cells. *J Endocrinol* 2007; 195: 125–31.
21. Krajisnik T, Olauson H, Mirza MA, et al. Parathyroid Klotho and FGF-receptor 1 expression decline with renal function in hyperparathyroid patients with chronic kidney disease and kidney transplant recipients. *Kidney Int* 2010; 78:1024.

22. Komaba H, Goto S, Fujii H, et al. Depressed expression of Klotho and FGF receptor 1 in hyperplastic parathyroid glands from uremic patients. *Kidney Int* 2010; 77:232.
23. Bergstrand, H. Parathyreoideastudien II. *Acta med scand* 1921; 54:539.
24. Seifert G, Altenähr E. Pathology of primary, secondary and tertiary hyperparathyroidism. *Lebensversicher Med* 1969; 21:125-33.
25. Fukagawa M, Nakanishi S, Kazama JJ. Basic and clinical aspects of parathyroid hyperplasia in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2006; 102:S3-7.
26. Tominaga, Y. Mechanism of parathyroid tumorigenesis in uraemia. *Kidney Int.* 1999; 14(Suppl 14): 63-65.
27. Tominaga, Y; Takagi, H. Molecular genetics of parathyroid disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypert.* 1996; 5: 336-41.
28. Fukuda N, Tanaka H, Tominaga Y, et al. Decreased 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor density is associated with a more severe form of parathyroid hyperplasia in chronic uremic patients. *J Clin Invest* 1993; 92:1436-43.
29. Naveh-Many T, Rahamimov R, Livni N, Silver JJ. Parathyroid cell proliferation in normal and chronic renal failure rats. The effects of calcium, phosphate, and vitamin D. *Clin Invest* 1995; 96:1786-93.

30. Matsushita H, Hara M, Endo Y. Proliferation of parathyroid cells negatively correlates with expression of parathyroid hormone-related protein in secondary parathyroid hyperplasia. *Kidney Int* 1999; 55:130-8.
31. Hong YA, Choi DE, Lim SW, et al. Decreased parathyroid Klotho expression is associated with persistent hyperparathyroidism after kidney transplantation. *Transplant Proc* 2013; 45:2957-62.
32. Taniguchi M, Tokumoto M, Matsuo D, et al. Persistent hyperparathyroidism in renal allograft recipients: vitamin D receptor, calcium-sensing receptor, and apoptosis. *Kidney Int* 2006; 70:363-70.
33. Santos RO, Ohe MN, Abrahão M, Cervantes O. Fisiopatologia, Diagnóstico e Tratamento do Hiperparatireoidismo Secundário. In: Carvalho MB, editor. *Tratado de tireóide e paratireóides*. Rio de Janeiro: Rubio; 2007. p. 613-21.
34. Lucca LJ, de Freitas LCC. Paratireoidectomia – Atualização para o nefrologista. *J Bras Nefrol* 2008;30(Supl 1):51-6.
35. Tominaga Y, Matsuoka S, Uno N. Surgical and medical treatment of secondary hyperparathyroidism in patients on continuous dialysis. *World J Surg* 2009; 33:2335-42.
36. Montenegro FLM. Paratireoidectomia total com ou sem autotransplante no tratamento do hiperparatireoidismo secundário. São Paulo, 2000. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

37. Magnabosco FF, Tavares MR, Montenegro FL. Surgical treatment of secondary hyperparathyroidism: a systematic review of the literature. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2014; 58:562-71.
38. Wallfelt CH, Larsson R, Gylfe E, et al. Secretory disturbance in hyperplastic parathyroid nodules of uremic hyperparathyroidism: implication for parathyroid autotransplantation. *World J Surg* 1988; 12:431-8.
39. National Kidney Foundation: KDOQI Clinical Practice Guidelines for Bone Metabolism and Disease in Chronic Kidney Disease. *Am J Kidney Dis*. 2003; 42(suppl 3):S1-S20.
40. Wells SA Jr, Gunnells JC, Shelburne JD, et al. Transplantation of parathyroid glands in man: clinical indications and results. *Surgery* 1975; 78:34-44.
41. Caliseo CT, Lima Santos SR, Nascimento Jr. CP et al. Resultados funcionais do auto-implante de paratireóides em loja única no tratamento do hiperparatireoidismo secundário. *Rev Col Bras Cir* 2011; 38: 85-9.
42. Adragao T, Pires A, Lucas C, et al. A simple vascular calcification score predicts cardiovascular risk in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19:1480-8.
43. Akaberi S, Clyne N, Sterner G, et al. Temporal trends and risk factors for parathyroidectomy in the Swedish dialysis and transplant population - a nationwide, population-based study 1991 - 2009. *BMC Nephrol* 2014; 8;15:75.

44. Li S, Chen YW, Peng Y, et al. Trends in parathyroidectomy rates in US hemodialysis patients from 1992 to 2007. *Am J Kidney Dis.* 2011; 57:602-11.
45. Chertow GM, Block GA, Correa-Rotter R, et al. Effect of cinacalcet on cardiovascular disease in patients undergoing dialysis. *N Engl J Med* 2012; 367:2482-94.
46. Elder GJ. Parathyroidectomy in the calcimimetic era. *Nephrology (Carlton)* 2005; 10:511-5.
47. Okada M, Tominaga Y, Izumi K, et al. Tertiary hyperparathyroidism resistant to cinacalcet treatment. *Ther Apher Dial* 2011; 15 Suppl 1:33-7.
48. Goldenstein PT, Elias RM, Pires de Freitas do Carmo L, et al. Parathyroidectomy improves survival in patients with severe hyperparathyroidism: a comparative study. *PLoS One* 2013; 8:e68870.
49. Sharma J, Raggi P, Kutner N, et al. Improved long-term survival of dialysis patients after near-total parathyroidectomy. *J Am Coll Surg* 2012; 214:400-7;
50. Iwamoto N, Sato N, Nishida M, et AL. Total parathyroidectomy improves survival of hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *J Nephrol* 2012; 25: 755–63.
51. Chow KM, Szeto CC, Kum LC. Improved health-related quality of life and left ventricular hypertrophy among dialysis patients treated with parathyroidectomy. *J Nephrol* 2003; 16:878-85.

52. Nakayama K, Nakao K, Takatori Y. Long-term effect of cinacalcet hydrochloride on abdominal aortic calcification in patients on hemodialysis with secondary hyperparathyroidism. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2013; 7:25-33.
53. Ureña-Torres PA, Floege J, Hawley CM, et al. Protocol adherence and the progression of cardiovascular calcification in the ADVANCE study. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28:146-52.
54. Sampaio EA, Moysés RMA. Paratireoidectomia na DRC. *J Bras Nefrol*. 2011; 33(Supl 1):31-4.
55. de Oliveira RB, Moysés RM, da Rocha LA, et al. Adynamic bone disease. *J Bras Nefrol* 2011; 33:209-10.
56. Sakman G, Parsak CK, Balal M. Outcomes of Total Parathyroidectomy with Autotransplantation versus Subtotal Parathyroidectomy with Routine Addition of Thymectomy to both Groups: Single Center Experience of Secondary Hyperparathyroidism. *Balkan Med J* 2014; 31:77-82.
57. Cordeiro AC. Patologia Paratireóidea de Interesse Cirúrgico. In: Araujo Filho VJF, Brandão LG, Ferraz AR. Manual do residente de cirurgia de cabeça e pescoço. São Paulo: Keila & Rosenfeld; 1999. p. 83-8.
58. Ohe MN, Santos RO, das Neves MC, et al. Autotransplant tissue selection criteria with or

without stereomicroscopy in parathyroidectomy for treatment of renal hyperparathyroidism. *Braz J Otorhinolaryngol* 2014; 80:318-24.

59. Pitt SC, Panneerselvam R, Chen H, et al. Tertiary hyperparathyroidism: is less than a subtotal resection ever appropriate? A study of long-term outcomes. *Surgery* 2009; 146:1130-7.

60. Brasier AR, Nussbaum SR. Hungry bone syndrome: clinical and biochemical predictors of its occurrence after parathyroid surgery. *Am J Med* 1988; 84:654-60.

61. Silver J, Naveh-Many T. FGF23 and the parathyroid. *Adv Exp Med Biol* 2012; 728:92-9.

62. Latus J, Lehmann R, Roesel M. Analysis of α -klotho, fibroblast growth factor-, vitamin-D and calcium-sensing receptor in 70 patients with secondary hyperparathyroidism. *Kidney Blood Press Res* 2013; 37:84-94.

63. Yokoyama K, Taniguchi M, Fukagawa M. A Japanese approach for CKD-MBD. *Kidney Int Suppl* 2013; 3: 451–456.

ANEXO A

Artigo completo submetido para publicação.

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Nephrology Dialysis Transplantation*.

Manuscript ID: NDT-02028-2014

Title: The clinical impact of total parathyroidectomy with auto transplantation in refractory secondary hyperparathyroidism

Albuquerque, Roxana
Martin, Rita de Cássia
Massoni, Ledo
do Nascimento, Climério

Authors: Arap, Sérgio
Montenegro, Fabio
Moyses, Rosa
Jorgetti, Vanda
de Oliveira, Rodrigo

Date Submitted: 26-Dec-2014

Print

Return to Dashboard

This is the overview page

The clinical impact of total parathyroidectomy with auto transplantation in refractory secondary hyperparathyroidism

Journal:	<i>Nephrology Dialysis Transplantation</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original article - Clinical Science - Chronic kidney disease
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Albuquerque, Roxana; University of São Paulo, Department of Internal Medicine, Nephrology Division Martin, Rita de Cássia; University of São Paulo, Department of Internal Medicine, Nephrology Division Massoni, Ledo; University of São Paulo, Head and Neck Surgery Department do Nascimento, Climério; University of São Paulo, Head and Neck Surgery Department Arap, Sérgio; University of São Paulo, Head and Neck Surgery Department Montenegro, Fabio; University of Sao Paulo, Head and Neck Surgery; Moyses, Rosa; Universidade de São Paulo, Nephrology Division; Jorgetti, Vanda; University of Sao Paulo Medical School, Nephrology de Oliveira, Rodrigo; State University of Campinas (UNICAMP), Department of Internal Medicine - School of Medical Sciences, Nephrology Division ; University of São Paulo, Department of Internal Medicine, Nephrology Division
Keyword list:	CKD-MBD, chronic renal insufficiency, Parathyroidectomy, vitamin D, Klotho
Key Words:	hyperparathyroidism, secondary, Klotho protein, parathyroidectomy, renal insufficiency, chronic, vascular calcification, vitamin D

Campinas, December 26th, 2014.

Dr. C. Zoccali
Nephrol Dial Transplant Editor-in-Chief

Dear Dr. Zoccali,

We are submitting the manuscript entitled "The clinical impact of total parathyroidectomy with auto transplantation in refractory secondary hyperparathyroidism ". We hope that you will find it suitable for publication as an original research article in *Nephrology Dialysis Transplantation*.

Total parathyroidectomy with auto transplantation (PTx-AT) is an effective treatment for refractory secondary hyperparathyroidism (rSHP). However, clinical outcomes related to PTx-AT and factors which influence functioning of AT are not fully known. This prospective study evaluated clinical, biochemical and pathological parameters which influence functioning of AT, as well clinical outcomes 12 months post-PTx-AT, in a cohort of chronic kidney disease patients on hemodialysis who were underwent to PTx-AT with 45 or 90 parathyroid fragments. Original findings from our study suggest that vitamin D can modulates Klotho expression in parathyroid cells, serum alkaline phosphatase seems to be a better predictor of hungry bone syndrome than serum parathormone levels, and cumulative calcium load was potentially related to progression of vascular calcification.

Neither the manuscript nor any significant part of it is under consideration for publication elsewhere or has appeared elsewhere in a manner that could be construed as a prior or duplicate publication of the same, or very similar, work. All of the undersigned authors participated actively in the study, and the potential conflicts of interest are described at the end of the manuscript. All of the authors have read and approved the manuscript in its present form and have agreed to its submission to *Nephrology Dialysis Transplantation*.

Yours sincerely,

Rodrigo Bueno de Oliveira

Rodrigo Bueno de Oliveira, M.D., Ph.D.
State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.
Department of Internal Medicine, Nephrology Division.
rodrigobueno.hc@gmail.com

The clinical impact of total parathyroidectomy with auto transplantation
in refractory secondary hyperparathyroidism

Roxana F. C. Albuquerque¹, MD; Rita de Cássia T. Martin¹, Biologist;
Ledo Mazzei Massoni Neto², MD; Climério Pereira do Nascimento
Júnior², MD, PhD; Sérgio Samir Arap², MD, PhD; Fábio L. M.
Montenegro², MD, PhD; Rosa M. A. Moysés¹, MD, PhD; Vanda
Jorgetti¹, MD, PhD; and Rodrigo Bueno de Oliveira^{1,3}, MD, PhD.

¹Department of Internal Medicine, Nephrology Division, University of
São Paulo (USP), São Paulo, Brazil; ²Head and Neck Surgery
Department, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ³Department of
Internal Medicine - School of Medical Sciences, Nephrology Division
State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.

Correspondence: Rodrigo Bueno de Oliveira, Department of Internal
Medicine - School of Medical Sciences, Nephrology Division, State
University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil. Rua Tessália
Vieira de Camargo, nº 126, Cidade Universitária. Campinas, SP, Brazil.
Postal Code: 13083-887.

E-mail: rodrigobueno.hc@gmail.com Tel: +55 19 3521-8926.

Abstract

Background: Total parathyroidectomy with auto transplantation (PTx-AT) is an alternative treatment for refractory secondary hyperparathyroidism (rSHP). Clinical outcomes and factors which influence functioning of AT are not fully known. Clinical, biochemical and pathological parameters and its relations with PTx-AT were prospectively evaluated in a cohort of hemodialysis patients with rSHP.

Methods: 52 patients underwent to PTx-AT with 45 or 90 parathyroid fragments were followed during one year. Clinical, demographical, biochemical parameters and parathyroid expression of Klotho, vitamin D receptor (VDR), receptor-1 of fibroblast growth factor (FGFR1), calcium sensing receptor (CaSR), and PCNA were analyzed.

Results: At baseline, serum parathormone (PTH) and alkaline phosphatase (AP) levels were $1,770\pm 867\text{pg/ml}$ and 286UI/L (228-842), respectively; there were no differences between groups, except for phosphate (P) ($5.1\pm 1.1\text{mg/dl}$ vs. $3.8\pm 1.1\text{mg/dl}$; $p=0.009$). After one year, systemic PTH was according KDIGO recommendation in 12 patients. Duration of hungry bone correlated with baseline AP ($r^2=0.593$, $p=0.001$); Klotho with vitamin D dose pre-PTx ($r^2=0.811$, $p=0.027$) and baseline P ($r^2=-0.528$, $p=0.017$). Vascular calcification (VC) was correlated with baseline P ($r^2=0.503$; $p=0.028$) and cumulative calcium load ($r^2=0.605$, $p=0.006$).

Conclusions: PTx-AT controlled rSHP; baseline AP was a better predictor of hungry bone severity than PTH; P and cumulative calcium load were potentially related with worsening in progression of VC; the amount of transplanted parathyroid tissue, preoperative biochemical parameters, and PCNA, CaSR, VDR, FGFR1 or Klotho expression did not impact on systemic serum PTH levels or evolution of hypo- or normoparathyroidism. Vitamin D and P can regulate parathyroid Klotho expression.

Keywords: hyperparathyroidism, secondary; Klotho; parathyroidectomy;
renal insufficiency, chronic; vascular calcification; vitamin D.

For Peer Review

1
2
3 **Short summary**
4

- 5
6
7 • Total parathyroidectomy with auto transplantation (PTx-AT) is an
8 effective treatment for refractory secondary hyperparathyroidism
9 (rSHP). Clinical outcomes related to PTx-AT and factors which
10 influence functioning of AT are not fully known. The hypothesis
11 that the amount of parathyroid tissue used in PTx-AT (number of
12 parathyroid fragments) would exert different effects on long-term
13 serum parathormone (PTH) levels and clinical outcomes was not
14 formally tested;
15
16
- 17 • This prospective study evaluated clinical, biochemical and
18 pathological parameters which influence functioning of AT, as well
19 12 months post-PTx-AT clinical outcomes, in a cohort of chronic
20 kidney disease patients on hemodialysis, who were underwent to
21 PTx-AT of 45 or 90 parathyroid fragments;
22
23
- 24 • PTx-AT controlled rSHP; baseline serum alkaline phosphatase
25 levels was a better predictor of hungry bone syndrome severity
26 than serum PTH levels; phosphate (P) and cumulative calcium load
27 were potential related with worsening in VC post-PTx-AT; the
28 amount of transplanted parathyroid tissue, preoperative
29 biochemical parameters, and PCNA, CaSR, VDR, FGFR1 or
30 Klotho expression did not impact on systemic serum PTH levels or
31 evolution of hypo- or normoparathyroidism. Vitamin D and P can
32 regulate parathyroid Klotho expression.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

INTRODUCTION

Mineral and bone metabolism disorders related to chronic kidney disease (CKD-MBD) are a very common complications, which results in serious threats to life expectancy. Secondary hyperparathyroidism (SHP), one of the most important and well-recognized of these disorders, is associated to biochemical abnormalities, vascular calcification, and mortality [1-3].

Over the past decade marked improvement occurred in the clinical treatment of SHP. The introduction of vitamin D receptor activators and cinacalcet hydrochloride (HCl) led to a better control of SHP, followed by a significant of reduction of parathyroidectomy (PTx) rates in the globe [4, 5].

However, PTx remains as a useful therapeutic tool in the clinical setting of refractory SHP (rSHP) [6, 7]. Of note, in public healthcare systems from many countries paricalcitol or cinacalcet-HCl are not available yet. More important: PTx seems to improve survival in patients with refractory rSHP [7].

PTx is considered as a safe and effective treatment, but there is no consensus regarding which PTx modality is associated with better biochemical control, attenuation of vascular calcification and clinical improvement. Usually, the choice of PTx technique [i.e., subtotal PTx, total PTx, or total PTx with auto transplantation (PTx-AT)] depends on the surgeon preference and ability [8, 9]. From a clinical point of view, serum PTH levels post-PTx should be enough to overcome bone resistance to PTH and parathyroid resistance to fibroblast growth factor-23, observed in uremic patients.

To the best of our knowledge, the hypothesis that the amount of parathyroid tissue used in PTx-AT (number of parathyroid fragments)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

would exert different effects on long-term systemic PTH levels and clinical outcomes was not formally tested. Similarly, the relation between parathyroid tissue abnormalities, biochemical, clinical and demographical characteristics and its relation with AT function are not fully known yet.

The importance of these observations become clinically evident taking into account the recommended systemic PTH levels by KDIGO (i. e., between 2 and 9x the superior limit of the reference range): expressive proportion of patients treated with PTx-AT develop hypoparathyroidism and potentially bone adynamic disease [10-13].

The objectives of the present prospective study were to evaluate clinical outcomes (including vascular calcification and one-year mortality) in a cohort of CKD patients with rSHP who were underwent to PTx-AT with 45 or 90 parathyroid fragments. The influence of parathyroid tissue abnormalities were controlled by analyzing parathyroid expression of PCNA, calcium sensing receptor (CaSR), vitamin D receptor (VDR), receptor-1 of fibroblast growth factor (FGFR1) and Klotho were evaluated.

SUBJECTS AND METHODS

Study design

This prospective study was performed in CKD patients with rSHP. From January 2012 to July 2013, 52 adults, clinically stable patients on hemodialysis (HD), attended by the CKD-MBD outpatient clinic in the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), were select to perform total PTx with AT (PTx-AT) with 45 (Group-45) or 90 (Group-90) parathyroid fragments. The minimum follow-up was 12 months.

Exclusion criteria were severe intercurrents on post-operative period (i. e., prolonged hypotension, septic shock or hemorrhagic), skin infection at the site of the AT surgery, and loss of follow-up due to kidney transplantation, new AT surgery with cryopreserved fragments of parathyroid glands or study abandonment.

This study was approved by the Ethical and Research Committee of HC-FMUSP, under number 0882/2011 and 00828412.8.0000.0068. Informed consent was obtained from all patients and the study was performed in accordance with the precepts of the Declaration of Helsinki.

Definitions and outcomes

Hungry bone syndrome duration was defined as the period immediately after PTx until the moment when serum AP levels reached the reference range. Calcitriol cumulative load and cumulative elemental Ca load were registered from the first day post-PTx until the ending of hungry bone syndrome or end of follow-up. Bone pain was defined as an unpleasant deep and intense sensorial experience, localized on the major part of skeleton, which led to analgesic use in most part of the days during a week.

The evolutive condition related to AT parathyroid function at 12 months post-PTx was defined on the basis of systemic PTH levels. Three categories were considered: normoparathyroidism, defined as having serum systemic PTH levels between 130 and 585 pg/ml (i. e., between 2 and 9x the superior limit of reference range), hypoparathyroidism, PTH <130 pg/mL, and hyperparathyroidism, PTH >585 pg/mL.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Surgical procedures

PTx was performed according to a modification of Wells technique [10, 14], which consists in total removal of parathyroid glands, followed by immediate AT of parathyroid fragments (approximately 2 mm² each one) in one or two pockets under the fascia of brachiorradialis muscle in the forearm without the vascular access.

Parathyroid tissue without macroscopic evidence of nodular areas was selected for AT proposal. In some cases, only nodular tissue was available. A representative sample of tissue from all parathyroids found at the operation were sent to frozen section and paraffin embed slides.

Laboratory measurements

Blood samples were collected at baseline (before PTx) and during the follow-up, according: weekly on the first month, twice per month on second month, once or twice per month on third month, once per month from forth to sixth month, and once per trimester until to complete one year of follow-up. They were used for measurements of serum ionic calcium (iCa), phosphate (P), alkaline phosphatase (AP), vitamin D (calcidiol) and PTH levels. For PTH evaluation post-PTx, blood samples were collected in both forearms. We considered PTH produced by AT parathyroid fragments as one obtained from blood collected in a superficial vein apparently draining AT area. Systemic PTH was considered from contralateral AT forearm. Serum PTH levels were evaluated by electroquimioluminescence method (reference range: 15 to 65 pg/mL).

Imaging studies

Vascular calcification was evaluated from plain films of hands and hips. We quantify vascular calcification using a simple score proposed by Adragão *et al* [15]. The Adragão's score ranges from 0 to 8 points. Patients were also classified as having <3 or ≥ 3 points of the same score. The images were obtained 24 months pre- and post-PTx. The same observer performed all analyzes.

Histological and immunochemistry analysis

The tissue architecture of the parathyroid gland was classified as predominantly "diffuse" or "nodular" hyperplasia, using the same criteria of a previous study [16]. Immunochemistry for PCNA, CaSR, VDR, FGFR1 and Klotho were performed using part of parathyroid gland used in AT. Primary antibodies, dilution and pre-treatment processing samples are as follows:

- PCNA, anti-mouse (Clone PC10, DakoCytomation, Glostrup, Denmark); 1:100; labeled streptavidin-biotin;
- CaSR, anti-mouse (Thermo Scientific, Illinois, USA); 1:1.000; vectastain ABC, complex avidin/biotin-alkalin phosphatase;
- VDR, anti-rat (Thermo Scientific, Illinois, EUA), 1:500; vectastain ABC, horseradish-peroxidase (HRP), complex avidin/biotin;
- FGFR1, anti-rabbit (Flg C-15, Santa Cruz, Temecula, CA, EUA), 1:600; labeled streptavidin-biotin;
- Klotho, anti-mouse, produced in goat (BA-9500, Vector, Burlingame, CA, EUA); 1:1000; vectastain ABC, horseradish-peroxidase (HRP), complex avidin/biotin.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Cells which expressed PCNA and VDR were counted using magnification of 400x, which approximately reflects an area of 0.2376 mm²; 20 fields per sample were analyzed. Mean or median values were expressed as positive cells per field. Microscope Nikon Eclipse 50i was used.

Expression of CaSR, FGFR1 and Klotho were evaluated with the same magnification. We registered 20 photos of consecutive fields with digital camera Nikon Digital Sight and the software NIS-elements F Program, version 2.30 (Nikon Instruments, Inc., Melville, NY, USA). Positive marked areas in each field were quantified automatically by the software Image ProPlus Program, version 7.0 (MediaCybernetics, Inc., Rockville, MD, USA).

The numbers of samples of parathyroid tissue used for immunochemistry preparation in each group were somewhat variable due to technical problems with tissue sample processing. Twelve to 25 samples in Group-45, and 7 to 8 in Group-90 were analyzed.

Statistical analysis

All data are expressed as mean ± SD for normally distributed data, median (minimum to maximum, or interquartile interval) for skewed data, and frequency (%) for categorical data. Comparisons between continuous variables, skewed data and categorical variables were made using the t-test, Mann-Whitney and chi-square test, respectively. Spearman's rank correlations were used to summarize associations. Statistical analysis was performed using SPSS-16.0 (SPSS Inc, Chicago, USA). A two-sided P value <0.05 was considered significant.

Results

Patients and follow-up

At baseline fifty two patients were selected in two groups according the number of parathyroid fragments used in AT: 45 (Group-45) and 90 (Group-90). During the follow-up 16 patients were excluded: one (Group-45) due to new AT surgery with cryopreserved parathyroid fragments, one (Group-90) with SHP persistence due to ectopic parathyroid gland, four (two patients Group-45, and two patients Group-90) because of kidney transplantation, and nine (five patients Group-45, and 4 patients Group-90) due to abandonment of the follow-up before one year. One patient (Group-45) died due abdominal sepsis. Mortality rate was 2.7 deaths for 100 patients-year. Thirty six patients have completed the study: 28 in Group-45, and 8 in Group-90.

BASELINE STUDIES

Demographic, clinical, general biochemistry and imaging study findings

Except for serum P levels, both groups were similar at baseline (Table 1), indicating that patient selection was balanced. All patients performed hemodialysis (HD) with dialysate Ca concentration of 3.5 mEq/L. Hyperphosphatemia was treated in the majority of patients (22, 59%) with sevelamer hydrochloride. Two patients were in use of Ca carbonate (5.5%); intermittent intravenous calcitriol was used in 7 patients (19.4%), and twelve (33%) were in use of native vitamin D. Only one patient from Group-45 had a brown tumor based on imaging study.

We observed negative correlations between serum calcidiol levels and body mass index (BMI) ($r^2=-0.55$; $p=0.034$), and between calcidiol and alkaline phosphatase (AP) ($r^2=-0.595$; $p=0.002$). There was a positive

correlation between serum AP and PTH levels ($r^2=0.503$; $p=0.002$), AP and BMI ($r^2=0.434$; $p=0.039$). Age presented a positive correlation with vascular calcification score ($r^2=0.378$; $p=0.047$), and time on HD ($r^2=0.404$; $p=0.015$).

Histological and immunochemistry findings

The samples were classified as having predominantly diffuse hyperplasia in 24 patients (65%). The type of hyperplasia did not shown correlation with evolution at 12 months post-PTx-AT (namely, hypo- or normoparathyroidism) ($p=0.292$), serum PTH ($p=0.09$) and AP levels ($p=0.529$), duration of hungry bone syndrome ($p=0.582$), and PCNA ($p=0.374$), CaSR ($p=0.704$), VDR ($p=0.197$), FGFR1 ($p=0.243$) and Klotho expression pattern ($p=0.105$).

Immunocytochemistry analysis of parathyroid tissue used in AT revealed that the mean or median of PCNA, CaSR, VDR, FGFR1 and Klotho expression pattern did not shown differences between the groups (Table 2). Figures 1 show the immunocytochemistry expression pattern of Klotho.

POST-TREATMENT STUDIES (12 months post-PTx-AT)

Demographic, clinical, general biochemistry and imaging study findings

There were no significant differences between the groups related to serum total Ca (TCa), ionized Ca (iCa), P, AP, PTH from AT area, systemic PTH, calcidiol levels, cumulative elemental Ca load, and calcitriol load. In the same direction, we did not observe differences in the duration or persistence of hungry bone syndrome, pathological bone fractures rate,

1
2
3 persistence of bone pain, vascular calcification or improvement of clinical
4
5 *status* (Table 3).

6
7 We observed correlations between serum PTH from AT area and
8
9 systemic PTH levels ($r^2=0.646$; $p=0.0001$), PTH from AT area with
10
11 baseline iCa and TCa ($r^2=0.556$; $p=0.002$; $r^2=0.442$; $p=0.016$,
12
13 respectively). Systemic PTH was also correlated to serum baseline iCa
14
15 levels ($r^2=0.450$; $p=0.008$). We did not observed significant correlations
16
17 between serum systemic PTH levels with cumulative elemental Ca or
18
19 calcitriol load, P, AP, duration of hungry bone syndrome or tissue
20
21 expression pattern of PCNA, CaSR, VDR, FGFR1 and Klotho.

22
23 Duration of hungry bone syndrome was correlated with serum
24
25 baseline AP levels ($r^2=0.593$; $p=0.001$), and AP 12 months post-PTx-AT
26
27 ($r^2=0.656$; $p=0.001$), but not with serum PTH, Ca, P, calcidiol levels or
28
29 parathyroid expression pattern of PCNA, CaSR, VDR, FGFR1 and
30
31 Klotho. AP 12 months post-PTx-AT showed correlation with time on
32
33 hemodialysis ($r^2=0.347$, $p=0.045$).

34
35 VDR expression on parathyroid cells was negatively correlated to
36
37 serum baseline Cai ($r^2=-0.464$; $p=0.007$), iCa and TCa levels at the end of
38
39 follow-up ($r^2=0.410$; $p=0.018$; $r^2=0.358$; $p=0.044$, respectively), and with
40
41 cumulative elemental Ca load ($r^2=-0.359$; $p=0.04$). CaSR expression was
42
43 negatively correlated to cumulative calcitriol load ($r^2=-0.445$; $p=0.049$).

44
45 We detected a positive correlation between Klotho expression and
46
47 vitamin D dose pre-PTx-AT ($r^2=0.811$; $p=0.027$), and with baseline
48
49 serum P levels ($r^2=-0.528$; $p=0.017$). FGFR1 expression was correlated to
50
51 baseline serum AP levels ($r^2=-0.758$; $p=0.0001$). PCNA expression was
52
53 correlated with time on hemodialysis ($r^2=0.437$; $p=0.016$), and baseline
54
55 serum TCa levels ($r^2=0.454$; $p=0.015$).

56
57 Vascular calcification score post-PTx-AT showed positive
58
59 correlation with cumulative elemental Ca load ($r^2=0.605$; $p=0.006$),
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

baseline P ($r^2=0.503$; $p=0.028$), and vascular calcification score at baseline ($r^2=0.575$; $p=0.02$). We observed progression of vascular calcification score between baseline and at the end of the follow-up [0.53 (0 to 4) vs. 1.1 (0 to 8), $p=0.04$]; no differences between the groups were detected. Take into account patients who were classified as having score <3 or ≥ 3 points and the cumulative elemental Ca load, mean comparison shown significant difference ($4,411.8 \pm 3,484.1$ g vs. $18,020 \pm 11,553.9$; $p = 0.023$).

Considering evolution for hypo- or normoparathyroidism at 12 months post-PTx-AT, mean comparison did not show any differences in terms of clinical, biochemical and histological characteristics. We did not observe the occurrence of recurrent hyperparathyroidism.

The Table 4 shows the frequency of patients with biochemistry findings on the recommended therapeutic range, at baseline and 12 months post-PTx-AT, of all patients and divided by groups.

Discussion

Our study shows three main findings: First, PTx-AT controlled rSHP, regardless of the number of parathyroid fragments used in AT. This is expressed by total remission of bone pain, significant biochemical improvement, low occurrence of complications and mortality; however, we observed a possible worsening of progression of vascular calcification, potentially related to cumulative elemental Ca load. Second, serum PTH levels or evolution of hypo- or normoparathyroidism were not influenced by the number of parathyroid fragments used in AT, biochemical and clinical parameters, nor by the expression in parathyroid cells of PCNA, CaSR, VDR, FGFR1 or Klotho. Third, for the first time,

we were able to demonstrate that vitamin D can modulate Klotho expression in the parathyroid tissue from patients with rSHP.

It has been postulated that uremic patients have a condition of FGF23 and PTH resistance, due to decrease of Klotho expression in the parathyroid glands and PTH receptors in bone tissue [17-19]; accordingly, these patients would require a higher serum concentration of PTH and FGF23 to counteract this situation, in order to keep an adequate mineral homeostasis and bone remodeling [20]. Based on this adaptive response, a supraphysiological serum concentrations of PTH (precisely, between 2 and 9x the superior limit of reference range) has been recommended by specialists [13]. At least in theory, serum systemic PTH levels post-PTx must be within this range.

Some authors argue that current limitation in the measurement of effective PTH in circulation makes this interval so wide. Besides the known variation attributed to different commercial kits, oxidized molecules of PTH may falsely reflect parathyroid action on bone [21].

To the best of our knowledge this is the first study to test the hypothesis of different mass from parathyroid tissue used in PTx-AT would exert different effects on clinical outcomes. Even if AT function were not different among the two observed groups, PTx-AT by itself resulted in clinical improvement, bone pain eradication, better control of P (24% vs. 8%), Ca (24% vs. 0%), systemic PTH (0% vs. 32%), and low one year-mortality (2.7 deaths per 100 patient-year). For comparison, Goldstein *et al.* reported on a mortality rate of 16 deaths per 100 patient-years in a retrospective study, which made a comparison between patients with rSHP who were or not submitted to PTx-AT [7].

In opposition to these above mentioned general improvement, we observed a possible worsening of progression of vascular calcification, potentially related to cumulative elemental Ca load. This finding should

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

be interpreted with extreme caution, since takes into account vascular calcification data obtained from plain films, in a variable time from surgery. However, despite plain films are not considered as a gold-standard method for evaluation of vascular calcification progression, some authors claim this simple and non-expensive method as a useful tool, able to detect its progression [22]. Of note, it is a really possible to expect that patients who had received around 4.5 kilograms of elemental Ca in one year, experienced acceleration in their progression of vascular calcification, mainly in the setting of hypoparathyroidism developed after hungry bone period [23, 24].

Almost 50 years ago Gittes *et al.* examined the effects of number of transplanted isologues parathyroid glands on Ca homeostasis, in an experimental model for primary hyperparathyroidism. The authors observed that 20, 40 or 80 transplanted healthy parathyroid glands in thyroparathyrectomized rats with normal renal function and under constant Ca diet, led to an equal magnitude increase in calcemia [25]. At that time PTH measurement was not possible. A possible explanation, at least partial, is that there is a logarithmic relationship between implanted parathyroid mass and the amount of secreted PTH: from a certain mass, the increase in PTH production becomes minimal.

Another possibility to explain the lack of relationship between parathyroid mass used in PTx-AT and its function observed in this study, is that the severity of the disease present in parathyroid tissue should be a more important factor than the amount of tissue used in AT. In patients who were included in our study have extremely high serum PTH levels. Of note, Japanese specialists recommend to perform PTx in earlier stage of the disease compared to other guidelines [26, 13].

We believe that disease severity observed in this cohort was the main factor which impacts a possible detection of relation between AT

function and number of fragments, severity of cellular hyperplasia and receptor/protein profile of expression in parathyroid tissue. Disease severity should also explain the evolution for hypoparathyroidism observed in 68% of our sample, despite 45 or 90 parathyroid fragments used in AT.

Finally, for the first time we described that native vitamin D can modulate Klotho expression in human parathyroid glands, in a dose dependent manner. Klotho modulation by vitamin D was described in studies using animal models and *in vitro* experiments. Lau et al. demonstrated that Klotho and osteopontin were upregulated by agonists of VDR independent of changes in serum PTH and Ca levels, in a mouse CKD model where dietary P loading induced aortic medial calcification [27]. Krajisnik et al. reported on that bovine parathyroid cells treated with vitamin D active compounds can increase the expression of Klotho [28].

The possible mechanism of positive Klotho modulation by vitamin D is not known yet. One possibility is that vitamin D could act to reduce DNA methyltransferase (DNMT) protein expression. DNMT is involved in the silencing of Klotho through hypermethylation induced by uremic toxin accumulation [29-31]. If this hypothesis is correct, vitamin D therapy can ameliorates the FGF23 resistance, and contributes do decrease PTH syntheses by parathyroid cells.

This study has several limitations. First, we have studied a relatively small number of patients, with rSHP. Second, the design of our study, as well our data, does not allow us to drive definitive conclusions about vascular calcification and mortality. We did not perform an analysis of the molecular mechanisms of vitamin D action and Klotho modulation by parathyroid cells.

In conclusion, our findings suggest that PTx-AT controlled rSHP, although we observed a possible worsening of progression of vascular

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

calcification, potentially related to cumulative elemental Ca load, as a consequence of PTx. Serum PTH levels or post-PTx-AT evolution for hypo- or normoparathyroidism were not influenced by the number of parathyroid fragments, histological type of hyperplasia, biochemical parameters, nor PCNA, CaSR, VDR, FGFR1 or Klotho expression in parathyroid cells. Vitamin D can modulate Klotho expression in human parathyroid glands. The clinical effects of these findings should be clarified in future studies.

Acknowledgments

The authors acknowledge Fabiana G. Graciolli, Luciene Machado dos Reis, Ivone B. Oliveira and Wagner Vasques Dominguez for the technical assistance during the experiments of this study. This study received financial support in the form of grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Foundation for the Support of Research in the State of São Paulo, Brazil).

REFERENCES

1. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, *et al.* Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:2208–2218
2. Covic A, Kothawala P, Bernal M, *et al.* Systematic review of the evidence underlying association between mineral metabolism disturbances and risk of all-cause mortality, cardiovascular mortality and cardiovascular events in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 24:1506–1523
3. Tentori F, Blayney MJ, Albert JM, *et al.* Mortality risk for dialysis with different levels of serum calcium, phosphorus and PTH: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Am J Kidney Dis* 2008; 52:519–530
4. Akaberi S, Clyne N, Sterner G, *et al.* Temporal trends and risk factors for parathyroidectomy in the Swedish dialysis and transplant population - a nationwide, population-based study 1991 - 2009. *BMC Nephrol* 2014; 15:75
5. Li S, Chen YW, Peng Y, *et al.* Trends in parathyroidectomy rates in US hemodialysis patients from 1992 to 2007. *Am J Kidney Dis*. 2011; 57:602-611
6. Okada M, Tominaga Y, Izumi K, *et al.* Tertiary hyperparathyroidism resistant to cinacalcet treatment. *Ther Apher Dial* 2011; 15 Suppl 1:33-37
7. Goldenstein PT, Elias RM, Pires de Freitas do Carmo L, *et al.* Parathyroidectomy improves survival in patients with severe hyperparathyroidism: a comparative study. *PLoS One* 2013; 8:e68870

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

8. Magnabosco FF, Tavares MR, Montenegro FL. Surgical treatment of secondary hyperparathyroidism: a systematic review of the literature. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2014; 58:562-571

9. Sampaio EA, Moysés RMA. Parathyroidectomy in CKD. *J Bras Nefrol.* 2011; 33(Suppl 1):31-34

10. Caliseo CT, Lima Santos SR, Nascimento Jr. CP, *et al.* Resultados funcionais do auto-implante de paratireóides em loja única no tratamento do hiperparatireoidismo secundário. *Rev Col Bras Cir* 2011; 38: 85-89

11. Ohe MN, Santos RO, das Neves MC, *et al.* Autotransplant tissue selection criteria with or without stereomicroscopy in parathyroidectomy for treatment of renal hyperparathyroidism. *Braz J Otorhinolaryngol* 2014; 80:318-324

12. Pitt SC, Panneerselvan R, Chen H, *et al.* Tertiary hyperparathyroidism: is less than a subtotal resection ever appropriate? A study of long-term outcomes. *Surgery* 2009; 146:1130-1137

13. 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 International* 2009; 76 (Suppl 113): S1–S130

14. Wells SA Jr, Gunnells JC, Shelburne JD, *et al.* Transplantation of parathyroid glands in man: clinical indications and results. *Surgery* 1975; 78:34-44

15. Adragao T, Pires A, Lucas C, *et al.* A simple vascular calcification score predicts cardiovascular risk in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19:1480-1488

16. Custódio MR, Montenegro FL, Costa AF, *et al.* MIBI scintigraphy, indicators of cell proliferation and histology of parathyroid glands in uraemic patients. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20:1898-1903
17. Fukagawa M, Kazama JJ, Shigematsu T, *et al.* Skeletal resistance to pth as a basic abnormality underlying uremic bone diseases. *Am J Kidney Dis* 2001; 38: S152–S155
18. Fukagawa M, Iwasaki Y, Kazama JJ, *et al.* Skeletal resistance to parathyroid hormone as a background abnormality in uremia. *Nephrology (Carlton)* 2003; 8(Suppl): S50–S52
19. Silver J, Naveh-Many T. FGF23 and the parathyroid. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 728:92-99
20. Iwasaki Y, Yamato H, Nii-Kono T, *et al.* Insufficiency of PTH action on bone in uremia. *Kidney Int Suppl* 2006; 102:S34-36
21. Tepel M, Armbruster FP, Grön HJ, *et al.* Nonoxidized, biologically active parathyroid hormone determines mortality in hemodialysis patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98:4744-4751
22. Noordzij M, Cranenburg EM, Engelsman LF, *et al.* Progression of aortic calcification is associated with disorders of mineral metabolism and mortality in chronic dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2011; 26:1662–1669
23. Jean G, Lataillade D, Genet L, *et al.* Association between very low PTH levels and poor survival rates in haemodialysis patients: results from the French ARNOS cohort. *Nephron Clin Pract* 2011; 118:c211-216
24. Wang AY. Calcium balance and negative impact of calcium load in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int* 2014; 34:345-452
25. Gittes RF, Radde IC. Experimental model for hyperparathyroidism: effect of excessive number of transplanted isologous parathyroid glands. *J Urol* 1966; 95:595-603

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

26. Yokoyama K, Taniguchi M, Fukagawa M. A Japanese approach for CKD-MBD. *Kidney Int Suppl* 2013; 3: 451–456

27. Lau WL, Leaf EM, Hu MC, *et al.* Vitamin D receptor agonists increase klotho and osteopontin while decreasing aortic calcification in mice with chronic kidney disease fed a high phosphate diet. *Kidney Int.* 2012; 82:1261-1270

28. Krajisnik T, Olauson H, Mirza MA, *et al.* Parathyroid Klotho and FGF-receptor 1 expression decline with renal function in hyperparathyroid patients with chronic kidney disease and kidney transplant recipients. *Kidney Int* 2010; 78:1024

29. Paubelle E, Zylbersztejn F, Alkhaeir S, *et al.* Deferasirox and vitamin D improves overall survival in elderly patients with acute myeloid leukemia after demethylating agents failure. *PLoS One* 2013;8:e65998

30. Stefanska B, Salamé P, Bednarek A, *et al.* Comparative effects of retinoic acid, vitamin D and resveratrol alone and in combination with adenosine analogues on methylation and expression of phosphatase and tensin homologue tumour suppressor gene in breast cancer cells. *Br J Nutr* 2012; 107:781-790

31. Young GH, Wu VC. Klotho methylation is linked to uremic toxins and chronic kidney disease. *Kidney Int* 2012; 81:611-612

Table 1. Baseline demographic, clinical, biochemistry, and imaging study findings of all patients and divided by groups, according the number of parathyroid fragments used in auto transplant.

Parameter	All (N=36)	Group-45 (N=28)	Group-90 (N=8)	P
Age (years)	49 ± 11	48 ± 10	50 ± 14	0.73
Gender (women, %)	19 (53)	17 (47)	2 (5)	0.69
Race (white, %)	19 (53)	14 (39)	5 (14)	0.46
CKD etiology (N)				0.59
Hypertension	17	14	3	
<i>Diabetes mellitus</i>	2	2	0	
Glomerulonephritis	13	9	4	
Polycystic kidney disease	2	1	1	
Time on hemodialysis (months)	90.6 ± 38.8	88.4 ± 35.5	99 ± 51	0.60
Pre-PTx Vitamin D use (N, %)	14 (39)	10 (28)	4 (11)	0.70
Vitamin D dose (IU/week)	14,571 ± 7,176	12,600 ± 7,456	16,000 ± 6,733	0.57
Pre-PTx fracture (N, %)	2 (6)	1 (3)	1 (3)	0.40
Bone pain (N, %)	27 (75)	20 (55)	7 (19)	0.65
Vascular calcification score (AU)	0.53 (0 to 4)	0.65 (0 to 4)	0	0.20
Body mass index (kg/m ²)	25 ± 4	25.5 ± 4.4	24 ± 3.8	0.50
Ionic Calcium (mEq/L)	5 ± 0.8	5 ± 0.8	5 ± 0.8	0.94
Total Calcium (mg/dl)	9.6 ± 0.7	9.6 ± 0.6	9.6 ± 0.9	0.87
Phosphate (mg/dl)	4.8 ± 1.2	5.1 ± 1.1*	3.8 ± 1.1	0.009
Parathormone (pg/ml)	1,770 ± 867	1,832 ± 840	1,551 ± 992	0.42
Alkaline phosphatase (IU/L)	286 (228 to 842)	307 (234 to 873)	282 (142 to 392)	0.32
Calcidiol (ng/dl)	23 ± 11	23.4 ± 11.6	20.2 ± 8.4	0.5

CKD, chronic kidney disease; PTx, parathyroidectomy; AU, arbitrary units; IU, international units; N, number. Data expressed in medium ± SD, medium ± minimum to maximum, or median and interquartile intervals (25th-75th). *p = 0.009 Group-45 vs. Group-90.

Table 2. Baseline proteins and receptor expression pattern evaluated by immunochemistry in parathyroid tissue, in all patients and divided by groups, according to number of parathyroid fragments used in auto transplant.

Parameter	All	Group-45	Group-90	P
Diffuse hyperplasia (N, %)	24 (65)	17 (46)	7 (19)	0.44
PCNA (cells/field)	7.6 (3.4 to 18)	7.2 (3.4 to 18)	10.6 (3.4 to 29)	0.56
CaSR (%/field)	20.7 ± 13.5	17.3 ± 12.3	27.7 ± 14	0.79
VDR (cell/field)	5.9 (1 to 10.6)	6.1 (1 to 10.7)	4.6 (1 to 9.5)	0.56
FGFR1 (%/field)	19 ± 9.4	16.2 ± 10	23.5 ± 6.9	0.21
Klotho (%/field)	0.11 (0.02 to 2.53)	0.1 (0.02 to 1.3)	0.95 (0.02 to 4.7)	0.43

PCNA, proliferating cell nuclear antigen; CaSR, Calcium sensing receptor; VDR, vitamin D receptor; FGFR1, receptor-1 of fibroblast growth factor; N, number. Data expressed in mean ± SD or median and interquartile intervals (25th to 75th) relative to percentage of marked tissue by field (magnification of 400x).

Table 3. Demographic, clinical, biochemistry, and imaging study findings at 12 months post-PTx-AT, in all patients and divided by groups, according to the number of parathyroid fragments used in auto transplant.

Parameter	All (N=36)	Group-45 (N=28)	Group-90 (N=8)	P
Post-PTx fracture (N, %)	1 (3)	1 (3)	0 (0)	0.78
Post-PTx bone pain (N, %)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA
Vascular calcification score (AU)	1.1 (0 to 8)	1.3 (0 to 8)	0.5 (0 to 2)	0.66
Duration of bone hungry syndrome (days)	182 ± 134	200 ± 141	118 ± 81	0.12
Persistence of bone hungry syndrome (n, %)	7 (19)	6 (16)	1 (3)	0.46
Hypoparathyroidism (N, %)	23 (64)	19 (53)	4 (11)	0.23
Normoparathyroidism (N, %)	12 (33)	8 (22)	4 (11)	0.25
Ionic calcium (mEq/L)	4.3 ± 0.5	4.3 ± 0.5	4.2 ± 0.5	0.70
Total calcium (mg/dl)	8.3 ± 1	8.3 ± 1	8.4 ± 0.9	0.74
Phosphate (mg/dl)	4.0 ± 1.2	4.0 ± 1.3	4.1 ± 0.7	0.79
Alkaline phosphatase (IU/L)	89.5 (62 to 123)	91.5 (68 to 123)	59 (50 to 127)	0.25
Calcidiol (ng/ml)	32.3 ± 10.4	31.4 ± 10.7	34.7 ± 10.2	0.53
PTH-AT (pg/ml)	1,657 ± 1,914	1,585 ± 1,848	1,945 ± 2,330	0.69
Systemic PTH (pg/ml)	125 ± 105	113 ± 92	163 ± 143	0.25
Cumulative calcitriol load (µg)	386 ± 276	375 ± 269	423 ± 316	0.67
Cumulative elemental calcium load (g)	4,398 (1,932 to 8,400)	5,292 (1,588 to 9,518)	2,795 (1,932 to 5,830)	0.37

AT, auto transplant; NA, not applicable; PTH, parathormone; PTx, parathyroidectomy; AU, arbitrary units; IU, international units; N, number. Data expressed in mean ± SD, mean ± minimum to maximum, or median and interquartile intervals (25th to 75th).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

Table 4. Biochemistry findings and its relation with KDIGO recommended therapeutic ranges, at the baseline and 12 months post-PTx-AT, in all patients and divided by groups, according number of parathyroid fragments used in auto transplant.

	All (N=36)	Group-45 (N=28)	Group-90 (N=8)	P
<i>Baseline</i>				
Total calcium ≥ 10,2 (mg/dl) (n, %)	9 (24)	7 (19)	2 (5)	1.00
Phosphate ≥ 5,5 mg/dl (n, %)	9 (24)	9 (24)	0 (0)	0.08
Parathormone ≥ 2 e ≤ 9x*	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA
Calcidiol deficiency (n, %)	12 (33)	9 (25)	3 (8)	0.64
Calcidiol insufficiency (n, %)	9 (25)	7 (20)	2 (5)	1.00
<i>12 months post-PTx-AT</i>				
Total calcium ≥ 10,2 (mg/dl) (N, %)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA
Phosphate ≥ 5,5 mg/dl (N, %)	3 (8)	3 (8)	0 (0)	0.56
Parathormone ≥2 to ≤9x* (N, %)	12 (32)	8 (22)	4 (10)	0.44
Calcidiol deficiency (N, %)	13 (36)	10 (28)	3 (8)	0.47
Calcidiol insufficiency (N, %)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	NA

AT, auto transplant; NA, not applicable; *, superior limit of reference range for the method. Data expressed in frequency and percentage of occurrence.

Legends to figures

Figure 1. Klotho expression pattern by immunochemistry. A (100x) and B (400x, detail: 1000x), diffuse hyperplasia. C (100x) and D (400x, detail: 1000x) nodular hyperplasia.

For Peer Review

Figure 1.

Figure 1. Klotho expression pattern by immunohistochemistry. A (100x) and B (400x, detail: 1000x), diffuse hyperplasia. C (100x) and D (400x, detail: 1000x) nodular hyperplasia.
166x125mm (96 x 96 DPI)