Rodrigo Azevedo de Oliveira

Avaliação do metabolismo mineral de pacientes com doença renal crônica em diálise peritoneal: correlação entre parâmetros clínicos, bioquímicos e de histologia óssea

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

Programa de Nefrologia

Orientadora: Dra. Vanda Jorgetti

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
©reprodução autorizada pelo autor

Oliveira, Rodrigo Azevedo de

Avaliação do metabolismo mineral de pacientes com doença renal crônica em diálise peritoneal : correlação entre parâmetros clínicos, bioquímicos e de histologia óssea / Rodrigo Azevedo de Oliveira. -- São Paulo, 2014.

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

Programa de Nefrologia.

Orientadora: Vanda Jorgetti.

Descritores: 1.Diálise peritoneal/efeitos adversos 2.Diálise renal 3.Osteodistrofia renal 4.Insuficiência renal crônica 5.Remodelação óssea 6.Hormônio paratireóideo 7.SOST proteína humana 8.Peptídeos e proteínas de sinalização intercelular

USP/FM/DBD-052/14

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Marcelo e Cleide, que sempre me incentivaram a trilhar os caminhos dos estudos e que são o meu grande exemplo de honestidade, companheirismo e dedicação aos filhos.

Às minhas irmãs, Cristina e Beatriz, que mesmo à distância sempre vibraram muito com cada nova conquista.

À minha querida esposa, Roberta, que concordou em trilhar novos caminhos ao meu lado e longe de sua família.

Ao meu querido filho João Pedro, que colaborou com esta tese dormindo bem, chorando pouco e transmitindo o seu carinho ora com um abraço, ora com um sorriso.

Ao meu primo Daniel, que durante nossos longos embates filosóficos me faz questionar algumas das minhas, até então, convicções.

Ao meu grande amigo Felipe Marinho, um grande parceiro nas horas de trabalho e uma grande companhia nas horas de lazer.

Agradecimentos

Ao ser superior responsável pela criação da fantástica máquina humana e que nos consola explicando o que a ciência até hoje não conseguiu.

A todos os paciente que voluntariamente contribuíram com esta pesquisa, mesmo sabendo que se submeteriam a uma biópsia óssea.

À minha querida sogra, Júlia, sempre tão disponível a nos ajudar.

À Dra. Daniela Guimarães, que pacientemente me ensinou a realizar a biópsia de crista ilíaca.

A todos os médicos dos centros de diálise - Dr. Miorin, Dr. Hugo, Dra. Janaína, Dr. João Henrique, Dra. Jacqueline, Dra. Ludimila, Dr. Aloísio, Dra. Maria Eugênia, Dra. Geovana e Dra. Soraia - que incentivaram seus pacientes a participar desta pesquisa. Em especial à Dra. Zita e à enfermeira Viviane.

Ao Dr. Felype Barreto, que muito contribuiu com seus valiosos ensinamentos científicos e acabou se tornando um grande amigo.

À Dra. Juliana, que deu o pontapé inicial deste projeto.

Ao meu mestre e grande amigo Dr. Luiz Estevam, que muito me ajudou possibilitando conciliar a atividade científica desta tese de doutoramento com um exercício da profissão médica extremamente prazeroso.

Ao quarteto Wagner, Lu, Fabi e Meire, que de diferentes formas em muito me ajudaram, sempre com boa vontade.

Aos colegas e amigos do laboratório, que tornaram essa jornada menos árdua. Não vou citá-los nominalmente por receio de esquecer alguém.

À Monique, uma jovem acadêmica de medicina com responsabilidade de uma veterana na área.

Ao Dr. José Bruno, que tem me acolhido tão bem após o meu regresso a Natal-RN.

À Dra. Melani, sempre trazendo alegria para o laboratório.

À Dra. Rosa, pelos sábios ensinamentos e críticas construtivas.

E por fim à Dra. Vanda, um exemplo de médica, de pesquisadora e, sobretudo, de ser humano a ser seguido.

"Aprenda como se você fosse viver para sempre.

Viva como se você fosse morrer amanhã".

(Mahatma Gandhi)

Normalização adotada

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Conceitos	1
1.2. Tipos de Osteodistrofia Renal.....	4
1.2.1. Doença Óssea Adinâmica	4
1.2.2. Osteomalácia	5
1.2.3. Osteíte Fibrosa	5
1.2.4. Doença Mista	6
1.3. Marcadores Bioquímicos do Remodelamento Ósseo	8
1.3.1. Paratormônio	8
1.3.2. Fosfatase Alcalina	9
1.3.3. Esclerostina	10
1.3.4. Deoxipiridinolina	10
1.3.5. Outros.....	11
1.4. Calcificação Extra-Esquelética	12
2. OBJETIVOS	14
2.1. Primários	14
2.2. Secundários	14
3. MÉTODOS	15
3.1. Critérios de Inclusão	16
3.2. Critérios de Exclusão	16
3.3. Parâmetros Avaliados	16
3.3.1. Clínicos	16
3.3.2. Laboratoriais	17
3.3.3. Calcificação Extra-Esquelética	17
3.3.4. Histomorfometria Óssea	17
3.3.5. Expressão Óssea de Scl e FGF-23	19
3.4 Análises Estatísticas.....	20

4. RESULTADOS	22
4.1. Avaliação Clínica e Laboratorial	22
4.2. Calcificação Extra-Esquelética	25
4.3. Distribuição dos Diferentes Tipos de OR	26
4.4. Marcadores bioquímicos de Remodelamento Ósseo	32
4.5. Expressão Óssea de FGF-23 e Scl	36
4.6. Correlações dos Níveis de Séricos e da Expressão Óssea de FGF-23 com Dados Clínicos, Laboratoriais e de Histomorfometria Óssea.....	37
4.7. Correlações dos Níveis de Séricos e da Expressão Óssea de Scl com Dados Clínicos, Laboratoriais e de Histomorfometria Óssea.....	40
4.8. Comparação dos Dados Clínicos, Laboratoriais e Histomorfométricos Obtidos de Pacientes Não Diabéticos Tratados com DP e HD.....	43
5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÕES	53
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
Apêndice	

Lista de Abreviaturas e Siglas

AEC	Aminoetilcarbazol
ASC	Área sob a curva
BFR/BS	Taxa de formação óssea/superfície óssea
BV/TV	Volume ósseo/volume tissular
Cai	Cálcio iônico
CaT	Cálcio total
dL	Decilitro
DM	Dupla marcação
DMO-DRC	Distúrbios minerais e ósseos da doença renal crônica
DMT	Doença mista
DOA	Doença óssea adinâmica
DP	Diálise peritoneal
DPA	Diálise peritoneal automatizada
DPAC	Diálise peritoneal ambulatorial contínua
DPD	Deoxipiridinolina
DRC	Doença renal crônica
ES/BS	Superfície de erosão/superfície óssea
FA	Fosfatase alcalina
FAO	Fosfatase alcalina óssea
FbV/TV	Volume de fibrose/volume tissular
FGF-23	Fator de crescimento de fibroblastos 23
FGFo	Fator de crescimento de fibroblastos ósseo
FGFs	Fator de crescimento de fibroblastos sérico
FM	Fibrose medular

HD	Hemodiálise
HPT	Hiperparatireoidismo
K/DOQI	Kidney Dialysis Outcomes Quality Initiative
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
L	Litro
MC	Marcação confluyente
mEq	Miliequivalente
Mlt	Tempo de aposição mineral
MMA	Metilmetacrilato
MO	Medula óssea
MS/BS	Superfície mineralizante
O	Osteoide
O.Th	Espessura osteoide
Obl	Osteoblasto
ObS/BS	Superfície osteoblástica/superfície óssea
Ocl	Osteoclasto
OcS/BS	Superfície osteoclástica/superfície óssea
OF	Osteíte fibrosa
OM	Osteomalácia
OR	Osteodistrofia renal
OV/BV	Volume osteoide/volume ósseo
P	Fósforo
pg	Picograma
PTH	Paratormônio
PTHi	Paratormônio intacto

ROC	Característica de operação de receptor
Scl	Esclerostina
Sclo	Esclerostina óssea
Scls	Esclerostina sérica
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação das trabéculas
TMV	Turnover, Mineralização e Volume
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

Lista de Figuras

Figura 1. Distribuição dos tipos de OR em pacientes tratados com DP.	3
Figura 2. Tipos de OR.....	7
Figura 3. Fluxograma dos pacientes.....	15
Figura 4. Expressão óssea de FGF-23 e Scl.....	20
Figura 5. Distribuição dos pacientes de acordo com os níveis séricos de 25(OH) vitamina D.	24
Figura 6. Paciente com múltiplas calcificações extra-esqueléticas nas artérias radiais, ilíacas e femorais.....	25
Figura 7. Distribuição de pacientes de acordo com o tipo de OR.....	27
Figura 8. Distribuição de pacientes de acordo com a classificação TMV.	28
Figura 9. Curva ROC para avaliação de sensibilidade e especificidade dos marcadores FAO, PTHi, DPD e Scl no diagnóstico de alto remodelamento ósseo.	33
Figura 10. Curva ROC para avaliação de sensibilidade e especificidade dos marcadores FAO, PTHi, DPD e Scl no diagnóstico de baixo remodelamento ósseo.	34
Figura 11. Gráfico de regressão linear logFGF-23 sérico x Fósforo.	39
Figura 12. Gráfico de regressão linear logFGF-23 ósseo x Fósforo.....	39
Figura 13. Gráfico de regressão linear logBFR/BS x Scl sérica.	42
Figura 14. Gráfico de regressão linear logBFR/BS x expressão óssea de Scl.	42
Figura 15. Comparação dos níveis séricos de FGF-23 entre pacientes não diabéticos tratados com HD e DP.....	45
Figura 16. Comparação dos níveis séricos de 25 (OH) Vitamina D entre pacientes não diabéticos tratados com HD e DP.....	45

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características clínico-laboratoriais dos pacientes estudados.	23
Tabela 2. Comparação entre as características clínico-laboratoriais dos pacientes não diabéticos e diabéticos.	24
Tabela 3. Comparação dos parâmetros clínicos e laboratoriais entre pacientes com alto e baixo remodelamento ósseo.	29
Tabela 4. Comparação dos parâmetros clínicos e laboratoriais entre pacientes com mineralização óssea normal e anormal.	30
Tabela 5. Comparação dos parâmetros clínicos e laboratoriais entre pacientes com volume ósseo normal/alto versus baixo.	31
Tabela 6. Modelo de Regressão Logística para Remodelamento Ósseo.	32
Tabela 7. Sensibilidade e especificidade dos marcadores FAO, FA, PTHi, DPD e Scl para o diagnóstico de alto remodelamento ósseo.	33
Tabela 8. Sensibilidade e especificidade dos marcadores FAO, FA, PTHi, DPD e Scl para o diagnóstico de baixo remodelamento ósseo.	34
Tabela 9. Correlações do PTHi, FAO e DPD com parâmetros clínicos, laboratoriais e de histomorfometria óssea.	35
Tabela 10. FGF-23 e Scl expressos em tecido ósseo.	36
Tabela 11. Comparação entre não diabéticos e diabéticos quanto ao FGF-23 e Scl expressos em tecido ósseo.	36
Tabela 12. Correlações do FGF-23 sérico e expresso no tecido ósseo com parâmetros clínicos, laboratoriais e de histomorfometria óssea.	38
Tabela 13. Correlações da Scl sérica e expressa no tecido ósseo com parâmetros clínicos, laboratoriais e histomorfométricos.	41
Tabela 14. Comparação entre pacientes não diabéticos tratados com HD e DP.	44

RESUMO

Oliveira RA. Avaliação do metabolismo mineral de pacientes com doença renal crônica em diálise peritoneal: correlação entre parâmetros clínicos, bioquímicos e de histologia óssea [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO: Os distúrbios minerais e ósseos da doença renal crônica (DMO-DRC) são influenciados por vários fatores, como idade, etiologia da DRC, toxinas urêmicas e modalidade dialítica. Os DMO-DRC são bem descritos em pacientes tratados com hemodiálise (HD). No entanto, na diálise peritoneal (DP) os estudos são escassos e, na maioria deles, não há dados de histologia óssea. **OBJETIVOS:** caracterizar os DMO-DRC em uma coorte de pacientes em DP; comparar os resultados com aqueles obtidos da HD; e analisar o desempenho de marcadores séricos para o diagnóstico das doenças de alto e baixo remodelamento ósseo. **MÉTODOS:** quarenta e um pacientes tratados com DP submeteram-se a avaliação clínica, bioquímica e biópsia óssea. **RESULTADOS:** a doença óssea adinâmica (DOA) foi o tipo de osteodistrofia renal (OR) predominante, correspondendo a 49% da amostra. Ao se analisar separadamente diabéticos e não diabéticos, a prevalência de DOA foi de 77,7% no primeiro grupo e 26% no segundo ($p=0,001$). Na comparação entre DP e HD, observou-se que os pacientes do primeiro grupo apresentavam 25(OH) vitamina D mais baixa, mineralização óssea mais comprometida e melhor volume ósseo. A fosfatase alcalina óssea (FAO) apresentou a melhor sensibilidade e especificidade tanto para o diagnóstico de alto, quanto de baixo remodelamento ósseo. **CONCLUSÕES:** a DOA é o tipo de OR mais prevalente na DP. No entanto, a influência do diabetes como fator de risco parece ser maior do que a própria modalidade dialítica.

Descritores: Diálise peritoneal/efeitos adversos; Diálise renal; Osteodistrofia renal; Insuficiência renal crônica; Remodelação óssea; Hormônio paratireóideo; SOST proteína humana; Peptídeos e proteínas de sinalização intercelular.

SUMMARY

Oliveira RA. *Evaluation of mineral metabolism in peritoneal dialysis patients: correlation between bone histology, clinical features and biochemical parameters* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUCTION: Chronic kidney disease - mineral bone disorder (CKD-MBD) is a complex syndrome influenced by various factors, such as age, CKD etiology, uremic toxins and dialysis modality. CKD-MBD has been extensively studied in hemodialysis (HD) patients. However, for peritoneal dialysis (PD), only a few, older studies exist, most of which contain no bone biopsy data. The present study sought to: characterize CKD-MBD in a cohort of prevalent PD patients; compare the results with that obtained from HD patients; and analyse performance of bone turnover serum markers to make the diagnosis of high or low bone turnover disease in PD patients. **METHODS:** Forty-one PD patients underwent to a clinical evaluation, biochemical analysis and bone biopsy. **RESULTS:** The most prevalent pattern of renal osteodystrophy (ROD) was adynamic bone disease (ABD), comprising 49% of the sample population. When we separately analyzed diabetic and non-diabetic patients, the ABD prevalence was 77.7% in the former group and 26% in the latter group ($p=0.001$). The comparison between DP and HD patients revealed low 25(OH) vitamin D level, worst bone mineralization and better bone volume parameters in the former group. Bone alkaline phosphatase (BAP) demonstrated the best sensitivity and specificity values to detect both high and low turnover disease. **CONCLUSION:** ABD is the most frequent type of ROD. However, the effect of diabetes on the development of ABD is more important than the dialysis modality itself.

Descriptors: Peritoneal dialysis/adverse effects; Renal dialysis; Osteodistrofia renal; Renal insufficiency, chronic; Bone remodelling; Parathyroid hormone; SOST protein, human; Intercellular signaling peptides and proteins.

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) afeta entre 5% a 10% da população mundial. No Brasil, cerca de 92.000 pacientes estão em tratamento dialítico, dos quais aproximadamente 10% fazem diálise peritoneal (DP) (1). Distúrbios do metabolismo mineral, presentes em todos os estágios da DRC, se associam com maior fragilidade óssea, aumento do número de fraturas e de doenças cardiovasculares, contribuindo para a morbidade e mortalidade desses enfermos (2-5).

1.1. CONCEITOS

O KDIGO (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) é um comitê internacional cujo principal objetivo é desenvolver diretrizes para a prática clínica da DRC (2). Recentemente tal comitê modificou a terminologia usada para descrever as anormalidades ósseas observadas nos portadores de DRC e sugeriu a instituição de dois termos: (I) Distúrbios minerais e ósseos da doença renal crônica (DMO-DRC) e (II) Osteodistrofia renal (OR). O primeiro, mais abrangente, deve ser usado para a síndrome clínica que engloba: a) anormalidades do metabolismo mineral (cálcio, fósforo, paratormônio, vitamina D, fator 23 de crescimento de fibroblasto etc.); b) alterações no tecido ósseo (remodelamento, mineralização e volume); c) calcificações extra-esqueléticas presentes em alguns pacientes. O segundo termo fica restrito aos achados de histologia óssea (2).

Dessa forma, a OR pode ser dividida em dois grupos: (I) Doenças de alto remodelamento ósseo e (II) Doenças de baixo remodelamento ósseo. No primeiro grupo

encontram-se a osteíte fibrosa (OF) e a doença mista (DMT). No segundo, a doença óssea adinâmica (DOA) e a osteomalácia (OM). A intoxicação por alumínio, em diferentes graus, pode estar presente em qualquer tipo de OR, embora nos anos 70 e 80 tenha se observado importante associação com OM (3).

Concomitantemente à OR, os pacientes podem desenvolver osteoporose, como recentemente demonstrado por Barreto e cols.(4).

Apesar do enorme progresso obtido na compreensão da OR, ela continua sendo alvo de muitos questionamentos, em virtude da sua complexidade. O osso é um tecido dinâmico, influenciado por inúmeros fatores, como o tipo e duração da doença renal propriamente dita, dieta, medicações, sedentarismo, ação hormonal, tempo e modalidade dialítica.

Quanto à modalidade dialítica, os DMO-DRC estão bem documentados nos pacientes tratados com hemodiálise (HD). Contudo, naqueles tratados com DP as publicações são raras, especialmente aquelas com biópsia óssea. De uma maneira geral esses poucos estudos incluíram pacientes tratados previamente com HD e foram realizados em um período em que os quelantes de fósforo mais usados eram o hidróxido de alumínio e os sais de cálcio, acarretando uma sobrecarga desses elementos. Naquela época a opção pela DP partia do médico e as principais indicações incluíam especialmente idosos, diabéticos e pacientes sem via de acesso vascular para HD (5), o que pode ter contribuído para a elevada prevalência da DOA (6–11).

O KDIGO reviu os estudos mais importantes sobre o tema e compilou os achados histológicos encontrados nas biópsias de crista ilíaca (Figura 1): 50% dos pacientes apresentavam DOA, seguido de 20% com OF, 18% com OF leve, 5% com DMT, 5% com OM e 2% com osso normal (2). O primeiro desses estudos foi

publicado em 1994 por Joffe e cols. que avaliou 18 pacientes com média de idade de $62 \pm 14,4$ anos. A doença óssea predominante foi a OF (9). O segundo, publicado em 2000 por Sánchez e cols., avaliou 57 pacientes com média de idade de 50 ± 13 anos. Neste último a DOA prevaleceu (63,2%) (6). Vale ressaltar que os critérios usados para classificar os achados histológicos foram distintos e que a prevalência de DOA foi elevada.

Na América Latina uma publicação datada de 2003 avaliou, retrospectivamente, o perfil de OR de 2507 pacientes dialíticos do Brasil e Uruguai, submetidos à biópsia óssea nas décadas de 1980 e 1990. A grande maioria (93,5%) fazia HD e os demais, diálise peritoneal ambulatorial contínua (DPAC). Ao longo do período avaliado houve uma notória redução na prevalência de intoxicação por alumínio e um aumento de OF. As características específicas do grupo DPAC não foram avaliadas separadamente (12).

Figura 1. Distribuição dos tipos de OR em pacientes tratados com DP (Modificado de Kidney Int. Suppl. 2009 ago;(113):S1-130)

1.2. TIPOS DE OSTEODISTROFIA RENAL

A Figura 2, retirada da Tese de Livre Docência da Dra. Vanda Jorgetti (13), ilustra as características histológicas dos diferentes tipos de OR.

1.2.1. Doença Óssea Adinâmica

A doença adinâmica, como o próprio nome sugere, se caracteriza por um osso com poucos osteoblastos e osteoclastos e, conseqüentemente, pobre em matriz osteoide. As marcações pela tetraciclina são escassas (3).

Os mecanismos fisiopatológicos da DOA não são claramente estabelecidos. Desde que foi identificada em pacientes pré-dialíticos, a modalidade dialítica deixou de ser a maior implicada e outros fatores de risco foram identificados. Dentre eles, destacamos: idade avançada, sexo masculino, *diabetes mellitus*, menor tempo em diálise, supressão exagerada da secreção de paratormônio (PTH) devido ao uso de calcitriol e seus análogos, sobrecarga de cálcio, resistência óssea à ação do PTH, presença de fragmentos antagonistas do PTH e distúrbios do magnésio (7,14–18).

Na DP a sobrecarga de cálcio merece destaque, pois a maioria dos serviços no Brasil utiliza dialisato com concentração de cálcio de 3,5 mEq/L (19). Além disso, as perdas de PTH e seus fragmentos para o efluente peritoneal também contribuem para o desenvolvimento da DOA (20,21).

Do ponto de vista clínico a associação com maior risco de fraturas e calcificações vasculares aumenta a morbidade e mortalidade dos pacientes (22–24).

Níveis de PTH abaixo de 65 pg/mL apresentam boa sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de doença óssea de baixo remodelamento (25). Dois trabalhos demonstraram elevada prevalência de fratura de quadril e vértebras em

pacientes com PTH baixo. Em um deles o risco relativo de óbito foi 2,4 vezes maior no grupo com PTH menor que 195 pg/dL (22,26).

Em relação à calcificação vascular, estudos demonstraram aumento da sua incidência em pacientes com DOA, tanto naqueles em DP como em HD. Provavelmente o baixo remodelamento ósseo e sua menor capacidade de incorporar o excesso de cálcio circulante contribuem para o aumento das calcificações extra-esqueléticas e, consequentemente, da mortalidade cardiovascular (16,23,24,27–29).

1.2.2. Osteomalácia

A OM se caracteriza por um grave defeito de mineralização - documentado através das marcações simples e confluentes pela tetraciclina - porém com formação óssea preservada. O seu marco é uma abundante matriz osteoide sobre as traves ósseas.

Clinicamente se manifesta com dor óssea e está associada à desnutrição e intoxicação por alumínio (3,30). O tratamento adequado da água da diálise e o uso menos frequente de quelantes de fósforo à base de alumínio diminuíram a prevalência de OM nas últimas décadas.

1.2.3. Osteíte Fibrosa

A OF, manifestação óssea do hiperparatireoidismo (HPT) secundário, caracteriza-se pelo alto remodelamento ósseo. Tanto a formação como a reabsorção óssea está aumentada, o número de osteoblastos e osteoclastos é abundante e a medula óssea apresenta extensas áreas com fibrose. A mineralização, avaliada pelas marcações com tetraciclina, costuma ser normal ou pouco comprometida (3,31).

Assim como a DOA, o HPT também aumenta a morbidade e mortalidade nos pacientes em diálise (32), além de contribuir como um dos fatores responsáveis pela calcificação peritoneal e peritonite esclerosante (33). Billa e cols. demonstraram uma prevalência de 47% de HPT em um estudo com 176 pacientes em DP (34).

1.2.4. Doença Mista

Como o próprio nome sugere, a DMT apresenta características da OF (abundantes osteoblastos, osteoclastos e fibrose peritrabecular) associadas à mineralização óssea comprometida (marcações pela tetraciclina simples e/ou confluentes). Esse tipo histológico não apresenta correlações com achados clínicos específicos e pode representar uma transição entre as doenças de alto e baixo remodelamento, uma vez que o osso é um tecido extremamente dinâmico (3,31).

Figura 2. Tipos de OR. Fotomicrografias de tecido ósseo calcificado mostrando os diferentes tipos histológicos da doença óssea de pacientes com doença renal crônica. OM: osso mineralizado, MO: medula óssea, O: osteoide, Obl: osteoblastos, Ocl: osteoclastos, FM: fibrose medular, DM: dupla marcação, MC: marcação confluenta. (A) Quadro histológico da Osteíte Fibrosa. Azul de Toluidina (100x); (B) Fotomicrografia das marcações pela tetraciclina na Osteíte Fibrosa. Corte histológico sem coloração observado no microscópio com fonte de fluorescência no aumento de 125x; (C) Quadro histológico da Osteomalácia mostrando aumento extremo (seta) da formação óssea representada pela superfície e espessura osteoide (O). Azul de Toluidina (100x); (D) As marcações pela tetraciclina na Osteomalácia são confluentes. Corte histológico sem coloração observado no microscópio com fonte de fluorescência no aumento de 250x; (E) Quadro histológico da Doença Óssea Adinâmica. Azul de Toluidina (40x); (F) As marcações pela tetraciclina na Doença Óssea Adinâmica são escassas. Corte histológico sem coloração observado no microscópio com fonte de fluorescência no aumento de 50x; (G) Quadro histológico da Doença Mista. Azul de Toluidina (100x); (H) A Doença Mista diferencia-se da Osteíte Fibrosa pelo tipo de marcação pela tetraciclina (Figura 2B), ou seja, a maior parte delas são marcações confluentes. Corte histológico sem coloração observado no microscópio com fonte de fluorescência no aumento de 125x.

1.3. MARCADORES BIOQUÍMICOS DO REMODELAMENTO ÓSSEO

A biópsia de crista ilíaca é o padrão ouro no diagnóstico da OR, apesar das dificuldades para sua realização na prática clínica. Alternativamente, marcadores bioquímicos são usados de forma não invasiva, porém com sensibilidade e especificidade bastante variáveis. Os mais empregados são o PTH, a fosfatase alcalina total (FA) e sua fração óssea (FAO). A deoxipiridinolina (DPD) é mais usada em protocolos de pesquisa e mais recentemente a esclerostina (Scl) foi estudada em pacientes com OR em HD e correlacionou-se inversamente com o remodelamento ósseo (35).

1.3.1. Paratormônio

O PTH é o marcador de remodelamento ósseo mais utilizado na prática clínica diária, especialmente o PTH intacto (PTH_i) ou de segunda geração. Estudos demonstraram que os ensaios para dosagem do PTH_i detectam não só a fração 1-84, mas também a 7-84. Ambas apresentam uma ação biológica antagônica. Assim, o PTH_i superestimaria o remodelamento ósseo (36). Por tal motivo, mais recentemente se desenvolveu um ensaio que detecta exclusivamente a fração 1-84, com a esperança de que o mesmo diferenciase melhor a doença de alto e baixo remodelamento. Ele passou a ser denominado “whole” PTH ou PTH de terceira geração. Até o momento os estudos não mostraram sua superioridade em relação aos ensaios de segunda geração (37).

Os níveis ideais de PTH, ou seja, aqueles nos quais o paciente tem remodelamento ósseo normal, ainda não são conhecidos. Em 2003 o K/DOQI sugeriu que esses níveis estariam entre 150 pg/mL e 300 pg/mL (38). Anos mais tarde Barreto e cols. documentaram uma elevada prevalência de DOA dentre os pacientes cujos níveis de PTH sérico seguiam as recomendações do K/DOQI (39). Mais recentemente o

KDIGO passou a recomendar que os níveis desse hormônio fiquem entre 2 e 9 vezes o limite superior do ensaio (2).

Qi e cols. mostraram em seu estudo que em 30% dos pacientes em HD e em 51,3% dos pacientes em DP não houve correlação entre os níveis séricos de PTH e o tipo de remodelamento ósseo. Somente valores de PTH superiores a 450 pg/mL apresentaram especificidade acima de 95% para o diagnóstico de doença de alto remodelamento. Os autores concluíram, também, que pacientes com valores de PTH entre 65 e 450 pg/mL deveriam ser submetidos à biópsia óssea antes de iniciar algum tipo de tratamento específico (25).

Outro estudo interessante relacionado aos níveis de PTH foi realizado por Dimkovic e cols. Esses autores avaliaram 237 pacientes em DP e não encontraram diferença de morbidade e mortalidade entre os pacientes com níveis de PTHi normal/baixo (<217 pg/mL) e aqueles com PTHi alto (>217 pg/mL). O número de pacientes diabéticos era semelhante nos dois grupos (40).

1.3.2. Fosfatase Alcalina

A FA é uma proteína produzida em 5 tecidos distintos: fígado, rins, intestino, placenta e osso. A sua fração óssea (FAO) é secretada pelos osteoblastos e é usada como marcador de formação óssea. Estudos sugerem, inclusive, que a FAO apresenta sensibilidade e especificidade melhor que o PTH para o discernimento entre os tipos de doenças ósseas, tanto em pacientes dialíticos, quanto pré-dialíticos (41–43). Nos pacientes sem doenças hepáticas, há uma boa correlação entre a FAO e FA, podendo esta última ser utilizada com menor custo (44).

1.3.3. Esclerostina

A Scl é uma proteína recentemente descoberta e que age inibindo uma importante via de sinalização celular usada pelos osteoblastos: a via wnt/ β -catenina. Ela é produzida pelos osteócitos e diminui a formação óssea. Pacientes em que a Scl está geneticamente ausente ou inativa (esclerostose e doença de van Buchem) têm maior massa óssea, acompanhada de deformidades craniofaciais (45,46). No entanto, os familiares destes pacientes que apresentam a mutação da Scl sob a forma heterozigótica são completamente assintomáticos e apresentam ossos mais resistentes e volumosos que a população normal. Tais descobertas têm estimulado o desenvolvimento de pesquisas utilizando anticorpos anti-Scl para tratamento de osteoporose, com resultados bastante promissores (47–49). Até o momento desconhecemos estudos que analisaram o papel da esclerostina nos DMO-DRC de pacientes tratados com DP. Cejka e cols avaliaram o comportamento da Scl em pacientes tratados com HD. Comparando com controles saudáveis, os níveis circulantes da Scl estavam aumentados e se correlacionaram negativamente com PTH e com o remodelamento ósseo (35).

1.3.4. Deoxipiridinolina

A piridinolina e a DPD, produtos de degradação de colágeno, são usados como marcadores de reabsorção óssea. No entanto, são raros os estudos com biópsia que avaliaram associação entre os níveis séricos desses marcadores e o remodelamento ósseo de pacientes com DRC (44,50).

1.3.5. Outros

A osteocalcina e a osteoprotegerina também são usados como marcadores de remodelamento ósseo. Contudo, há poucas publicações em pacientes tratados com DP (9,51).

Outros hormônios e proteínas que participam da fisiopatologia dos DMO-DRC não são utilizados como marcadores de remodelamento ósseo, mas associam-se, por exemplo, com alterações na mineralização óssea. Merecem destaque a vitamina D e o fator 23 de crescimento de fibroblasto (FGF-23).

A 1,25(OH) vitamina D - ou calcitriol - tem importante papel na saúde óssea e participa diretamente da fisiopatologia do HPT secundário. Já o seu precursor [25(OH) vitamina D ou calcidiol] se associa com várias funções sistêmicas, dentre elas a modulação do sistema imune e controle glicêmico (52,53). Seus baixos níveis se associam a doenças cardiovasculares, pulmonares e neurológicas (54–56). Wang e cols. demonstraram uma correlação inversa entre os níveis de 25(OH) vitamina D e hipertrofia miocárdica em pacientes tratados com DP (54).

Os estoques de vitamina D são determinados através da dosagem sérica da 25(OH)vitamina D. Pacientes com DRC em tratamento conservador, em HD ou em DP apresentam elevada prevalência de hipovitaminose D. Seus níveis são particularmente baixos nos pacientes que fazem DP, pois um percentual significativo de 25(OH) vitamina D é perdido através do efluente peritoneal (57).

O FGF-23 é uma proteína identificada no ano 2000 em pacientes com fosfatúria e osteomalácia induzida por tumor. Após sua descoberta, passou a ser estudado em doenças que cursam com distúrbios no metabolismo do fósforo. O osso é o tecido que mais expressa FGF-23 e o osteócito é a principal célula responsável pela sua produção. Dentre suas ações fisiológicas, destacam-se a indução de fosfatúria e redução na

absorção intestinal de fósforo - mediada pela inibição da 1 α -hidroxilase e menor produção da 1,25(OH) vitamina D. Os níveis séricos de FGF-23 são elevados nos pacientes com DRC e se associam a maior mortalidade (58). Em relação à DP, os valores de FGF-23 se correlacionam positivamente com o tempo de diálise e negativamente com a função renal residual (59). Um único estudo, envolvendo pacientes pediátricos tratados com DP, avaliou os níveis séricos de FGF-23 e parâmetros de histomorfometria óssea. Não houve correlação com a taxa de formação óssea. Em contrapartida, os níveis FGF-23 se associaram negativamente com a mineralização [MLT ($r = - 0,35$; $p < 0,05$) e O.Th ($r = - 0,38$; $p < 0,01$)] (60). O nosso grupo também confirmou que os valores de FGF-23 são elevados nos pacientes em HD e seus níveis são maiores entre aqueles tratados com acetato de cálcio, calcitriol e entre os que dialisam com concentrações de cálcio mais altas. Observou-se ainda associação direta entre os níveis de FGF-23 e o *score* de cálcio coronário (61).

O FGF-23 e Scl são apenas alguns exemplos de proteínas produzidas pelos osteócitos. Durante décadas acreditou-se que essas células eram osteoblastos senescentes e inertes. Todavia, a descoberta de várias proteínas e de suas funções demonstra o papel crucial exercido pelos osteócitos na fisiologia óssea, contribuindo para a intercomunicação entre os diferentes microambientes desse tecido (62–64).

1.4. CALCIFICAÇÃO EXTRA-ESQUELÉTICA

A prevalência de calcificações extra-esqueléticas aumenta com a perda de função renal, sendo mais elevada nos pacientes com DRC do que na população geral. Cerca de 50% a 90% dos pacientes prevalentes em diálise apresentam algum tipo de calcificação vascular, o que pode se associar a um risco aumentado de eventos cardiovasculares. Gallieni e cols demonstraram que além de ser muito frequente, a

calcificação vascular progride bastante em pacientes tratados com DP. Em seu estudo 77% dos pacientes apresentavam calcificação vascular no início do acompanhamento. Após 3 anos esse número aumentou para 90% (65).

Diante do exposto torna-se evidente que a compreensão dos DMO-DRC tem evoluído bastante. No entanto, por ser um tema extremamente complexo e dotado de inúmeras nuances ainda há muito o que se compreender.

O número de pacientes dialíticos tem crescido em todo o mundo e as características das doenças ósseas daqueles tratados com DP ainda são pouco conhecidas e motivo de controvérsias. Por isso julgamos necessário estudá-las em um grupo de pacientes tratados unicamente com DP.

Vale lembrar que a maioria dos estudos que avaliou o papel dos marcadores bioquímicos no tipo remodelamento ósseo foram realizados em pacientes tratados com HD. No presente estudo buscamos compreender o real papel da modalidade dialítica nas alterações de remodelamento, mineralização e volume ósseo; o papel dos marcadores bioquímicos na identificação dessas alterações; além de comparar os resultados obtidos com o de pacientes tratados com HD.

2. OBJETIVOS

2.1. PRIMÁRIOS

- Avaliar as características clínicas e laboratoriais, a presença de calcificações extra-esqueléticas e a prevalência dos tipos de OR em pacientes com DRC tratados com DP.

2.2. SECUNDÁRIOS

- Avaliar a sensibilidade e especificidade de marcadores bioquímicos no diagnóstico do tipo de remodelamento ósseo em pacientes tratados com DP.
- Comparar os DMO-DRC entre pacientes tratados com DP e HD.

3. MÉTODOS

Entre agosto de 2010 e setembro de 2012 cinquenta e dois pacientes provenientes de oito centros de diálise do estado de São Paulo foram convidados, *in loco*, a participar desta coorte transversal. Sete se recusaram e os 45 restantes responderam a um questionário e assinaram um termo de consentimento informado. Dois deles foram excluídos antes do início do protocolo por intercorrências clínicas (sepse e trombose venosa profunda). Os 43 restantes submeteram-se à biópsia óssea, coleta de sangue e radiografia de mãos e quadris. Dois outros foram excluídos após a biópsia, pois o fragmento obtido foi inadequado. Dessa forma, 41 pacientes foram incluídos na análise (Figura 3).

Figura 3. Fluxograma dos pacientes.

Em um segundo momento comparou-se as características dessa amostra ($n = 23$) com as características de pacientes tratados com HD ($n = 23$), provenientes de um banco de dados de uma publicação prévia do grupo (66). Os casos foram pareados por idade, sexo e tempo de diálise, na proporção de 1 para 1. Não havia diabéticos nos grupos.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do HCFMUSP sob número 0046/08.

3.1. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Adultos entre 18 e 65 anos, em tratamento dialítico [DPAC ou diálise peritoneal automatizada (DPA)] há pelo menos 6 meses.

3.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Pacientes tratados previamente com HD ou transplantados; paratireoidectomizados; acamados; usuários de imunossuppressores, anticonvulsivantes ou drogas ilícitas; portadores de neoplasias malignas, síndrome da imunodeficiência humana adquirida, sarcoidose ou tuberculose.

3.3. PARÂMETROS AVALIADOS

3.3.1. Clínicos

Idade, sexo, raça, etiologia da doença renal, tempo em diálise, função renal residual e medicamentos em uso (com ênfase para os quelantes de fósforo, vitamina D e calcitriol).

3.3.2. Laboratoriais

Amostras de sangue foram obtidas em jejum, com um intervalo máximo de 2 semanas precedendo ou sucedendo a biópsia de crista ilíaca. Parte da amostra coletada foi centrifugada e armazenada em alíquotas a -80°C para análise de DPD (kit ELISA, Quidel, USA, valores de referência: $3,25 \pm 0,66$ nmol/L), Scl (kit ELISA, Quidel, USA, valores de referência: 0,42-0,80 ng/mL), FGF-23 intacto (kit ELISA, Kainos, Japão, valores de referência: 8,2-54,3 pg/mL) e FAO (kit ELISA, Metra Biosystem Inc., USA, valores de referência: 11,6–42,7 U/L) ao final do estudo.

Os níveis séricos de cálcio total (CaT) e iônico (Cai), fósforo (P), FA e albumina foram obtidos através de aparelho automatizado Sinnowa SX400. O PTHi foi analisado pela técnica de quimioluminescência (Medlab, USA, valores de referência: 16- 87 pg/mL), assim como a 25(OH) vitamina D (quimioluminescência, Dia-SorinTM, USA, valores de referência: 30-100 ng/mL).

3.3.3. Calcificação Extra-Esquelética

Os pacientes realizaram radiografias simples de mãos e quadril para pesquisa de calcificação extra-esquelética, quantificadas segundo o "score" descrito por Adragão e cols (67).

3.3.4. Histomorfometria Óssea

A biópsia óssea foi realizada na crista ilíaca com trefina elétrica, com diâmetro interno de 7 mm, sob anestesia local com lidocaína 2% e sedação com midazolan (7,5 mg intramuscular). Os pacientes receberam previamente 2 cursos de tetraciclina, na dose de 500 mg a cada 12h/12h por 3 dias, separados por 10 dias livres de medicamento

- a biópsia foi realizada de 2 a 5 dias após o término do antibiótico. A biópsia óssea foi processada com técnica padronizada que permite analisar o tecido sem descalcificação prévia (68). A análise histomorfométrica foi realizada empregando-se método semiautomatizado, com o software Osteomeasure (Osteometrics Inc., Atlanta, GA, USA).

Os parâmetros estáticos e dinâmicos foram descritos usando a padronização proposta pela *American Society of Bone and Mineral Research* (69). Os parâmetros estruturais e estáticos foram comparados com controles normais que pertencem a um banco de dados do nosso laboratório (70). Para os parâmetros dinâmicos utilizaram-se os valores de Vedi e cols., ajustados para as respectivas faixas etárias (71).

Os resultados da histomorfometria óssea foram analisados quanto ao remodelamento, a mineralização e o volume ósseo [classificação **TMV** (**T**=turnover=remodelamento, **M**=mineralização, **V**=volume)] (2). Considerou-se o remodelamento normal quando a taxa de formação óssea (BFR/BS) era de $0,061 \pm 0,006 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$ para mulheres e $0,068 \pm 0,040 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$ para homens. Níveis mais baixos caracterizaram baixo remodelamento e valores mais elevados, alto remodelamento (71). O intervalo de mineralização (Mlt) acima de 50 dias caracterizou defeito de mineralização. Considerou-se baixo volume ósseo valores de BV/TV (volume trabecular ósseo/volume total) inferiores a 14,6% para mulheres e 17,9% para homens (70).

3.3.5. Expressão Óssea de Scl e FGF-23

A expressão das proteínas Scl e FGF-23 foram avaliadas pela técnica de imuno-histoquímica para tecido ósseo incluído em resina acrílica e parcialmente descalcificado (72). Para tanto empregamos o kit LSAB HRP (K 0690 Dako Cytomation).

Resumidamente as etapas realizadas foram:

- 1) Remoção do metacrilato (MMA) das lâminas com xilol/clorofórmio 1:1 e banhos seriados de etanol 100%, 96%, 70% e 50%;
- 2) Descalcificação do tecido com ácido acético 1%;
- 3) Bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% em metanol;
- 4) Bloqueio inespecífico de proteína com Dakocytomation Prontein Block (X0909, Dako);
- 5) Incubação com anticorpo primário overnight a 4°C [anticorpo monoclonal anti-Scl humana (R&D Systems) e anticorpo monoclonal anti-FGF-23 (gentilmente cedido pela Genzyme Corporation);
- 6) Incubação com anticorpo secundário [Biotinylated Link (K 0690 Dako)];
- 7) Incubação com o conjugado Streptavidin-HRP (K 0690 Dako);
- 8) Revelação com o cromógeno AEC (3-Amino-9 Ethyl-Carbazol);
- 9) Coloração com Hematoxilina de Mayer (Merck, Alemanha);
- 10) Montagem com glicergel (Merck, Alemanha);
- 11) Visualização em microscópio óptico.

A quantificação da Scl e do FGF-23 expressos no tecido ósseo se fez pela contagem de osteócitos com marcação positiva, em relação à área de osso obtida na análise histomorfométrica (Figura 4).

Figura 4: Expressão óssea de FGF-23 e Scl [marcações em vermelho (200x)].

3.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados com distribuição paramétrica foram expressos em média $\pm$ desvio padrão; e aqueles com distribuição não paramétrica, em mediana (percentil 25 - 75). Alguns parâmetros com distribuição não-normal foram normalizados após transformação logarítmica. Para as comparações utilizou-se o teste de Mann-Whitney e para as correlações, o teste de Spearman. A regressão linear e a regressão logística foram utilizadas para identificar fatores de risco independentes. As variáveis utilizadas nos modelos de regressão logística foram a idade e os parâmetros que apresentaram diferença significativa na comparação entre alto e baixo remodelamento ósseo. Utilizou-se o teste de Qui-quadrado para avaliar associação entre variáveis categóricas. Através de curvas de características de operação do receptor (curva ROC) analisou-se a sensibilidade e especificidade dos vários marcadores bioquímicos de remodelamento ósseo. O ponto de corte escolhido para cada marcador foi determinado pelo maior valor obtido no teste de Youden (sensibilidade + especificidade - 1). A área sob a curva (ASC) definiu o desempenho de cada marcador bioquímico (0,5 = teste nulo; maior que 0,7 = bom; maior que 0,8 = ótimo). Não foi possível analisar separadamente o desempenho

dos marcadores entre os pacientes diabéticos e não diabéticos em virtude da pequena amostra.

As análises foram obtidas como o software SPSS versão 17.0 para Windows. O nível de significância escolhido foi de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL

A Tabela 1 resume os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes incluídos no estudo. A média de idade foi de $50,3 \pm 10,2$ anos; 56,1% eram homens; o tempo médio de DP foi de 10 (7 - 24) meses; e a eficiência do tratamento dialítico avaliado pelo KT/V semanal foi de $2,43 \pm 0,75$ (valor ideal $> 1,7$) (73). A maior parte dos pacientes (60%) fazia DPA e o restante, DPAC. Não houve diferença nos tipos de OR entre as duas modalidades ($p > 0,05$ na distribuição dos quatro tipos de OR entre DPA versus DPAC). A diurese residual foi de 1015 ± 669 mL/24h e apenas 15,8% dos pacientes usavam dialisato com concentração de cálcio menor que 3,5 mEq/L. O quelante de fósforo mais utilizado foi o hidrocloreto de sevelamer (90,3%). Todos os pacientes apresentaram hipovitaminose D e a grande maioria (70,7%) tinha níveis inferiores a 15 ng/mL (Figura 5). Apenas 18% dos pacientes recebiam reposição de vitamina D e 36% fazia uso de calcitriol.

Como praticamente metade dos pacientes estudados tinha como etiologia da DRC o *diabetes mellitus*, decidimos comparar as características desses pacientes com os demais (Tabela 2). Os pacientes diabéticos eram mais velhos e apresentavam menores valores de albumina, PTHi, fósforo, FGF-23 e 25(OH)vitamina D. Em contrapartida, observou-se mais calcificação extra-esquelética e maiores níveis de Scl.

Tabela 1. Características clínico-laboratoriais dos pacientes estudados

	Resultados	Valores Referência
Idade (anos)	50,3±10,2	-
Sexo Masculino (%)	56,1	-
Diabetes (%)	43,9	-
Raça Branca (%)	22	-
Tempo de DP (meses)	10 (7-24)	-
Modalidade DP		
• DPAC(%)	40	-
• APD (%)	60	-
Diurese (mL/24h)	1015±669	-
KT/V	2,43±0,75	>1,7
Cai (mg/dL)	4,64±0,69	(4,6 – 5,3)
P (mg/dL)	5,09±1,72	(2,7 – 4,5)
Albumina (g/dL)	3,49±0,54	(3,4 – 4,8)
PTHi (pg/mL)	363 (236-686)	(16 – 87)
FAO(U/L)	52,9±16,1	(11,6 – 42,7)
Scl sérica (ng/mL)	2,00±1,03	(0,42 – 0,80)
DPD (nmol/L)	22,2±16,1	(2,59 – 3,91)
25(OH) Vitamina D (ng/dL)	12,6±6,3	(30 – 100)
FGF-23 sérico (pg/mL)	489 (384-1000)	(8,2 – 54,3)
Calcificação Extra-Esquelética (%)	24,3	0

DPAC: diálise peritoneal ambulatorial contínua; APD: diálise peritoneal automatizada;
 Cai: cálcio ionizado; P: fósforo; FAO: fosfatase alcalina óssea; DPD: Deoxipiridinolina;
 PTHi: paratormônio intacto; FGF-23: *fibroblast growth factor* 23; Scl: esclerostina.

Tabela 2. Comparação entre as características clínico-laboratoriais dos pacientes não diabéticos e diabéticos

	Não Diabéticos (n = 23)	Diabéticos (n = 18)	p
Idade (anos)	47,1±10,8	54,4±7,9	0,027
Tempo de DP (meses)	14 (8-32)	8,5 (7-14)	0,110
Diurese (mL/24h)	1028±676	998±678	0,780
Cai (mg/dL)	4,76±0,38	4,5±0,92	0,540
P (mg/dL)	5,6±1,4	4,3±1,7	0,001
Albumina (g/dL)	3,64±0,49	3,27±0,56	0,050
PTHi (pg/mL)	430 (256-1111)	269 (196-397)	0,053
FA (U/L)	114±58	112±41	0,88
FAO(U/L)	59,2±37	42,8±15	0,40
Scl sérica (ng/mL)	1,64±0,94	2,46±0,97	0,002
DPD (nmol/L)	25,3±17	18,1±14	0,06
25(OH) Vitamina D (ng/dL)	15,5±6,7	9,08±3,4	0,003
FGF-23 sérico (pg/mL)	781 (481-1973)	441 (373-488)	0,01
Calcif. Extra-Esquelética (%)	9,52	43,7	0,02

Cai: cálcio ionizado; P: fósforo; FAO: fosfatase alcalina óssea; DPD: Deoxipiridinolina; PTHi: paratormônio intacto; FGF-23: *fibroblast growth factor* 23; Scl: esclerostina.

Figura 5. Distribuição dos pacientes de acordo com os níveis séricos de 25(OH) vitamina D

4.2. CALCIFICAÇÃO EXTRA-ESQUELÉTICA

A calcificação extra-esquelética (Figura 6) foi observada em 24,3% dos pacientes e associou-se à presença de diabetes mellitus ($p = 0,02$). Não houve diferença quanto à presença de calcificação na comparação entre pacientes com baixo e alto remodelamento ósseo ($p = 0,29$). O PTHi, FA, FAO, Scl e DPD não se mostraram bons marcadores da presença de calcificação extra-esquelética à radiografia de mãos e quadris (ASC < 0,5 para todos eles).

Figura 6. Paciente com múltiplas calcificações extra-esqueléticas nas artérias radiais, ilíacas e femorais (setas)

4.3. DISTRIBUIÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE OR

Os resultados da análise histomorfométrica das biópsias evidenciou que o tipo de doença óssea mais prevalente foi a DOA, correspondendo a 49% da amostra, seguida da DMT e OF (27% e 22% respectivamente). Apenas 1 caso (2%) apresentou OM (Figura 7A).

No entanto, ao se analisar separadamente os pacientes diabéticos (Figura 7B) e não diabéticos (Figura 7C), o percentual de DOA foi de 77,7% no primeiro grupo e 26% no segundo ($p = 0,001$). Dentre os não diabéticos a DMT predominou (39,1%), seguida da OF (30,4%).

De acordo com a classificação TMV, não houve diferença de prevalência entre alto e baixo "turnover" ósseo na amostra completa de pacientes; a mineralização estava preservada em 34% deles e comprometida nos demais; e o volume ósseo estava preservado em 60,9% dos pacientes e reduzido nos demais (Figura 8A).

Figura 7. Distribuição de pacientes de acordo com o tipo de OR

Figura 8. Distribuição de pacientes de acordo com a classificação TMV

O baixo remodelamento ósseo se associou com o diagnóstico de diabetes ($p = 0,003$) (Figura 8B), níveis mais elevados de Scl sérica ($p = 0,02$) e maior expressão de Scl óssea ($p = 0,03$). Já o alto remodelamento se associou com níveis mais elevados de FAO ($p = 0,001$), DPD ($p = 0,01$) e PTHi ($p = 0,003$) (Tabela 3).

Apenas os níveis séricos de FAO e a expressão óssea da Scl apresentaram diferença significativa entre os grupos com mineralização óssea normal e anormal (Tabela 4).

Os pacientes com menor tempo de diálise apresentaram volume ósseo menor que aqueles com tratamento mais prolongado (Tabela 5).

Tabela 3: Comparação dos parâmetros clínicos e laboratoriais entre pacientes com alto e baixo remodelamento ósseo

REMODELAMENTO			
	Baixo (n=21)	Alto (n=20)	p
Idade (anos)	53,3±8	47,2±10	0,07
Diabetes (%)	66,6	20	0,003
Tempo DP (meses)	9 (7 - 16,5)	13,5 (7,2 - 35)	0,14
Diurese (mL/24h)	1046±730	982±615	0,92
Cai (mg/dL)	4,7±0,4	4,5±0,9	0,88
P (mg/dL)	4,7±1,7	5,4±1,6	0,11
Albumina (g/dL)	3,4±0,6	3,5±0,5	0,32
PTHi (pg/mL)	265 (188-365)	524 (301-1200)	0,003
FAO(U/L)	35,9±15	69,0±33	0,001
Scls (ng/dL)	2,34±1,1	1,63±0,7	0,02
DPD (nmol/L)	16,9±12	27,7±17	0,01
25(OH)Vit.D (ng/dL)	11,3±6	14,0±6	0,60
FGF-23s (pg/mL)	470 (352-844)	499 (462-1359)	0,17
Calcif. vasc. (%)	31,5	10,7	0,29
FGF-23o*	2,36 (1,37-11,7)	2,50 (1,73-5,49)	0,82
Sclo*	12,4±7,6	7,7±5,8	0,03

Cai: cálcio ionizado; P: fósforo; FAO: fosfatase alcalina óssea; DPD: Deoxipiridinolina; PTHi: paratormônio intacto; FGF-23s: *fibroblast growth factor* 23 sérico; FGF-23o: *fibroblast growth factor* 23 ósseo; Scls: esclerostina sérica; Sclo: esclerostina óssea.

* Resultados expressos através do número de osteócitos com marcação positiva em relação à área de osso obtida na análise histomorfométrica.

Tabela 4. Comparação dos parâmetros clínicos e laboratoriais entre pacientes com mineralização óssea normal e anormal

MINERALIZAÇÃO			
	Normal (n=14)	Anormal (n=27)	p
Idade (anos)	47,3±12,4	51,8±8,7	0,37
Diabetes (%)	42,8	44,4	0,92
Tempo DP (meses)	11,5 (7-24,5)	10 (7-24)	0,77
Diurese (mL/24h)	1033±627	1005±701	0,81
Cai (mg/dL)	4,70±0,42	4,60±0,82	1,0
P (mg/dL)	5,0±1,4	5,0±1,8	0,79
Albumina (g/dL)	3,6±0,4	3,3±0,5	0,10
PTHi (pg/mL)	524 (284-1289)	338 (200-430)	0,71
FAO(U/L)	69,5±28,3	43,0±28,3	0,03
Scls (ng/dL)	1,6±0,8	2,1±1,1	0,17
DPD (nmol/L)	27,9±21,2	19,2±12,2	0,24
25(OH)Vit.D (ng/dL)	11,8±6,1	13,0±6,5	0,60
FGF-23s (pg/mL)	492 (414-1583)	481 (369-925)	0,56
Calcif. vasc. (%)	25	24	0,94
Sclo*	7,3±5,5	11,6±7,4	0,05
FGF-23o*	2,51 (1,24-6,0)	2,36 (1,76-10,7)	0,61

Cai: cálcio ionizado; P: fósforo; FAO: fosfatase alcalina óssea; DPD: Deoxipiridinolina; PTHi: paratormônio intacto; FGF-23s: *fibroblast growth factor* 23 sérico; FGF-23o: *fibroblast growth factor* 23 ósseo; Scls: esclerostina sérica; Sclo: esclerostina óssea.

* Resultados expressos através do número de osteócitos com marcação positiva em relação à área de osso obtida na análise histomorfométrica.

Tabela 5. Comparação dos parâmetros clínicos e laboratoriais entre pacientes com volume ósseo normal/alto versus baixo

VOLUME			
	Normal/Alto (n=25)	Baixo (n=16)	p
Idade (anos)	48,3±11,6	53,3±6,6	0,30
Diabetes (%)	36,0	56,2	0,20
Tempo DP (meses)	14 (8-34)	8 (7-12,5)	0,05
Diurese (mL/24h)	920±665	1164±668	0,32
Cai (mg/dL)	4,8±0,3	4,4±0,9	0,18
P (mg/dL)	5,3±1,8	4,6±1,3	0,30
Albumina (g/dL)	3,4±0,5	3,5±0,5	0,57
PTHi (pg/mL)	335 (220-963)	384 (242-616)	0,84
FAO(U/L)	59,3±34,6	40,7±19,3	0,09
Scls (ng/dL)	1,85±1,1	2,22±0,8	0,17
DPD (nmol/L)	24,9±18,9	17,9±9,5	0,55
25(OH)Vit.D (ng/dL)	12,7±6,5	12,4±6,2	0,83
FGF-23s (pg/mL)	683 (411-1799)	476 (361-497)	0,06
Calcif. vasc. (%)	23,8	25	0,93
FGF-23o*	2,61 (1,6-6,1)	2,27 (1,1-8,8)	0,48
Sclo*	9,6±8,2	11,0±4,9	0,13

Cai: cálcio ionizado; P: fósforo; FAO: fosfatase alcalina óssea; DPD: Deoxipiridinolina; PTHi: paratormônio intacto; FGF-23s: *fibroblast growth factor* 23 sérico; FGF-23o: *fibroblast growth factor* 23 ósseo; Scls: esclerostina sérica; Sclo: esclerostina óssea.

* Resultados expressos através do número de osteócitos com marcação positiva em relação à área de osso obtida na análise histomorfométrica.

Empregando-se um modelo de regressão logística (Tabela 6) com diabetes mellitus, FAO, PTHi, Scl sérica e Scl óssea como covariáveis, observou-se que apenas o *diabetes mellitus* e a FAO foram fatores de risco independentes determinantes do remodelamento ósseo. Outros modelos testados estão expressos na Tabela 6.

Nos modelos de regressão logística para avaliar mineralização e volume ósseos não foram encontrados fatores de risco independentes. Não houve qualquer complicação relacionada às biópsias de crista ilíaca.

Tabela 6. Modelo de Regressão Logística para Remodelamento Ósseo

Variável	Odds Ratio	95% CI		p
		Min.	Max.	
MODELO 1				
Diabetes	8,51	1,46	49,42	0,02
FAO	0,94	0,90	0,99	0,01
MODELO 2				
Diabetes	35,60	3,36	377,6	0,003
FA	0,95	0,91	0,98	0,005

FAO: fosfatase alcalina óssea; FA: total fosfatase alcalina total. Corrigido para idade, iPTH, sScl and DPD.

4.4. MARCADORES BIOQUÍMICOS DE REMODELAMENTO ÓSSEO

A Figura 9 descreve uma curva ROC que avalia a sensibilidade e especificidade do PTHi, FAO, Scl e DPD como marcadores de alto remodelamento ósseo. A FAO se mostrou o melhor marcador, com área sob a curva (ASC) de 0,79. A Scl foi o pior deles, com ASC de 0,70. A FA (ASC 0,78 - dado não representado na figura) apresentou um resultado muito próximo à FAO, superando inclusive o valor do PTHi (0,77). A Tabela 7 demonstra o perfil de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos de cada um dos marcadores bioquímicos usados para o diagnóstico de alto remodelamento ósseo.

A Figura 10 e a Tabela 8 expressam uma análise semelhante, porém direcionada para o diagnóstico de baixo remodelamento ósseo.

Figura 9. Curva ROC para avaliação de sensibilidade e especificidade dos marcadores FAO, PTHi, DPD e Scl no diagnóstico de alto remodelamento ósseo

Tabela 7. Sensibilidade e especificidade dos marcadores FAO, FA, PTHi, DPD e Scl para o diagnóstico de alto remodelamento ósseo

	Sensib.	Especif.	Youden	VPP	VPN
FAO > 57,2 U/L	65%	96%	0,60	0,92	0,95
FA > 106,5 U/L	65%	81%	0,46	0,76	0,80
PTHi >386 pg/mL	70%	62%	0,51	0,77	0,80
DPD > 13,9 nmol/L	75%	62%	0,42	0,65	0,61
Scl < 1,82 ng/dL	85%	62%	0,47	0,68	0,61
PTHi + FA	73%	100%	0,73	1,00	0,76

VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; FAO: fosfatase alcalina óssea; FA: fosfatase alcalina; DPD: Deoxipiridinolina; PTHi: paratormônio intacto; Scl: esclerostina.

Figura 10. Curva ROC para avaliação de sensibilidade e especificidade dos marcadores FAO, PTHi, DPD e Scl no diagnóstico de baixo remodelamento ósseo

Tabela 8. Sensibilidade e especificidade dos marcadores FAO, FA, PTHi, DPD e Scl para o diagnóstico de baixo remodelamento ósseo

	Sensib.	Especif.	Youden	VPP	VPN
FAO < 57,2 U/L	95%	65%	0,60	0,74	0,65
FA < 106,5 U/L	81%	65%	0,46	0,70	0,65
PTHi < 386 pg/mL	81%	70%	0,51	0,73	0,70
DPD < 12,3 nmol/L	61%	80%	0,42	0,72	0,75
Scl > 1,80 ng/dL	61%	85%	0,46	0,81	0,85
PTHi + FA	100%	73%	0,73	0,76	1,00

VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; FAO: fosfatase alcalina óssea; FA: fosfatase alcalina; DPD: Deoxipiridinolina; PTHi: paratormônio intacto; Scl: esclerostina.

Tabela 9: Correlações do PTHi, FAO e DPD com parâmetros clínicos, laboratoriais e de histomorfometria óssea

	PTHi		FAO		DPD	
	r	p	r	p	r	p
CLÍNICOS						
Idade	-0,31	0,04	-0,24	0,12	-0,23	0,13
Diurese	-0,72	0,65	-0,16	0,31	-0,45	0,003
Tempo DP	0,14	0,36	0,05	0,72	0,15	0,32
Calcificação	-0,09	0,58	-0,14	0,39	-0,19	0,24
LABORATORIAIS						
Cai	-0,22	0,16	-0,11	0,49	-0,29	0,07
P	0,75	<0,001	0,16	0,30	0,57	<0,001
PTHi	-	-	0,32	0,03	0,61	<0,001
FAO	0,32	0,03	-	-	0,42	0,005
DPD	0,61	<0,001	0,420	0,005	-	-
25 (OH) Vit. D	0,26	0,10	-0,17	0,29	0,19	0,23
HISTOMORFOMÉTRICOS						
BV/TV	0,048	0,76	0,96	0,55	0,02	0,88
Ob.S/BS	0,44	0,004	0,38	0,01	0,35	0,02
OV/BV	0,16	0,30	0,09	0,55	0,08	0,61
O.Th	0,31	0,04	0,24	0,13	0,11	0,49
MS/BS	0,53	0,001	0,47	0,004	0,20	0,24
BFR/BS	0,37	0,01	0,49	0,001	0,13	0,39
Mlt	-0,20	0,19	-0,45	0,003	-0,03	0,81
ES/BS	0,44	0,003	0,70	<0,001	0,41	0,006
Oc.S/BS	0,47	0,002	0,53	<0,001	0,39	0,01
Fb.V/TV	0,59	<0,001	0,51	0,001	0,48	0,001

PTHi: paratormônio intacto; FAO: fosfatase alcalina óssea; Ob.S: superfície osteoblástica; BS: superfície de osso trabecular; OV: volume osteoide; BV: volume ósseo; O.Th: espessura osteoide; ES: superfície de erosão; Oc.S: superfície osteoclástica; MS: superfície mineralizada; BFR: taxa de formação óssea; Mlt: intervalo de mineralização; Fb.V/TV: volume de fibrose/volume trabecular.

As correlações do FGF-23 e da Scl com parâmetros clínicos, bioquímicos e histomorfométricos estão expressas a seguir (tópicos 4.5 e 4.6), em conjunto com as respectivas expressões ósseas.

4.5. EXPRESSÃO ÓSSEA DE FGF-23 E Scl

A expressão óssea da Scl - avaliada por técnica de imuno-histoquímica - mostrou-se aumentada nos pacientes, quando comparados aos controles. O mesmo não ocorreu com o FGF-23 (Tabela 10). Os diabéticos expressaram mais Scl no tecido ósseo que os não diabéticos (Tabela 11).

Tabela 10: FGF-23 e Scl expressos em tecido ósseo

	Resultados	Valores Referência
FGF-23 ósseo*	2,41 (1,74-5,67)	4,94 (3,74 - 8,82)
Scl óssea*	9,45±7,11	6,58±3,67

* Resultados expressos através do número de osteócitos com marcação positiva em relação à área de osso obtida na análise histomorfométrica.

Tabela 11: Comparação entre não diabéticos e diabéticos quanto ao FGF-23 e Scl expressos em tecido ósseo

	Não Diabéticos (n = 23)	Diabéticos (n = 18)	p
FGF-23 ósseo*	2,61 (1,51-6,58)	2,38 (1,68-6,11)	0,80
Scl óssea*	8,72±6,67	11,94±7,45	0,003

* Resultados expressos através do número de osteócitos com marcação positiva em relação à área de osso obtida na análise histomorfométrica.

4.6. CORRELAÇÕES DOS NÍVEIS SÉRICOS E DA EXPRESSÃO ÓSSEA DE FGF-23 COM DADOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E DE HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA

A Tabela 12 descreve as correlações entre os valores de FGF-23 séricos e expressos no osso com os dados clínicos, laboratoriais e de histomorfometria óssea dos pacientes estudados. Os níveis de fósforo se correlacionaram tanto com os níveis séricos, quanto com a expressão óssea do FGF-23 (vide Figuras 11 e 12). A idade e o Cai se correlacionaram inversamente com o FGF-23 sérico e ósseo, respectivamente. O tempo de diálise, o PTHi, a DPD e a 25(OH) vitamina D apresentaram correlação apenas com o FGF-23 sérico.

Tabela 12: Correlações do FGF-23 sérico e expresso no tecido ósseo com parâmetros clínicos, laboratoriais e de histomorfometria óssea

	FGF-23 Sérico		FGF-23 Ósseo	
	r	p	r	p
CLÍNICOS				
Idade	-0,40	0,01	-0,02	0,86
Diurese	-0,15	0,34	-0,11	0,47
Tempo DP	0,44	0,005	-0,11	0,48
Calcificação	-0,12	0,48	0,17	0,30
LABORATORIAIS				
Cai	0,17	0,31	-0,31	0,05
P	0,60	<0,001	0,34	0,02
FAO	-0,06	0,72	0,01	0,92
DPD	0,37	0,02	0,15	0,33
PTHi	0,53	0,001	0,17	0,26
25 (OH) Vit. D	0,39	0,01	-0,01	0,93
Albumina	0,20	0,22	-0,16	0,31
FGF ósseo	-0,009	0,95	-	-
HISTOMORFOMÉTRICOS				
BV/TV	0,39	0,01	-0,04	0,76
ObS/BS	0,28	0,07	-0,05	0,74
OV/BV	-0,005	0,97	-0,07	0,62
O.Th	0,19	0,23	-0,09	0,54
MS/BS	0,36	0,03	-0,08	0,61
BFR/BS	0,20	0,22	-0,25	0,11
Mlt	-0,006	0,97	0,19	0,22
ES/BS	0,30	0,06	0,12	0,44
OcS/BS	0,32	0,04	0,05	0,75
Fb.V/TV	0,50	0,001	0,012	0,94

PTHi: paratormônio intacto; FAO: fosfatase alcalina óssea; Ob.S: superfície osteoblástica; BS: superfície de osso trabecular; OV: volume osteoide; BV: volume ósseo; O.Th: espessura osteoide; ES: superfície de erosão; OcS: superfície osteoclástica; MS: superfície mineralizada; BFR: taxa de formação óssea; Mlt: intervalo de mineralização; Fb.V/TV: volume de fibrose/volume trabecular.

Figura 11. Gráfico de regressão linear log FGF-23 sérico x Fósforo.

Figura 12. Gráfico de regressão linear log FGF-23 ósseo x Fósforo.

4.7. CORRELAÇÕES DOS NÍVEIS SÉRICOS E DA EXPRESSÃO ÓSSEA DA Scl COM DADOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E DE HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA

Tanto a Scl sérica quanto a expressa no tecido ósseo se correlacionaram inversamente com o BFR/BS e com a FAO. A Tabela 13 resume as principais correlações encontradas entre a Scl e os parâmetros analisados. A Figura 13 descreve a regressão linear entre a Scl sérica e o logBFR/BS, enquanto a Figura 14 demonstra a regressão linear entre a Scl óssea e o logBFR/BS.

Tabela 13: Correlações da Scl sérica e expressa no tecido ósseo com parâmetros clínicos, laboratoriais e histomorfométricos

	Scl Sérica		Scl Óssea	
	r	p	r	p
CLÍNICOS				
Idade	0,27	0,08	0,04	0,77
Diurese	0,04	0,77	-0,27	0,08
Tempo DP	-0,06	0,70	0,002	0,98
Calcificação	0,13	0,43	0,007	0,96
LABORATORIAIS				
Cai	0,19	0,23	-0,22	0,17
P	-0,26	0,09	0,006	0,97
FAO	-0.48	0.001	-0.39	0,01
DPD	-0,12	0,44	-0,01	0,91
PTHi	-0,21	0,16	-0,18	0,23
25 (OH) Vit. D	0,02	0,86	-0,08	0,62
Albumina	0,07	0,63	-0,19	0,23
Scl óssea	0,28	0,07	-	-
HISTOMORFOMÉTRICOS				
BV/TV	-0,11	0,49	-0,16	0,30
ObS/BS	-0.35	0.02	-0,07	0,62
OV/BV	-0,31	0,04	-0,003	0,98
O.Th	-0.44	0.003	-0,15	0,33
BFR/BS	-0,31	0,04	-0,34	0,02
Mlt	0,23	0,14	0,34	0,02
MS/BS	-0,37	0,02	-0,28	0,09
ES/BS	-0,40	0,01	-0,24	0,11
Oc.S/BS	-0.38	0,01	-0,13	0,38
Fb.V/TV	-0,37	0,01	-0,21	0,17

PTHi: paratormônio intacto; FAO: fosfatase alcalina óssea; Ob.S: superfície osteoblástica; BS: superfície de osso trabecular; OV: volume osteoide; BV: volume ósseo; O.Th: espessura osteoide; ES: superfície de erosão; Oc.S: superfície osteoclástica; MS: superfície mineralizada; BFR: taxa de formação óssea; Mlt: intervalo de mineralização; Fb.V/TV: volume de fibrose/volume trabecular.

Figura 13. Gráfico de regressão linear $\log \text{BFR/BS}$ x Scl sérica.

Figura 14. Gráfico de regressão linear $\log \text{BFR/BS}$ x expressão óssea de Scl .

4.8. COMPARAÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E HISTOMORFOMÉTRICOS OBTIDOS DE PACIENTES NÃO DIABÉTICOS TRATADOS COM DP E COM HD

Após pareamento por sexo, idade e tempo de diálise, 23 pacientes em HD foram comparados a 23 pacientes em DP (Tabela 14). Os níveis séricos de FGF-23 (Figura 15) e de 25(OH) vitamina D (Figura 16) foram significativamente mais elevados nos enfermos em HD. Os pacientes da DP apresentaram níveis mais baixos de Cai e DPD; e níveis mais elevados de PTHi e FAO. A comparação dos dados de histomorfometria óssea mostrou uma semelhança na taxa de formação óssea (remodelamento). Em contrapartida, os parâmetros que avaliam volume ósseo (BV/TV, Tb.N e Tb.Sp) foram mais favoráveis à DP e aquele que avaliou a mineralização (Mlt) foi mais favorável à HD.

Tabela 14 . Comparação entre pacientes não diabéticos tratados com HD e DP

	HD (n=23)	DP (n=23)	p
Parâmetros Clínicos			
Idade (anos)	47±13	47±11	0,99
Sexo ♀ (%)	34,8	47,8	0,550
Tempo em diálise (meses)	19,4±8,4	20,3±16,6	0,816
Parâmetros Laboratoriais			
Cai (mg/dL)	5,03±0,41	4,76±0,38	0,038
P (mg/dL)	5,0±1,3	5,6±1,5	0,115
FAO (UI/L)	17,6 (13,4-27,3)	51,1 (26,5-91,8)	<0,001
PTHi (pg/mL)	143 (55-275)	430 (265-1111)	<0,001
DPD (nmol/L)	71,2 (31,3-96,5)	21,5 (11,6-30,3)	<0,001
FGF-23 (pg/mL)	10958 (3129-25205)	855 (488-2459)	0,001
25 (OH) Vitamina D (ng/mL)	31,1±12,0	15,5±7,1	<0,001
Parâmetros Histomorfométricos			
BV/TV (%)	17,37±7,0	22,59±7,2	0,017
Tb.Sp (µm)	607±248	416±150	0,003
Tb.N (mm)	1,52±0,44	2,03±0,55	0,001
OV/BV (%)	1,9 (1,1-3,9)	4,3 (1,2-7,8)	0,109
O.th(µm)	7,82±2,24	8,20±3,39	0,660
BFR/BS (x10 ⁻³) (µm ³ /µm ² /dia)	0,020 (0,003-0,03)	0,017 (0,002-0,034)	0,407
Mlt (dias)	52,6 (24-311)	151 (39-728)	0,037
Oc.S/BS (%)	0,66±0,6	0,44±0,4	0,169
ES/BS (%)	4,28±5,0	7,19±5,7	0,074

BV/TV: volume ósseo/volume trabecular; Tb.Sp: separação trabecular; Tb.N: número de trabéculas; OV/BV: volume osteoide/volume ósseo; O.th: espessura osteoide; BFR/BS: taxa de formação óssea/superfície óssea; Mlt: intervalo de aposição mineral; OcS/BS: superfície osteoclástica/superfície óssea; ES/BS: superfície de erosão/superfície óssea.

Figura 15. Comparação dos níveis séricos de FGF-23 entre pacientes não diabéticos tratados com HD e DP.

Figura 16. Comparação dos níveis séricos de 25 (OH) Vitamina D entre pacientes não diabéticos tratados com HD e DP.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo revela que pacientes sob DP, relativamente jovens, com boa adequação ao tratamento e que não haviam realizado qualquer outra forma de terapia de substituição renal anteriormente apresentaram prevalência elevada de DOA. Esse resultado foi semelhante ao de outros estudos descritos na literatura. Entretanto, na maioria deles os pacientes eram mais idosos, alguns eram paratireoidectomizados, outros haviam realizado transplante renal ou HD previamente e não raro apresentavam intoxicação por alumínio (6,74,75).

Os principais fatores de risco implicados no desenvolvimento da DOA são a idade avançada, uremia, sobrecarga de cálcio, supressão exagerada do PTH através do uso de calcitriol e análogos, a própria DP e a presença de diabetes mellitus (16,76).

A população do nosso estudo era relativamente jovem ($50,3 \pm 10,2$ anos) e apresentava boa adequação à diálise, segundo o KT/V semanal. Ainda assim a prevalência de DOA foi muito elevada.

A sobrecarga de cálcio por via oral foi pequena, visto que o principal quelante de fósforo utilizado foi o hidrocloreto de sevelamer. Em contrapartida, praticamente todos os pacientes utilizaram dialisatos ricos em cálcio, o que sabidamente induz o baixo remodelamento ósseo. Haris e cols descreveram, inclusive, a capacidade de reversão da DOA após redução da concentração de cálcio na solução de diálise em pacientes tratados com DP (77).

Cerca de 1/3 dos enfermos estudados fazia uso de calcitriol. No entanto, apenas 4,8% apresentava PTHi inferior a 150 pg/mL, o que descarta a possibilidade de supressão exagerada do PTH.

Em relação à modalidade dialítica, 100% da amostra fazia DP. Quando excluímos os diabéticos da análise e comparamos pacientes tratados com DP com pacientes tratados com HD - pareados por idade, sexo e tempo dialítico - não se observou diferença no "turnover" ósseo. Em contrapartida, o volume ósseo foi mais preservado nos pacientes do grupo DP. Pelletier e cols. demonstraram que a microarquitetura óssea é mais poupada em pacientes tratados com DP que naqueles tratados com HD (78). Tal informação está de acordo com os nossos achados e parece ser decorrente do melhor controle da acidose com a modalidade peritoneal de diálise.

Por fim, a prevalência de diabetes mellitus foi bastante elevada entre os nossos pacientes (43,9%) e teve papel decisivo como fator de risco para DOA. Ao se comparar a população com e sem diabetes, a prevalência de DOA foi muito discrepante. Enquanto no primeiro grupo observou-se 78% de DOA, no segundo, mesmo utilizando elevadas concentrações de cálcio no dialisato, a prevalência foi de apenas 26%.

Existem três teorias que tentam explicar os mecanismos fisiopatológicos que levariam os diabéticos a desenvolver DOA (76,79). A primeira delas atribui aos produtos finais da glicosilação avançada a responsabilidade por um aumento na apoptose osteoblástica, com consequente redução na formação óssea.

A segunda implica a hipovitaminose D - bastante prevalente em nosso estudo, sobretudo entre os diabéticos - como responsável pela redução do remodelamento ósseo. A deficiência de vitamina D dificulta a diferenciação osteoblástica e, consequentemente, a formação óssea. Vale ressaltar que apenas a forma ativa da vitamina D atua no osso. No entanto, recentemente Zhou e cols. documentaram que a medula óssea é capaz de promover a diferenciação osteoblástica através de um estímulo com 25(OH) vitamina D, que seria convertida em 1,25(OH) vitamina D de forma autócrina e/ou parácrina, através da 1- α hidroxilase local (80). No nosso estudo os

diabéticos não apresentaram correlação entre os níveis de 25(OH) vitamina D e os parâmetros de formação, mineralização e volume ósseos.

A terceira teoria, bem mais recente, atribui à Scl a responsabilidade pelo desenvolvimento da DOA. Ao inibir a via Wnt/ β catenina a Scl reduz a atividade osteoblástica e, conseqüentemente, a formação óssea. Nossos achados estão em linha com essa teoria. Observamos maiores níveis de Scls e expressa em tecido ósseo entre os pacientes diabéticos. Ambas se correlacionaram inversamente com a taxa de formação óssea (Figuras 13 e 14).

Sabbagh e cols, em um elegante estudo, observaram que a taxa de formação óssea diminui precocemente na uremia e que esse fato coincidiu com o aumento da expressão de Scl no tecido ósseo. Tais alterações precederam a elevação do PTH, sugerindo que a Scl interfere no remodelamento ósseo antes mesmo do PTH (64). De fato, os valores de PTHi dos nossos pacientes diabéticos estavam na faixa de recomendação do KDIGO. Ainda assim a prevalência de baixo remodelamento ósseo foi muito elevada.

Estudos *in vitro* demonstraram que a Scl também induz a expressão do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa beta (RANKL), com conseqüente aumento da atividade osteoclástica e perda óssea por aumento da reabsorção (64,81). Nossos achados vão de encontro a essas publicações, pois observamos uma correlação inversa entre os níveis de Scl e os marcadores de reabsorção (OcS/BS e ES/BS). Vale ressaltar que aumento de reabsorção óssea não faz parte do quadro de DOA.

Cerca de 46% dos nossos pacientes apresentavam níveis de fósforo dentro da faixa de recomendação do KDIGO (2). Alguns autores descrevem que a DP tem uma capacidade de depuração de fósforo superior à HD clássica (82). Não foi o que observamos. Mesmo com a presença de uma diurese residual de aproximadamente 1000

mL/24h os doentes tratados com DP apresentaram níveis de fósforo semelhantes aos de pacientes anúricos tratados com HD (Tabela 14). Merece menção o fato de que a fosfatemia sofre influência não apenas da depuração de fósforo na diálise, mas também da ingesta dietética, do tamponamento ósseo e da sua eliminação fecal e urinária.

Observamos evidente correlação entre os níveis de fósforo e de FGF-23 (Figuras 11 e 12). Tais achados estão em linha com recentes pesquisas que determinaram o papel desta proteína na regulação do metabolismo do fósforo (59,60,83).

Nossos pacientes apresentaram níveis de FGF-23 superiores ao limite superior da normalidade, mas não tão elevados quanto nos pacientes anúricos tratados com HD. Houve uma correlação positiva do FGF-23 com o tempo de diálise e com os parâmetros de reabsorção óssea, e negativa com a idade. Esses achados são reflexo, em última análise, dos níveis séricos de fósforo. Os pacientes mais idosos apresentavam fósforo mais baixo, possivelmente por menor ingesta proteica. Em contrapartida, aqueles com maior tempo em DP apresentavam fósforo mais alto, assim como aqueles com doenças ósseas que cursam com aumento de reabsorção óssea (osteíte fibrosa e doença mista). Isakova e cols também encontraram uma correlação positiva do FGF-23 com o tempo dialítico, e negativa com a função renal residual (59).

A mediana de PTHi dos nossos pacientes foi de 363 pg/mL, com 65,9% dos casos dentro da faixa recomendada pelo KDIGO. Assim, com níveis de PTH razoavelmente controlados, era de se esperar que a histologia óssea se mostrasse menos alterada. Tal discrepância ressalta que a orientação terapêutica baseada exclusivamente no PTHi não é uma boa prática.

A hipovitaminose D foi uma constante em nosso estudo, com 100% dos pacientes apresentando 25(OH) vitamina D inferior a 30 ng/dL. Alguns autores documentaram a perda de vitamina D através do efluente peritoneal, o que pode

justificar o elevado percentual de insuficiência e, sobretudo, deficiência dessa vitamina na nossa casuística (57,84). Tal hipótese ganha força ao se observar a evidente diferença nos níveis de 25(OH) vitamina D entre os grupos de pacientes tratados com HD e DP, o que pode ter contribuído para um maior defeito de mineralização no último grupo. Vale ressaltar que os diabéticos foram excluídos da análise.

A importância prática desse achado ainda é muito discutível. Alguns estudos de associação sugerem que a manutenção de níveis adequados de vitamina D promoveria ações importantes sobre alguns sistemas orgânicos, dentre eles o imunológico e o endocrinológico (controle glicêmico) (52,53). Ambas ações seriam sumamente importantes para pacientes tratados com DP, pois o uso do cateter de Tenckhoff aumenta o risco de peritonite e a sobrecarga de dextrose através do dialisato aumenta o risco de diabetes mellitus tipo II.

As radiografias de mãos e quadris detectaram calcificação extra-esquelética em aproximadamente 25% dos nossos enfermos, com maior presença entre os diabéticos. Adragão e cols., utilizando o mesmo critério radiológico, observaram calcificação em 77% dos 101 pacientes analisados em seu estudo. No entanto, tratavam-se de pacientes em HD, mais idosos e com tempo dialítico superior a 55 meses.

Nenhum dos marcadores bioquímicos avaliados no presente estudo se mostrou um bom preditor de calcificação extra-esquelética. Vale ressaltar que o método radiológico utilizado não é o padrão ouro para detecção de calcificação.

Dentre os parâmetros avaliados na classificação TMV, o "turnover" ósseo é o que mais influencia em mudanças práticas de conduta. Estudos do final da década de 1990 sugerem que tanto no alto, quanto no baixo remodelamento o osso perde a capacidade de tamponamento mineral. Ambas as situações parecem aumentar o risco de fraturas e eventos cardiovasculares (85,86). Por tal motivo, a busca por um marcador

bioquímico capaz de diferenciar adequadamente alto e baixo "turnover" é tão importante.

Nossos achados demonstram que a FA é um bom marcador de remodelamento ósseo. A sua fração óssea, por ser mais específica, ganha utilidade nos casos de produção extra-óssea aumentada, sobretudo nas hepatopatias. Assim como na publicação de Bervoets e cols.(43), encontramos discreta superioridade da FA em relação ao PTHi. Para pacientes com função hepática normal, a análise da FA associada ao PTHi parece uma boa conduta, o que possibilita reservar a biópsia de crista ilíaca para os casos duvidosos. Vale ressaltar que o remodelamento ósseo é um processo lento, com duração de meses. Em contrapartida os marcadores bioquímicos têm meia vida bem mais curta, sobretudo o PTH, que é extremamente lábil e oscila diante de mínimas variações da calcemia (87).

Por fim, na DRC é comum se observar elevação dos níveis circulantes de uma série de proteínas devido ao aumento de produção das mesmas e/ou acúmulo, decorrente da redução de depuração renal. O desenvolvimento de técnicas de imunohistoquímica para detecção de proteínas expressas em tecido ósseo tem possibilitado diferenciar as duas situações (aumento de produção versus redução de depuração). Além disso, permite uma observação mais detalhada do microambiente ósseo.

Desconhecemos qualquer outra publicação que tenha avaliado a expressão óssea da Scl e do FGF-23 em pacientes adultos tratados com DP. Encontramos uma expressão aumentada de Scl nas trabéculas ósseas, o que deve ter contribuído para elevação dos seus níveis séricos. Por outro lado, não se detectou aumento na expressão óssea de FGF-23, sugerindo que a elevação dos seus níveis circulantes se deu por redução na depuração renal. Pereira e cols. detectaram uma elevada expressão de FGF-23 nos ossos

de 32 crianças e adultos jovens portadores de DRC estadio II a V (88). Graciolli e cols. (dados não publicados) também encontraram uma expressão óssea de FGF-23 aumentada em portadores de DRC tratados com HD. Tais achados vão de encontro aos portadores de DRC, tratados com DP, do nosso estudo.

As principais limitações do presente trabalho são: I. Trata-se de uma coorte transversal e, portanto, não nos permite chegar a conclusões sobre causalidade; II. O tempo de tratamento com DP foi relativamente curto; III. Não foi possível analisar os níveis séricos de Scl e FAO da amostra de pacientes da HD, pois não havia mais soro estocado.

6. CONCLUSÕES

A DOA ainda é o tipo de OR mais encontrado na DP, mesmo com as mudanças na terapêutica e no perfil dos pacientes ocorridas nas últimas décadas. No entanto, a influência do diabetes mellitus como fator de risco é mais importante que a própria modalidade dialítica. Nossos resultados deixam claro que a DP *per se* não deve ser considerada um fator de risco isolado para DOA.

A FAO guarda boa sensibilidade e especificidade para a diferenciação entre alto e baixo remodelamento ósseo nos pacientes tratados com DP. Entretanto, a combinação PTHi e FA, disponível na maioria dos serviços, apresenta eficácia superior para indivíduos com função hepática normal.

Diante desses achados, o uso de dialisatos com baixas concentrações de cálcio seria o mais recomendado para diabéticos em DP, sobretudo para aqueles que apresentam baixos níveis de PTHi, FA e/ou FAO. Por outro lado, para os não diabéticos o espectro de doenças ósseas é bem mais amplo e exige uma individualização de condutas, baseada em características clínicas, marcadores bioquímicos e, em casos duvidosos, biópsia óssea.

Por fim, a deficiência de 25(OH) vitamina D é uma constante nos pacientes em DP e merece atenção por parte dos nefrologistas que lidam com esses doentes. Estudos intervencionistas, prospectivos, randomizados, placebo-controlados e cegos devem ser desenvolvidos, pois ainda há muita especulação sobre o real papel dessa vitamina no organismo humano.

7. REFERÊNCIAS

1. Sesso RC, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Santos DRD. 2010 report of the Brazilian dialysis census. *J Bras Nefrol.* dezembro de 2011;33(4):442–7.
2. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl.* agosto de 2009;(113):S1–130.
3. Hruska KA, Teitelbaum SL. Renal osteodystrophy. *N Engl J Med.* 20 de julho de 1995;333(3):166–74.
4. Barreto FC, Barreto DV, Moyses RMA, Neves CL, Jorgetti V, Draibe SA, et al. Osteoporosis in hemodialysis patients revisited by bone histomorphometry: a new insight into an old problem. *Kidney Int.* maio de 2006;69(10):1852–7.
5. Oreopoulos DG. Chronic peritoneal dialysis. *Clin Nephrol.* abril de 1978;9(4):165–73.
6. Carmen Sánchez M, Auxiliadora Bajo M, Selgas R, Mate A, Millán I, Eugenia Martínez M, et al. Parathormone secretion in peritoneal dialysis patients with adynamic bone disease. *Am J Kidney Dis.* novembro de 2000;36(5):953–61.
7. Sánchez C, López-Barea F, Sánchez-Cabezudo J, Bajo A, Mate A, Martínez E, et al. Low vs standard calcium dialysate in peritoneal dialysis: differences in treatment, biochemistry and bone histomorphometry. A randomized multicentre study. *Nephrol Dial Transplant.* junho de 2004;19(6):1587–93.
8. Sánchez-González MC, López-Barea F, Bajo MA, Selgas R. Serum albumin levels, an additional factor implicated in hyperparathyroidism outcome in peritoneal dialysis: a prospective study with paired bone biopsies. *Adv Perit Dial.* 2006;22:198–202.
9. Joffe P, Heaf JG, Hyldstrup L. Osteocalcin: a non-invasive index of metabolic bone disease in patients treated by CAPD. *Kidney Int.* setembro de 1994;46(3):838–46.
10. Brown CB, Hamdy NA, Boletis J, Boyle G, Beneton MN, Charlesworth D, et al. Osteodystrophy in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Perit Dial Int.* 1993;13 Suppl 2:S454–460.
11. . *J Bras Nefrol.* 2002;24(2):97–102.
12. Araújo SMHA, Ambrosoni P, Lobão RRS, Caorsi H, Moyses RMA, Barreto FC, et al. The renal osteodystrophy pattern in Brazil and Uruguay: an overview. *Kidney Int Suppl.* junho de 2003;(85):S54–56.

13. - [Livre Docência]. [São Paulo]: USP; 2011.
14. Moe SM. Management of renal osteodystrophy in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int.* junho de 2004;24(3):209–16.
15. Couttenye MM, D’Haese PC, Deng JT, Van Hoof VO, Verpooten GA, De Broe ME. High prevalence of adynamic bone disease diagnosed by biochemical markers in a wide sample of the European CAPD population. *Nephrol Dial Transplant.* outubro de 1997;12(10):2144–50.
16. Sanchez CP. Adynamic bone revisited: is there progress? *Perit Dial Int.* fevereiro de 2006;26(1):43–8.
17. Yamamoto H, Kasai K, Hamada C, Hasegawa H, Higuchi C, Hiramatsu M, et al. Differences in corrective mode for divalent ions and parathyroid hormone between standard- and low-calcium dialysate in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis--result of a nationwide survey in Japan. *Perit Dial Int.* junho de 2008;28 Suppl 3:S128–130.
18. Takahashi S, Okada K, Yanai M. Magnesium and parathyroid hormone changes to magnesium-free dialysate in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int.* 1994;14(1):75–8.
19. Moraes TP de, Bucharles SGE, Ribeiro SC, Frumento R, Riella MC, Pecoits-Filho R. Low-calcium peritoneal dialysis solution is effective in bringing PTH levels to the range recommended by current guidelines in patients with PTH levels < 150 pg/dL. *J Bras Nefrol.* setembro de 2010;32(3):275–80.
20. Stefanović V, Mitić M, Golubović E, Rajić M, Avramović V, Ignjatović I. Transperitoneal removal of osteocalcin, calcitonin and parathyroid hormone in patients treated by CAPD. *Nephron.* 1996;74(1):216–7.
21. Martinez M, Ausejo M, Miguel JL, Gonzalez ML, Balaguer G, Catalan P, et al. Comparative study between intact PTH and fragments of PTH in patients on hemodialysis and CAPD. *Perit Dial Int.* 1991;11(2):137–40.
22. Coco M, Rush H. Increased incidence of hip fractures in dialysis patients with low serum parathyroid hormone. *Am J Kidney Dis.* dezembro de 2000;36(6):1115–21.
23. Moe SM. Vascular calcification and renal osteodystrophy relationship in chronic kidney disease. *Eur J Clin Invest.* agosto de 2006;36 Suppl 2:51–62.
24. Hutchison AJ, Whitehouse RW, Boulton HF, Adams JE, Mawer EB, Freemont TJ, et al. Correlation of bone histology with parathyroid hormone, vitamin D3, and radiology in end-stage renal disease. *Kidney Int.* novembro de 1993;44(5):1071–7.
25. Qi Q, Monier-Faugere MC, Geng Z, Malluche HH. Predictive value of serum parathyroid hormone levels for bone turnover in patients on chronic maintenance dialysis. *Am J Kidney Dis.* outubro de 1995;26(4):622–31.

26. Atsumi K, Kushida K, Yamazaki K, Shimizu S, Ohmura A, Inoue T. Risk factors for vertebral fractures in renal osteodystrophy. *Am J Kidney Dis.* fevereiro de 1999;33(2):287–93.
27. García-López E, Carrero JJ, Suliman ME, Lindholm B, Stenvinkel P. Risk factors for cardiovascular disease in patients undergoing peritoneal dialysis. *Perit Dial Int.* junho de 2007;27 Suppl 2:S205–209.
28. Yang X, Fang W, Kothari J, Khandelwal M, Naimark D, Jassal SV, et al. Clinical outcomes of elderly patients undergoing chronic peritoneal dialysis: experiences from one center and a review of the literature. *Int Urol Nephrol.* 2007;39(4):1295–302.
29. Ammirati AL, Dalboni MA, Cendoroglo M, Draibe SA, Santos RD, Miname M, et al. The progression and impact of vascular calcification in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int.* junho de 2007;27(3):340–6.
30. Kanis JA. Osteomalacia and chronic renal failure. *J Clin Pathol.* novembro de 1981;34(11):1295–307.
31. Malluche HH, Monier-Faugere MC. The role of bone biopsy in the management of patients with renal osteodystrophy. *J Am Soc Nephrol.* março de 1994;4(9):1631–42.
32. Hörl WH. The clinical consequences of secondary hyperparathyroidism: focus on clinical outcomes. *Nephrol Dial Transplant.* agosto de 2004;19 Suppl 5:V2–8.
33. Yasuda G, Ogawa N, Shimura G, Ando D, Hasegawa K, Kuji T, et al. Does secondary hyperparathyroidism play a primary role in causing peritoneal calcification in patients on CAPD? *Perit Dial Int.* dezembro de 2004;24(6):596–7.
34. Billa V, Zhong A, Bargman J, Vas S, Wong PY, Oreopoulos DG. High prevalence of hyperparathyroidism among peritoneal dialysis patients: a review of 176 patients. *Perit Dial Int.* junho de 2000;20(3):315–21.
35. Cejka D, Herberth J, Branscum AJ, Fardo DW, Monier-Faugere M-C, Diarra D, et al. Sclerostin and Dickkopf-1 in renal osteodystrophy. *Clin J Am Soc Nephrol.* abril de 2011;6(4):877–82.
36. Tanno Y, Yokoyama K, Nakayama M, Katoh A, Yamamoto H, Iwasaki Y, et al. IRMA (whole PTH) is a more useful assay for the effect of PTH on bone than the Allegro intact PTH assay in CAPD patients with low bone turnover marker. *Nephrol Dial Transplant.* junho de 2003;18 Suppl 3:iii97–98.
37. Coen G, Bonucci E, Ballanti P, Balducci A, Calabria S, Nicolai GA, et al. PTH 1-84 and PTH “7-84” in the noninvasive diagnosis of renal bone disease. *Am J Kidney Dis.* agosto de 2002;40(2):348–54.
38. K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* outubro de 2003;42(4 Suppl 3):S1–201.

39. Barreto FC, Barreto DV, Moysés RMA, Neves KR, Canziani MEF, Draibe SA, et al. K/DOQI-recommended intact PTH levels do not prevent low-turnover bone disease in hemodialysis patients. *Kidney Int.* março de 2008;73(6):771–7.
40. Dimkovic NB, Bargman J, Vas S, Oreopoulos DG. Normal or low initial PTH levels are not a predictor of morbidity/mortality in patients undergoing chronic peritoneal dialysis. *Perit Dial Int.* abril de 2002;22(2):204–10.
41. Ureña P, Hruby M, Ferreira A, Ang KS, de Vernejoul MC. Plasma total versus bone alkaline phosphatase as markers of bone turnover in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* março de 1996;7(3):506–12.
42. Couttenye MM, D’Haese PC, Van Hoof VO, Lemoniatou E, Goodman W, Verpooten GA, et al. Low serum levels of alkaline phosphatase of bone origin: a good marker of adynamic bone disease in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* junho de 1996;11(6):1065–72.
43. Bervoets ARJ, Spasovski GB, Behets GJ, Dams G, Polenakovic MH, Zafirovska K, et al. Useful biochemical markers for diagnosing renal osteodystrophy in predialysis end-stage renal failure patients. *Am J Kidney Dis.* maio de 2003;41(5):997–1007.
44. Coen G, Ballanti P, Bonucci E, Calabria S, Centorrino M, Fassino V, et al. Bone markers in the diagnosis of low turnover osteodystrophy in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* setembro de 1998;13(9):2294–302.
45. Balemans W, Ebeling M, Patel N, Van Hul E, Olson P, Dionszegi M, et al. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet.* 1 de março de 2001;10(5):537–43.
46. VAN BUCHEM FS, HADDERS HN, UBBENS R. An uncommon familial systemic disease of the skeleton: hyperostosis corticalis generalisata familiaris. *Acta radiol.* agosto de 1955;44(2):109–20.
47. Spatz J, Ellman R, Cloutier A, Louis L, van Vliet M, Suva L, et al. Sclerostin antibody inhibits skeletal deterioration due to reduced mechanical loading. *J Bone Miner Res.* 29 de outubro de 2012;
48. Padhi D, Jang G, Stouch B, Fang L, Posvar E. Single-dose, placebo-controlled, randomized study of AMG 785, a sclerostin monoclonal antibody. *J Bone Miner Res.* janeiro de 2011;26(1):19–26.
49. Costa AG, Bilezikian JP. Sclerostin: therapeutic horizons based upon its actions. *Curr Osteoporos Rep.* março de 2012;10(1):64–72.
50. Ureña P, Ferreira A, Kung VT, Morieux C, Simon P, Ang KS, et al. Serum pyridinoline as a specific marker of collagen breakdown and bone metabolism in hemodialysis patients. *J Bone Miner Res.* junho de 1995;10(6):932–9.
51. Grzegorzewska AE, Mlot M. Using the ratio of serum osteoprotegerin ligand to osteoprotegerin to evaluate renal osteodystrophy in dialysis patients. *Adv Perit Dial.* 2005;21:188–93.

52. Rudnicki M, Kerschbaum J, Hausdorfer J, Mayer G, König P. Risk factors for peritoneal dialysis-associated peritonitis: the role of oral active vitamin d. *Perit Dial Int.* outubro de 2010;30(5):541–8.
53. Bindal ME, Taskapan H. Hypovitaminosis D and insulin resistance in peritoneal dialysis patients. *Int Urol Nephrol.* junho de 2011;43(2):527–34.
54. Wang AY-M, Lam CW-K, Sanderson JE, Wang M, Chan IH-S, Lui S-F, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D status and cardiovascular outcomes in chronic peritoneal dialysis patients: a 3-y prospective cohort study. *Am J Clin Nutr.* junho de 2008;87(6):1631–8.
55. Afzal S, Lange P, Bojesen SE, Freiberg JJ, Nordestgaard BG. Plasma 25-hydroxyvitamin D, lung function and risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 1 de agosto de 2013;
56. Afzal S, Bojesen SE, Nordestgaard BG. Reduced 25-hydroxyvitamin D and risk of Alzheimer's disease and vascular dementia. *Alzheimers Dement.* 18 de julho de 2013;
57. Sahin G, Kirli I, Sirmagul B, Colak E, Yalcin AU. Loss via peritoneal fluid as a factor for low 25(OH)D3 level in peritoneal dialysis patients. *Int Urol Nephrol.* dezembro de 2009;41(4):989–96.
58. Gutiérrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, et al. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med.* 7 de agosto de 2008;359(6):584–92.
59. Isakova T, Xie H, Barchi-Chung A, Vargas G, Sowden N, Houston J, et al. Fibroblast growth factor 23 in patients undergoing peritoneal dialysis. *Clin J Am Soc Nephrol.* novembro de 2011;6(11):2688–95.
60. Wesseling-Perry K, Pereira RC, Wang H, Elashoff RM, Sahney S, Gales B, et al. Relationship between plasma fibroblast growth factor-23 concentration and bone mineralization in children with renal failure on peritoneal dialysis. *J Clin Endocrinol Metab.* fevereiro de 2009;94(2):511–7.
61. Cancela ALE, Oliveira RB, Gracioli FG, dos Reis LM, Barreto F, Barreto DV, et al. Fibroblast growth factor 23 in hemodialysis patients: effects of phosphate binder, calcitriol and calcium concentration in the dialysate. *Nephron Clin Pract.* 2011;117(1):c74–82.
62. Atkins GJ, Findlay DM. Osteocyte regulation of bone mineral: a little give and take. *Osteoporos Int.* agosto de 2012;23(8):2067–79.
63. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Osteocytes: central conductors of bone biology in normal and pathological conditions. *Acta Physiol (Oxf).* março de 2012;204(3):317–30.
64. Sabbagh Y, Gracioli FG, O'Brien S, Tang W, dos Reis LM, Ryan S, et al. Repression of osteocyte Wnt/ β -catenin signaling is an early event in the progression of renal osteodystrophy. *J Bone Miner Res.* agosto de 2012;27(8):1757–72.

65. Gallieni M, Caputo F, Filippini A, Gabella P, Giannattasio M, Stingone A, et al. Prevalence and progression of cardiovascular calcifications in peritoneal dialysis patients: A prospective study. *Bone*. setembro de 2012;51(3):332–7.
66. Barreto DV, Barreto F de C, de Carvalho AB, Cuppari L, Draibe SA, Dalboni MA, et al. Phosphate binder impact on bone remodeling and coronary calcification--results from the BRiC study. *Nephron Clin Pract*. 2008;110(4):c273–283.
67. Adragão T, Pires A, Birne R, Curto JD, Lucas C, Gonçalves M, et al. A plain X-ray vascular calcification score is associated with arterial stiffness and mortality in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. março de 2009;24(3):997–1002.
68. Hernandez JD, Wesseling K, Pereira R, Gales B, Harrison R, Salusky IB. Technical approach to iliac crest biopsy. *Clin J Am Soc Nephrol*. novembro de 2008;3 Suppl 3:S164–169.
69. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. dezembro de 1987;2(6):595–610.
70. Dos Reis LM, Batalha JR, Muñoz DR, Borelli A, Correa PHS, Carvalho AB, et al. Brazilian normal static bone histomorphometry: effects of age, sex, and race. *J Bone Miner Metab*. 2007;25(6):400–6.
71. Vedi S, Compston JE, Webb A, Tighe JR. Histomorphometric analysis of dynamic parameters of trabecular bone formation in the iliac crest of normal British subjects. *Metab Bone Dis Relat Res*. 1984 de 1983;5(2):69–74.
72. Gomes SA, dos Reis LM, de Oliveira IB, Noronha I de L, Jorgetti V, Heilberg IP. Usefulness of a quick decalcification of bone sections embedded in methyl methacrylate[corrected]: an improved method for immunohistochemistry. *J Bone Miner Metab*. 2008;26(1):110–3.
73. Paniagua R, Amato D, Vonesh E, Correa-Rotter R, Ramos A, Moran J, et al. Effects of increased peritoneal clearances on mortality rates in peritoneal dialysis: ADEMEX, a prospective, randomized, controlled trial. *J Am Soc Nephrol*. maio de 2002;13(5):1307–20.
74. Sherrard DJ, Hercz G, Pei Y, Maloney NA, Greenwood C, Manuel A, et al. The spectrum of bone disease in end-stage renal failure--an evolving disorder. *Kidney Int*. fevereiro de 1993;43(2):436–42.
75. Torres A, Lorenzo V, Hernández D, Rodríguez JC, Concepción MT, Rodríguez AP, et al. Bone disease in predialysis, hemodialysis, and CAPD patients: evidence of a better bone response to PTH. *Kidney Int*. maio de 1995;47(5):1434–42.
76. Andress DL. Adynamic bone in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int*. junho de 2008;73(12):1345–54.
77. Haris A, Sherrard DJ, Hercz G. Reversal of adynamic bone disease by lowering of dialysate calcium. *Kidney Int*. setembro de 2006;70(5):931–7.

78. Pelletier S, Vilayphiou N, Boutroy S, Bacchetta J, Sornay-Rendu E, Szulc P, et al. Bone microarchitecture is more severely affected in patients on hemodialysis than in those receiving peritoneal dialysis. *Kidney Int.* setembro de 2012;82(5):581–8.
79. Gennari L, Merlotti D, Valenti R, Ceccarelli E, Ruvio M, Pietrini MG, et al. Circulating sclerostin levels and bone turnover in type 1 and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* maio de 2012;97(5):1737–44.
80. Zhou S, Leboff MS, Waikar SS, Glowacki J. Vitamin D metabolism and action in human marrow stromal cells: effects of chronic kidney disease. *J Steroid Biochem Mol Biol.* julho de 2013;136:342–4.
81. Wijenayaka AR, Kogawa M, Lim HP, Bonewald LF, Findlay DM, Atkins GJ. Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway. *PLoS ONE.* 2011;6(10):e25900.
82. Kuhlmann MK. Phosphate elimination in modalities of hemodialysis and peritoneal dialysis. *Blood Purif.* 2010;29(2):137–44.
83. Oliveira RB, Cancela ALE, Gracioli FG, Dos Reis LM, Draibe SA, Cuppari L, et al. Early control of PTH and FGF23 in normophosphatemic CKD patients: a new target in CKD-MBD therapy? *Clin J Am Soc Nephrol.* fevereiro de 2010;5(2):286–91.
84. Gracia-Iguacel C, Gallar P, Qureshi AR, Ortega O, Mon C, Ortiz M, et al. Vitamin D deficiency in dialysis patients: effect of dialysis modality and implications on outcome. *J Ren Nutr.* novembro de 2010;20(6):359–67.
85. Kurz P, Tsobanelis T, Brunkhorst R, Roth P, Werner E, Schoeppe W, et al. Calcium kinetic studies in patients on CAPD: improvement of secondary hyperparathyroidism without concomitant improvement of calcium turnover. *Perit Dial Int.* fevereiro de 1997;17(1):59–65.
86. Parfitt AM. Misconceptions (3): calcium leaves bone only by resorption and enters only by formation. *Bone.* setembro de 2003;33(3):259–63.
87. Delanaye P, Souberbielle J-C, Lafage-Proust M-H, Jean G, Cavalier E. Can we use circulating biomarkers to monitor bone turnover in CKD haemodialysis patients? Hypotheses and facts. *Nephrol Dial Transplant.* 17 de julho de 2013;
88. Pereira RC, Juppner H, Azucena-Serrano CE, Yadin O, Salusky IB, Wesseling-Perry K. Patterns of FGF-23, DMP1, and MEPE expression in patients with chronic kidney disease. *Bone.* dezembro de 2009;45(6):1161–8.

APÊNDICE

A SONESP – Sociedade de Nefrologia do Estado de São Paulo certifica que o Trabalho intitulado “AVALIAÇÃO DO METABOLISMO MINERAL E ÓSSEO DE PACIENTES EM DIÁLISE PERITONEAL: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, HISTOLÓGICAS E MARCADORES SÉRICOS” dos Autores: *Rodrigo Azevedo de Oliveira, Fellype de Carvalho Barreto, Luciene M. dos Reis, Wagner V. Dominguez, Fabiana G. Graciali, Monique Mendes, Zita M. L. Britto, João Henrique Castro, Rosa Maria Affonso Moysés, Vanda Jorgetti*, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/USP, recebeu o 1º lugar do PRÊMIO MASSOLA 2013, concedido a trabalhos científicos em Diálise Peritoneal, divulgado e entregue em 18 de setembro de 2013, durante a Cerimônia de Abertura do XVII Congresso Paulista de Nefrologia, em Atibaia.

São Paulo, 18 de setembro de 2013.

Hugo Abensur
Presidente

Cibele Isaac Saad Rodrigues
Diretora Científica

[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

SCHOLARONE™
Manuscripts

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Rodrigo de Oliveira

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Kidney International*.

Manuscript ID: KI-02-14-0287

Title: PERITONEAL DIALYSIS PER SE IS NOT A RISK FACTOR FOR ADYNAMIC BONE DISEASE

Authors: de Oliveira, Rodrigo
Barreto, Fellype
Mendes, Monique
dos Reis, Luciene
Castro, João Henrique
Britto, Zita Maria
Carvalho, Aluizio
Moysés, Rosa
Jorgetti, Vanda

Date Submitted: 18-Feb-2014

Print Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.14.1 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2014. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

Follow ScholarOne on Twitter

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

Kidney International

PERITONEAL DIALYSIS PER SE IS NOT A RISK FACTOR FOR ADYNAMIC BONE DISEASE

Journal:	<i>Kidney International</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Clinical Investigation
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	de Oliveira, Rodrigo; University of Sao Paulo, Nephrology Department Barreto, Felipe; University of Sao Paulo, Nephrology Department Mendes, Monique; University of Sao Paulo, Nephrology Department dos Reis, Luciene; University of Sao Paulo, Nephrology Department Castro, João Henrique; Universidade Estadual Paulista, Nephrology Department Britto, Zita Maria; University of Sao Paulo, Nephrology Department Carvalho, Aluizio; Federal University of São Paulo, Nephrology Division Moysés, Rosa; Universidade de São Paulo, Nephrology Jorgetti, Vanda; University of Sao Paulo, Nephrology Department
Keywords:	peritoneal dialysis, mineral metabolism, diabetes, vascular calcification, chronic kidney disease
Subject Area:	Mineral and Bone Disorders, Dialysis

SCHOLARONE™
Manuscripts

The International Society of Nephrology (<http://www.isn-online.org/site/cms>)

PERITONEAL DIALYSIS *PER SE* IS NOT A RISK FACTOR FOR
ADYNAMIC BONE DISEASE

Rodrigo A. de Oliveira, MD¹

Fellype C. Barreto, MD, PhD¹

Monique Mendes, MD¹

Luciene M. dos Reis, PhD¹

João Henrique Castro, MD²

Zita Maria L. Britto, MD¹

Aluizio B. Carvalho³

Rosa M. Moysés, MD, PhD¹

Vanda Jorgetti, MD, PhD¹

1. Department of Internal Medicine, Nephrology Division, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

2. Department of Internal Medicine, Nephrology Division, Universidade Estadual Paulista, Brazil.

3. Department of Internal Medicine, Nephrology Division, Universidade Federal de São Paulo, Brazil.

Correspondence: Vanda Jorgetti, Nephrology Department - University of São Paulo School of Medicine Av. Dr. Arnaldo, 455, 3º andar, sala 3342, CEP 01246-903, São Paulo, SP, Brazil, tel: +55 11 3061-8351, fax: +55 11 3061-7261, email: vandajor@usp.br

Running Title: Bone Disease in Peritoneal Dialysis

Abstract

CKD-MBD is a complex syndrome influenced by various factors, such as age, CKD etiology, uremic toxins and dialysis modality. CKD-MBD has been extensively studied in hemodialysis patients. However, for peritoneal dialysis, only a few, older studies exist, most of which contain no bone biopsy data. The present study sought to characterize CKD-MBD in a cohort of prevalent peritoneal dialysis patients; compare the results with that obtained from hemodialysis patients; and analyse performance of bone turnover serum markers to make the diagnosis of high or low bone turnover disease. Forty-one peritoneal dialysis patients underwent to a clinical evaluation, biochemical analysis and bone biopsy. The most prevalent pattern of renal osteodystrophy was adynamic bone disease, comprising 49% of the sample population. When we separately analyzed diabetic and non-diabetic patients, the adynamic bone disease prevalence was 77.7% in the former group and 26% in the latter group ($p=0.001$). Bone alkaline phosphatase demonstrated the best sensitivity and specificity values to detect both high and low turnover disease. The comparison between non-diabetic peritoneal dialysis and hemodialysis patients, matched by age, gender and length of dialysis, revealed low 25(OH) vitamin D level, worst bone mineralization and better bone volume parameters in the former group. In conclusion, adynamic bone disease was the most frequent type of renal osteodystrophy in peritoneal dialysis patients and bone alkaline phosphatase was the best serum marker of bone turnover. However, the effect of diabetes on the development of adynamic bone disease is more important than the dialysis modality itself.

INTRODUCTION

Chronic kidney disease - mineral bone disorder (CKD-MBD) is a complex syndrome influenced by various factors, such as age, race, CKD etiology, hormonal derangements, uremic toxins, dialysis modality and length of treatment. CKD-MBD profiles have been extensively studied in hemodialysis (HD) patients. However, for peritoneal dialysis (PD), only a few, older studies exist, most of which contain no bone biopsy data. There is a large difference between current and past clinical practice and patient characteristics regarding PD treatment. Most notably, aluminum- and calcium-based phosphate binders were largely used previously. PD was considered to be a second-rate treatment indicated particularly for the elderly and patients without vascular access for HD. Furthermore, previous studies did not exclude patients who had previously undergone HD or parathyroidectomy (1–4).

In 2009, the Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) guidelines on CKD-MBD were based on the main studies published on this issue and compiled bone biopsy findings. According to these guidelines, the most frequent pattern of renal osteodystrophy (ROD) in PD was adynamic bone disease (ABD) (50%), followed by mild disease (20%), osteitis fibrosa (OF) (18%), mixed bone disease (5%), and osteomalacia (OM) (5%); 2% of the patients had normal bone histology (5). These findings strengthened the worldwide belief that PD is an important risk factor for ABD development. Furthermore, KDIGO proposed the use of the TMV (Turnover, Mineralization, Volume) classification to standardize bone biopsy analysis (5). Turnover is considered to be the most important parameter for guiding therapeutic ROD management. Studies have suggested that at both extremes of ROD (i.e., high or low turnover bone disease), there is a loss of bone buffering capacity that may prevent mineral influx to bone and favor mineral efflux from bone. In both situations, bone

quality is compromised, and the risk of vascular calcification (VC) and bone fracture seems to be increased (6,7).

Bone biopsy remains the gold standard for diagnosing ROD. Nevertheless, the invasive nature of the procedure, its cost, and its overall complexity have precluded the use of this tool in clinical practice. Instead, serum markers of bone turnover have been used to evaluate bone turnover in CKD patients. The reliability of parathyroid hormone (PTH), which is the most commonly used marker, has been questioned (8,9). Total alkaline phosphatase (tAP) and bone alkaline phosphatase (BAP), both markers of bone formation, and deoxypyridinoline (DPD), a marker of bone resorption, have been identified as good options, even in the CKD setting (10,11).

Recently, another regulator of bone physiology, sclerostin (Scl), has been discovered. Scl inhibits the Wnt/ β -catenin pathway and consequently decreases osteoblast action and bone formation. Scl is still understudied in CKD patients (12,13), and to our knowledge, there has not yet been a study that analyze Scl in adult PD patients.

The present study sought to achieve the following: a) characterize CKD-MBD in a cohort of PD patients; b) analyze the role of Scl in ROD in these patients; c) compare the performance of Scl with traditional bone turnover serum markers, namely PTH, tAP, BAP, and DPD to make the diagnosis of high or low bone turnover disease in PD patients; and d) compare the CKD-MBD profiles between PD and HD patients.

RESULTS

Clinical and laboratory characteristics

Patients had been receiving an adequate dialysis dosage, according to a weekly KT/V (14). Most of them used a dialysate with a high calcium concentration, and approximately one-third used calcitriol because of a high intact PTH (iPTH) level. Sevelamer hydrochloride was the main phosphate (P) binder prescribed (90.3%), and only 4.8% of patients received calcium-based P binders. The P and iPTH levels were in agreement with the K/DOQI recommendations in 46.3% and 65.9% of patients, respectively (15). Ionized calcium (iCa) was within the normal range in 70.7% of patients, and 100% of patients had a low level of 25(OH) vitamin D. Table 1 shows the main clinical and laboratory characteristics of patients.

Almost half of the patients were diabetic, and when we analyzed diabetics and non-diabetics separately, we found that phosphate, albumin, iPTH, and 25(OH) vitamin D were lower in the former group [4.3 ± 1.7 vs. 5.6 ± 1.4 , $p=0.001$; 3.27 ± 0.56 vs. 3.64 ± 0.49 , $p=0.05$; 269 (196-397) vs. 430 (256-1111), $p=0.05$; and 9.08 ± 3.4 vs. 15.5 ± 6.7 , $p=0.003$, respectively].

Vascular calcification

VC was observed in 24.3% of patients. VC was associated with diabetes mellitus (9.5% vs. 43.7%; $p=0.02$), but not with high or low bone turnover (16.6% vs. 31.6%, $p=0.29$). There was no association between VC and any other clinical, biochemical, or histomorphometric parameter.

Serum Scl and bone-expressed Scl

Scl was increased in the serum and trabecular bone surface of PD patients, and both increases were negatively correlated with BFR/BS ($r=-0.31$, $p=0.44$ and $r=-0.34$,

$p=0.02$, respectively) and BAP ($r=-0.48$, $p=0.001$ and $r=-0.39$ and $p=0.01$, respectively). Additionally, sScl negatively correlated with other bone formation parameters, namely ObS/BS ($r=-0.35$, $p=0.02$), OV/BV ($r=-0.31$, $p=0.04$), and O.Th ($r=-0.44$, $p=0.003$), and resorption parameters, namely ES/BS ($r=-0.40$, $p=0.01$) and OcS/BS ($r=-0.38$, $p=0.01$). There was no correlation with structural parameters or iPTH.

When we separately analyzed diabetic and non-diabetic patients, sScl (2.46 ± 0.97 vs. 1.64 ± 0.92 , $p=0.002$) and bScl (11.94 ± 7.45 vs. 8.72 ± 6.67 , $p=0.003$) were found to be increased in the diabetic group.

Bone histomorphometry

The most prevalent pattern of ROD was ABD, comprising 49% of the sample population, followed by mixed bone disease (27%) and OF (22%). There was a single case of OM.

According to the TMV classification, the patients were evenly distributed between high and low bone turnover (48.9% and 51.1%, respectively); bone mineralization was abnormal and bone volume was reduced in 66% and 39% of the patients, respectively (Figure 1A).

When we separately analyzed diabetic and non-diabetic patients, the ABD prevalence was 77.7% in the former group and 26% in the latter group ($p=0.001$). Mixed bone disease was the most frequent pattern of ROD in non-diabetics (39.1%), and OF was the second most prevalent pattern (30.4%).

According to the TMV classification, only turnover was significantly different between diabetic and non-diabetic patients. Low turnover bone disease prevailed in the former group, while high turnover prevailed in the latter group (Figure 1B).

Patients with low turnover bone disease tended to be older and had significantly lower

levels of iPTH, bAP, and DPD. Interestingly, both the serum level and bone expression of Scl were significantly higher in patients with low bone turnover (Table 2).

Logistic regression models identified a low tAP level, a low BAP, and the presence of diabetes as predictors of low bone turnover (Table 3).

Serum markers of bone turnover

Figure 2 presents a receiver operating characteristic (ROC) curve showing the sensitivity and specificity of BAP, iPTH, DPD, and sScl in the diagnosis of high turnover bone disease. BAP and sScl demonstrated the best and worst sensitivity and specificity values, with areas under the curve (AUCs) of 0.79 and 0.70, respectively. The result for tAP (AUC 0.78) was better than that for iPTH and very similar to that for BAP.

Table 4 shows the sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) of each marker in the diagnosis of high turnover disease. The combined analysis of tAP and iPTH yielded the best diagnostic performance.

The same analysis was performed to evaluate the performance of the same markers in diagnosing low turnover bone disease, and similar results were obtained.

Hemodialysis versus peritoneal dialysis

Table 5 shows the main differences between HD and PD non-diabetic patients. We found significantly lower iCa, DPD and 25(OH) vitamin D, and significantly higher BAP and iPTH in PD patients. Bone Histomorphometry disclosed better structural

parameters, namely, BV/TV, Tb.Sp and Tb.N in PD patients. On the other hand, these patients presented a significant mineralization defect.

DISCUSSION

Our study shows that adult patients undergoing PD, without previous treatment using any other form of renal replacement therapy, had a high prevalence of ABD. However, after excluding diabetics from the analysis, high turnover bone disease prevailed.

The classical main risk factors for ABD development are age, uremia, calcium overload, excessive PTH suppression resulting from vitamin D receptor activators, PD itself, and diabetes mellitus (16,17). The patients in the present study were relatively young (50.3 ± 10.2 years old) and had been receiving an adequate dialysis dosage according to the weekly KT/V (14). Nevertheless, the prevalence of ABD was very high. Oral calcium overload was low because sevelamer hydrochloride was the main phosphate binder prescribed. Conversely, almost all patients used a high calcium concentration dialysate, which may contribute to low bone remodeling, as suggested by Haris *et al.* (18). Approximately one-third of patients had been using calcitriol, but the iPTH level was lower than 150 pg/mL in only 4.8% of patients. Thus, the possibility of PTH oversuppression is eliminated.

However, almost half of the patients were diabetic and this was a significant risk factor for ABD. The prevalence of ABD was very different between the populations with and without diabetes. While the prevalence of ABD was 78% in the former group, it was only 26% in the latter group, even with the use of a dialysate with a high calcium concentration. Confirming this hypothesis, no differences were found in bone turnover between the non-diabetic PD and non-diabetic HD patients, matched according to age, gender, and length of dialysis treatment.

There are three main hypotheses to explain why diabetes mellitus is a risk factor for ABD (17,19–21). The first hypothesis is that advanced glycation end products (AGEs) increase osteoblast apoptosis and consequently decrease bone formation (17,19). The second hypothesis asserts that a low vitamin D level, which was prevalent among our patients, mainly in the diabetics, is implicated in the pathogenesis of low bone turnover. Vitamin D deficiency hampers osteoblast differentiation and proliferation and, consequently, bone formation (17,20, 22). Zhou *et al.* recently reported that bone marrow osteoblast differentiation can be stimulated by 25(OH) vitamin D. In an autocrine and/or paracrine manner, local 1- α hydroxylase can be converted into 1-25(OH) vitamin D (23). Despite this hypothesis, in our study, there was not any correlation between 25(OH) vitamin D and osteoblast number or bone turnover. Recently, a new and interesting hypothesis has emerged. This third hypothesis posits that the reduced bone turnover in diabetics is mediated by the inhibition of the Wnt/ β -catenin pathway by Scl. Diabetic patients have a high sScl level compared with non-diabetics (21). The present study agrees with this hypothesis. We found a high level of sScl as well as bScl in diabetic patients. Furthermore, both of these levels were inversely correlated with BFR. Sabbagh *et al.* observed an early reduction in BFR in uremic mice. This reduction coincided with an increase in bScl and occurred before a rise in PTH, suggesting that Scl interferes with bone turnover even before PTH interference (24). Indeed, the iPTH levels in our diabetic patients were within the KDIGO recommendation range. Nevertheless, there was a high prevalence of low bone turnover disease.

The average iPTH level was 363 pg/mL, and 65.9% of the patients were within the suggested KDIGO range (5). Thus, we would expect fewer bone histological abnormalities in cases of reasonably controlled PTH levels. This discrepancy

demonstrates that therapeutic management based solely on PTH is not a good practice. Regarding phosphate control, 46.3% of patients were in agreement with KDIGO recommendations (5). Some researchers believe that phosphate clearance is better in PD than classic HD (25). However, in our study, we did not observe any differences in P level between PD and HD patients, despite a residual diuresis of approximately 1,000 mL per day in the PD group. Notably, diet is important for phosphate control and was not evaluated in our study. Recently, Ferreira *et al.*, using an animal model of ABD in CKD, observed a negative effect of oral phosphate overload on bone volume, independent of P and PTH level (26).

Hypovitaminosis D occurred in 100% of our patients, and the 25(OH) vitamin D level was less than 15 ng/dL in 68.3% of them. Some authors have documented a loss of vitamin D through peritoneal effluent, which may explain the high percentage of insufficiency and, especially, deficiency of this vitamin in our study (27,28). This hypothesis is strengthened by the significant difference in the 25(OH) vitamin D level between patients treated with HD and PD that were matched according to age, gender, and length of dialysis. The clinical importance of this finding is not well understood. Some studies have suggested that maintaining an adequate vitamin D level promotes the important regulation of glycemic control and the immune system (29,30). This regulation would be extremely important for PD patients because the PD catheter increases the peritonitis risk and dextrose overload increases the risk of developing diabetes mellitus.

Hand and pelvic radiographs detected VC in approximately 25% of our sample, mainly among the diabetic population. Adragão *et al.* observed VC in 77% of 101 patients analyzed in their study, using the same radiological criteria. However, the patients in their study were older, and presented a dialysis vintage higher than 55

months (31).

In CKD, many proteins are increased in the serum due to increased production and/or decreased renal clearance. The use of immunohistochemistry to detect bone proteins has made differentiating between these situations possible. Furthermore, this assay aids in the understanding of the bone microenvironment. We found increased bScl, which may have contributed to the increased serum levels. To our knowledge, this is the first study to evaluate the bone expression of Scl in adult PD patients. This finding is in agreement with recent data from Cejka *et al.*, who observed that sScl is increased in all stages of CKD and do not result from reduced renal clearance (32).

Among the parameters evaluated in the TMV classification, turnover is the most important in clinical practice because turnover directly guides therapy. Some studies have suggested that both high and low bone turnover impair the mineral buffering capacity. Both situations seem to increase the risk of fracture and cardiovascular events (6,7). Thus, the search for a biochemical marker that can differentiate high and low turnover is very important. Our findings demonstrate that tAP is a good marker of bone turnover. Its bone fraction (BAP) is more specific and is especially useful in patients with liver disease. Similar to Bervoets *et al.*, we found a slight superiority of BAP compared with iPTH (33). For patients with normal liver function, a combined analysis of tAP and iPTH is an interesting approach. Thus, bone biopsy can be utilized solely for uncertain cases. Notably, bone remodeling is a slow process, lasting months. However, biochemical markers change quickly, particularly PTH.

Finally, regarding the comparison between PD and HD, bone volume was greater in the former group. This result is in agreement with Pelletier *et al.*, who demonstrated a better bone microarchitecture in patients treated with PD than those treated with HD

(34). This seems to occur because PD controls acidosis better than HD. Unlike, bone mineralization was better in the HD group.

The main limitations of this study are the following: I. the study was a cross-sectional investigation, which does not allow for conclusions regarding causality; II. the length of PD treatment was not long; III. dietary phosphate intake was not evaluated; and IV. an analysis of sScI in HD patients was not possible because there was no stored serum.

The strengths of our study are: I. it evaluated bone histology of CKD patients treated exclusively with PD nowadays; II. it compared the results with those of HD patients; and III. it correlated the sScI and bScI with parameters of bone histomorphometry. In conclusion, our study was able to show the relevance of diabetes mellitus role in PD-related bone disease. In addition, our results shed some light in the pathophysiology of CKD-MBD.

MATERIALS AND METHODS:

Patients

From August 2010 to September 2012, forty-one volunteers, namely PD patients from eight different centers, were enrolled in this cross-sectional study. The inclusion criteria were age between 18 and 65 years and the receipt of chronic maintenance PD for at least 6 months. The exclusion criteria included previous chronic HD treatment; previous kidney transplantation; parathyroidectomy; uncontrolled systemic illnesses, such as malignancy, AIDS, and granulomatous disease; chronic alcoholism and/or drug addiction; and use of anticonvulsants, bisphosphonates, cinacalcet, glucocorticoids, or other immunosuppressive agents.

The local ethics committee had previously approved the study under number 0046/08, and all patients provided written informed consent.

Biochemical determinations:

Blood samples were collected in a fasting state and no longer than two weeks after bone biopsy. The samples were centrifuged, aliquoted in cryovials, and stored at -80°C . Serum levels of iCa [reference range (RR): 4.6-5.3 mg/dL], P (RR: 2.7-4.5 mg/dL), tAP (RR: 40-129 UI/L), and albumin (RR: 3.4-4.8 g/dL) were determined using routine laboratory techniques. Serum iPTH (RR: 10-65 pg/mL) was measured using a chemiluminescence assay (DPC; Medlab, San Antonio, TX, USA). Serum 25(OH) vitamin D (RR: 30-100 ng/dL) was measured using a radioimmunoassay (DiaSorin, Stillwater, MN, USA). BAP (RR: 11.6-42.7U/L) was measured using an enzyme immunoassay (Metra Biosystem Inc., Mountain View, CA, USA). Serum deoxypyridinoline (RR: 3.25 ± 0.66 nmol/L) was measured using an enzyme immunoassay (Quidel Corporation, San Diego, CA, USA), and serum Scl (RR: 0.42-0.80 ng/mL) was measured using an enzyme immunoassay (Quidel Corporation).

Vascular calcification:

Plain X-rays of the hands and pelvis were obtained and analyzed according to the Adragão scoring system. The pelvis radiographic films were divided into four sections by two imaginary lines: a horizontal line over the upper limit of both femoral heads and a median vertical line over the vertebral column. The films of the hands were divided, for each hand, by a horizontal line over the upper limit of the metacarpal bones. The presence and absence of linear calcifications in each section were scored as 1 and 0, respectively. The final score was the sum of all of the sections, ranging from 0-8 (31).

Bone biopsy and histomorphometry:

All patients were submitted to a transiliac bone biopsy using a 7-mm Bordier trephine after a course of double-labeling tetracycline (20 mg/kg/day) for 3 days, separated by an interval of 10 days. The biopsy was performed 2-5 days after the last dose of antibiotics. Undercalcified bone fragments were submitted to standard processing for histological studies (36). Bone histomorphometry was analyzed using a semiautomatic technique in Osteomeasure software (Osteometrics Inc., Atlanta, GA, USA). The static and dynamic parameters were examined following the standards established by the American Society of Bone and Mineral Research (37). The reference ranges used for static parameters were obtained from our normal laboratory controls (38), whereas the ranges for the dynamic parameters were the same as those described elsewhere (39). Bone histology was categorized according to the TMV classification (5). Normal turnover was present when the bone-formation rate/bone surface (BFR/BS) was $0.061 \pm 0.006 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$ for women and $0.068 \pm 0.040 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$ for men. A bone formation rate less than 1 standard deviation (S.D.) below the normal range and greater than 1 S.D. above the normal range characterized low and high turnover bone disease, respectively (39). Defective mineralization was defined by a mineralization lag time greater than 50 days (39). The trabecular bone volume/tissue volume (BV/TV) was classified as normal when the value was $21.8 \pm 7.2\%$ for women and $24.0 \pm 6.1\%$ for men. A BV/TV less than 1 S.D. below the normal range characterized a low trabecular bone volume (38).

Scl bone expression:

Scl was evaluated by immunohistochemistry staining for bone that was included in the acrylic resin and partially demineralized (40).

Briefly, the following steps were performed:

1) Removal of methacrylate (MMA) with xylene/chloroform and ethanol; 2) decalcification with acetic acid; 3) blocking of endogenous peroxidase with 3% hydrogen peroxide in methanol; 4) blocking of nonspecific proteins with DakoCytomation Protein Block X0909 (Dako, California, USA); 5) incubation with primary antibody overnight at 4°C (monoclonal anti-human Scl; R&D Systems); 6) incubation with secondary antibody (Biotinylated Link; Dako K 0690); 7) incubation with streptavidin-HRP conjugate (Dako K 0690); 8) staining with Hemalou and 9) optical microscopy analysis.

Bone Scl expression was quantified by counting the positively stained osteocytes in relation to the analyzed bone area.

Comparison with hemodialysis:

Non-diabetic PD patients were compared with non-diabetic HD patients, in a proportion of 1:1 [PD (n=23) x HD (n=23)]. They were matched according to age, gender, and dialysis duration.

HD patients were obtained from our laboratory database. Biochemistry analyses were performed during a previous study development (41).

Statistical analysis:

Continuous parametric variables are expressed as the means±standard deviation, and nonparametric variables are expressed as medians and interquartile ranges. For the univariate analysis, we used the Mann-Whitney and chi-square tests. Conditional

logistic regressions were performed to determine the independent risk factors for low bone turnover. The sensitivity and specificity of the serum markers were assessed by ROC curves. AUCs greater than 0.7 indicate statistical significance. Youden's index was used to determine the cutoff points. Bayes' theorem was applied to determine the positive (PPVs) and negative predictive values (NPVs). Statistical analyses were conducted using SPSS software Version 17.0 (Chicago, IL), and all tests were performed with a two-sided 0.05 level of significance.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was presented, in part, at the 2012 Annual Meeting of the American Society of Nephrology in San Diego, CA. The results presented in this paper have not been published previously in whole or part, except in abstract format. Research in the laboratory of Dr. Moysés is supported by CNPQ, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant 303325/2010-0).

DISCLOSURE

Rosa M.A. Moysés, Vanda Jorgetti and Aluizio B. Carvalho have received lecture fees and are consultant to Sanofi, Abbott do Brasil, and Amgen.

1. Carmen Sánchez M, Auxiliadora Bajo M, Selgas R, *et al.* Parathormone secretion in peritoneal dialysis patients with adynamic bone disease. *Am J Kidney Dis* 2000;36(5):953–61.
2. Joffe P, Heaf JG, Hyldstrup L. Osteocalcin: a non-invasive index of metabolic bone disease in patients treated by CAPD. *Kidney Int* 1994;46(3):838–46.
3. Sherrard DJ, Hercz G, Pei Y, *et al.* The spectrum of bone disease in end-stage renal failure—an evolving disorder. *Kidney Int* 1993;43(2):436–42.
4. Torres A, Lorenzo V, Hernández D, *et al.* Bone disease in predialysis, hemodialysis, and CAPD patients: evidence of a better bone response to PTH. *Kidney Int* 1995;47(5):1434–42.
5. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl* 2009;(113):S1–130.
6. Kurz P, Tsobanelis T, Brunkhorst R, *et al.* Calcium kinetic studies in patients on CAPD: improvement of secondary hyperparathyroidism without concomitant improvement of calcium turnover. *Perit Dial Int* 1997;17(1):59–65.
7. Parfitt AM. Misconceptions (3): calcium leaves bone only by resorption and enters only by formation. *Bone* 2003;33(3):259–63.
8. Barreto FC, Barreto DV, Moysés RMA, *et al.* K/DOQI-recommended intact PTH levels do not prevent low-turnover bone disease in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2008;73(6):771–7.
9. Delanaye P, Souberbielle J-C, Lafage-Proust M-H, *et al.* Can we use circulating biomarkers to monitor bone turnover in CKD haemodialysis patients? Hypotheses and facts. *Nephrol Dial Transplant* 2013;

10. Parker CR, Blackwell PJ, Freemont AJ, *et al.* Biochemical measurements in the prediction of histologic subtype of renal transplant bone disease in women. *Am J Kidney Dis* 2002;40(2):385–96.
11. Ureña P, Hruby M, Ferreira A, *et al.* Plasma total versus bone alkaline phosphatase as markers of bone turnover in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1996;7(3):506–12.
12. Cejka D, Herberth J, Branscum AJ, *et al.* Sclerostin and Dickkopf-1 in renal osteodystrophy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6(4):877–82.
13. Cejka D, Jäger-Lansky A, Kieweg H, *et al.* Sclerostin serum levels correlate positively with bone mineral density and microarchitecture in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27(1):226–30.
14. Paniagua R, Amato D, Vonesh E, *et al.* Effects of increased peritoneal clearances on mortality rates in peritoneal dialysis: ADEMEX, a prospective, randomized, controlled trial. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(5):1307–20.
15. K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2003;42(4 Suppl 3):S1–201.
16. Sanchez CP. Adynamic bone revisited: is there progress? *Perit Dial Int* 2006;26(1):43–8.
17. Andress DL. Adynamic bone in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* 2008;73(12):1345–54.
18. Haris A, Sherrard DJ, Hercz G. Reversal of adynamic bone disease by lowering of dialysate calcium. *Kidney Int* 2006;70(5):931–7.
19. Alikhani M, Alikhani Z, Boyd C, *et al.* Advanced glycation end products stimulate osteoblast apoptosis via the MAP kinase and cytosolic apoptotic pathways. *Bone* 2007;40(2):345–53.

20. Van Driel M, Koedam M, Buurman CJ, *et al.* Evidence that both 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and 24-hydroxylated D₃ enhance human osteoblast differentiation and mineralization. *J Cell Biochem* 2006;99(3):922–35.
21. Gennari L, Merlotti D, Valenti R, *et al.* Circulating sclerostin levels and bone turnover in type 1 and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(5):1737–44.
22. Dias CB, Dos Reis LM, Caparbo VF, *et al.* Decreased in vitro osteoblast proliferation and low turnover bone disease in nonuremic proteinuric patients. *Kidney Int* 2007;71(6):562–8.
23. Zhou S, Leboff MS, Waikar SS, *et al.* Vitamin D metabolism and action in human marrow stromal cells: effects of chronic kidney disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013;136:342–4.
24. Sabbagh Y, Gracioli FG, O'Brien S, *et al.* Repression of osteocyte Wnt/ β -catenin signaling is an early event in the progression of renal osteodystrophy. *J Bone Miner Res* 2012;27(8):1757–72.
25. Kuhlmann MK. Phosphate elimination in modalities of hemodialysis and peritoneal dialysis. *Blood Purif* 2010;29(2):137–44.
26. Ferreira JC, Ferrari GO, Neves KR, *et al.* Effects of dietary phosphate on adynamic bone disease in rats with chronic kidney disease—role of sclerostin? *PLoS One*. 2013;8(11):79721.
27. Sahin G, Kirli I, Sirmagul B, *et al.* Loss via peritoneal fluid as a factor for low 25(OH)D₃ level in peritoneal dialysis patients. *Int Urol Nephrol* 2009;41(4):989–96.
28. Gracia-Iguacel C, Gallar P, Qureshi AR, *et al.* Vitamin D deficiency in dialysis patients: effect of dialysis modality and implications on outcome. *J Ren Nutr* 2010;20(6):359–67.

29. Rudnicki M, Kerschbaum J, Hausdorfer J, *et al.* Risk factors for peritoneal dialysis-associated peritonitis: the role of oral active vitamin d. *Perit Dial Int* 2010;30(5):541–8.
30. Bindal ME, Taskapan H. Hypovitaminosis D and insulin resistance in peritoneal dialysis patients. *Int Urol Nephrol* 2011;43(2):527–34.
31. Adragão T, Pires A, Birne R, *et al.* A plain X-ray vascular calcification score is associated with arterial stiffness and mortality in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24(3):997–1002.
32. Cejka D, Marculescu R, Kozakowski N, *et al.* Renal elimination of sclerostin increases with declining kidney function. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(1):248–55.
33. Bervoets ARJ, Spasovski GB, Behets GJ, *et al.* Useful biochemical markers for diagnosing renal osteodystrophy in predialysis end-stage renal failure patients. *Am J Kidney Dis* 2003;41(5):997–1007.
34. Pelletier S, Vilayphiou N, Boutroy S, *et al.* Bone microarchitecture is more severely affected in patients on hemodialysis than in those receiving peritoneal dialysis. *Kidney Int* 2012;82(5):581–8.
35. Parfitt AM, Qiu S, Rao DS. The mineralization index—a new approach to the histomorphometric appraisal of osteomalacia. *Bone* 2004;35(1):320–5.
36. Hernandez JD, Wesseling K, Pereira R, *et al.* Technical approach to iliac crest biopsy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3 Suppl 3:S164–169.
37. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, *et al.* Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 1987;2(6):595–610.

38. Dos Reis LM, Batalha JR, Muñoz DR, *et al.* Brazilian normal static bone histomorphometry: effects of age, sex, and race. *J Bone Miner Metab.* 2007;25(6):400–6.
39. Vedi S, Compston JE, Webb A, *et al.* Histomorphometric analysis of dynamic parameters of trabecular bone formation in the iliac crest of normal British subjects. *Metab Bone Dis Relat Res* 1983;5(2):69–74.
40. Gomes SA, dos Reis LM, de Oliveira IB, *et al.* Usefulness of a quick decalcification of bone sections embedded in methyl methacrylate: an improved method for immunohistochemistry. *J Bone Miner Metab* 2008;26(1):110–3.
41. Barreto DV, Barreto F de C, de Carvalho AB, *et al.* Phosphate binder impact on bone remodeling and coronary calcification--results from the BRiC study. *Nephron Clin Pract* 2008;110(4):c273–283.

TITLES AND LEGENDS

Figure 1. Patient distribution according to TMV classification

A) Entire group. B) Comparison between diabetic and non-diabetic patients.

Figure 2. ROC curve analyses of serum markers of high bone turnover disease

Table 1: General Patient Characteristics

d[Ca]: dialysate calcium concentration; CAPD: continuous ambulatory peritoneal dialysis; APD: automated peritoneal dialysis; iCa: ionized calcium; P: phosphate; iPTH: intact parathyroid hormone; BAP: bone alkaline phosphatase; sScl: serum sclerostin; DPD: deoxypyridinoline; VC: vascular calcification.

Table 2: Comparison between patients with high and low bone turnover

iCa: ionized calcium; P: phosphate; BAP: bone alkaline phosphatase; DPD: deoxypyridinoline; iPTH: intact parathyroid hormone; VC: vascular calcification; bScl: bone sclerostin; sScl: serum sclerostin.

Table 3. Logistic regression models for bone turnover

BAP: bone alkaline phosphatase; tAP: total alkaline phosphatase. Corrected for age, iPTH, sScl and DPD.

Table 4. Sensitivity and specificity of serum markers for diagnosis of high turnover bone disease

PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value; BAP: bone alkaline phosphatase; tAP: total alkaline phosphatase; DPD: deoxypyridinoline; iPTH: intact parathyroid hormone; Scl: sclerostin.

Table 5. Comparison between non-diabetic patients treated with HD or PD

BV/TV: bone volume; Tb.sp: trabecular separation; TbN: trabecular number; Ob.S/BS: osteoblast surface; OV/BV: osteoid volume; Oth: osteoid thickness; BFR/BS: bone formation rate; Mlt: mineralization lag time; OcS/BS: osteoclast surface; ES/BS: eroded surface; Scl: sclerostin.

For Peer Review Only

Table 1: General Patient Characteristics

	Results	Reference Range
Age (years)	50.3±10.2	-
Male (%)	56.1	-
Diabetes (%)	43.9	-
Caucasian (%)	22	-
PD length (months)	10 (7-24)	-
d [Ca] 1.75 mmol/L (%)	84.2	-
Phosphate binder (%)		-
• Calcium-based	4.8	-
• Sevelamer	90.3	-
Diuresis (mL/24 h)	1015±669	-
Calcitriol (%)	29.2	-
KT/V (weekly)	2.43±0.75	>1.7
iCa (mg/dL)	4.64±0.69	(4.6-5.3)
P (mg/dL)	5.09±1.72	(2.7-4.5)
Albumin (g/dL)	3.49±0.54	(3.4-4.8)
iPTH (pg/mL)	363 (236-686)	(16-87)
tAP	113.5±50.9	(40-129)
BAP(U/L)	52.9±16.1	(11.6-42.7)
sScl (ng/mL)	2.00±1.03	(0.42-0.80)
DPD (nmol/L)	22.2±16.1	(2.59-3.91)
25(OH) vitamin D (ng/dL)	12.6±6.3	(30-100)
VC (%)	24.3	0

d[Ca]: dialysate calcium concentration; CAPD: continuous ambulatory peritoneal dialysis; APD: automated peritoneal dialysis; iCa: ionized calcium; P: phosphate; iPTH: intact parathyroid hormone; BAP: bone alkaline phosphatase; sScl: serum sclerostin; DPD: deoxypyridinoline; VC: vascular calcification.

Figure 1. Patient distribution according to TMV classification

A) Entire group. B) Comparison between diabetic and non-diabetic patients.

Table 2: Comparison between patients with high and low bone turnover

	TURNOVER		p
	Low (n=21)	High (n=20)	
Age (years)	53.3±8	47.2±10	0.054
Diabetes (%)	66.6	20	0.003
Caucasian (%)	33.3	66.6	0.270
PD Length (months)	9 (7-16.5)	13.5 (7.2-35)	0.140
Diuresis (mL/24 h)	1046±730	982±615	0.763
Ca-based P binder (%)	50	50	1.00
iCa (mg/dL)	4.7±0.4	4.5±0.9	0.607
P (mg/dL)	4.7±1.7	5.4±1.6	0.247
Albumin (g/dL)	3.4±0.6	3.5±0.5	0.320
iPTH (pg/mL)	265 (188-365)	524 (301-1,200)	0.003
BAP (U/L)	35.9±15	69.0±33	<0.001
sScl (ng/dL)	2.34±1.1	1.63±0.7	0.024
DPD (nmol/L)	16.9±12	27.7±17	0.031
25(OH)Vit. D (ng/dL)	11.3±6	14.0±6	0.60
VC (%)	31.5	10.7	0.29
bScl	12.4±7.6	7.7±5.8	0.032

iCa: ionized calcium; P: phosphate; BAP: bone alkaline phosphatase; DPD: deoxypyridinoline; iPTH: intact parathyroid hormone; VC: vascular calcification; bScl: bone sclerostin; sScl: serum sclerostin.

Table 3. Logistic regression models for bone turnover

Variable	Odds Ratio	95% CI		p
		Min.	Max.	
MODEL 1				
Diabetes	8.51	1.46	49.42	0.02
BAP	0.94	0.90	0.99	0.01
MODEL 2				
Diabetes	35.60	3.36	377.6	0.003
tAP	0.95	0.91	0.98	0.005

BAP: bone alkaline phosphatase; tAP: total alkaline phosphatase. Corrected for age, iPTH, sScI and DPD.

Figure 2. ROC curve analyses of serum markers of high bone turnover disease

Table 4. Sensitivity and specificity of serum markers for diagnosis of high turnover bone disease

	Sensit.	Specif.	Youden	PPV	PNV
BAP > 57.2 U/L	65%	96%	0.60	0.92	0.95
tAP > 106.5 U/L	65%	81%	0.46	0.76	0.80
iPTH >386 pg/mL	70%	62%	0.51	0.77	0.80
DPD > 13.9 nmol/L	75%	62%	0.42	0.65	0.61
sScl < 1.82 ng/dL	85%	62%	0.47	0.68	0.61
iPTH + tAP	73%	100%	0.73	1.00	0.76

PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value; BAP: bone alkaline phosphatase; tAP: total alkaline phosphatase; DPD: deoxypyridinoline; iPTH: intact parathyroid hormone; Scl: sclerostin.

Table 5. Comparison between non-diabetic patients treated with HD or PD

	HD (n=23)	DP (n=23)	P
General Characteristics			
Age (years)	47±13	47±11	0.990
Female (%)	34.8	47.8	0.550
Dialysis Length (months)	19.4±8.4	20.3±16.6	0.816
Laboratory Characteristics			
iCa (mg/dL)	5.03±0.41	4.76±0.38	0.038
P (mg/dL)	5.0±1.3	5.7±1.5	0.115
BAP (UI/L)	17.6 (13.4-27.4)	51.1 (26.5-91.8)	<0.001
DPD (nmol/L)	71.2 (31.3-96.5)	21.5 (11.6-30.3)	<0.001
iPTH (pg/mL)	143 (55-275)	430 (265-1111)	<0.001
Albumin (g/dL)	3.77±0.2	3.64±0.5	0.247
25 (OH) Vitamin D (ng/mL)	31.9±12.1	15.5±6.7	<0.001
Histomorphometry			
BV/TV (%)	17.37±7.0	22.59±7.2	0.017
Tb.sp (µm)	607±248	416±150	0.003
Tb.N (mm)	1.52±0.44	2.03±0.55	0.001
Ob.S/BS (%)	2.60 (0.80-5.70)	3.84 (2.49-7.66)	0.073
OV/BV (%)	1.9 (1.1-3.9)	4.3 (1.2-7.8)	0.109
O.th (µm)	7.82±2.24	8.20±3.39	0.660
BFR/BS (µm ³ /µm ² /day)	0.020 (0.003-0.03)	0.017 (0.002-0.034)	0.407
Mlt (days)	52.6 (24-311)	151 (39-728)	0.037
Oc.S/BS (%)	0.66±0.6	0.44±0.4	0.169
ES/BS (%)	4.28±5.0	7.19±5.7	0.074

BV/TV: bone volume; Tb.sp: trabecular separation; TbN: trabecular number; Ob.S/BS: osteoblast surface; OV/BV: osteoid volume; Oth: osteoid thickness; BFR/BS: bone formation rate; Mlt: mineralization lag time; OcS/BS: osteoclast surface; ES/BS: eroded surface; Scl: sclerostin.