Carolina Lara Neves

Análise da doença óssea após o transplante renal estável: elevada prevalência de Doença Mista

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

Área de concentração: Nefrologia
Orientadora: Dra. Vanda Jorgetti

São Paulo

2007

“Humano demasiado Humano”
Friedrich Nietzsche

Dedico este estudo...

Ao meu filho Pedro, que me faz viver a maravilhosa odisséia de ser mãe.

Ao meu marido Arnaldo, que sempre com muito amor e compreensão soube me ajudar a seguir por esse longo caminho.

Aos meus pais Margarita e Antônio, pelo esforço que fizeram na mudança de suas vidas neste último ano, sempre com muito carinho, amor, sensibilidade e dedicação.

Aos meus irmãos, Mariana, exemplo de bravura, que apesar de longe esteve sempre me incentivando pelo “skype” e Rodrigo, meu empolgante grande físico.

A Alberto, meu “pai”, por sua inesgotável fonte de criatividade e espiritualidade e Eulália, minha “mãe”, por seu exemplo de garra e luta pela vida.

Dedico este estudo a minha mentora intelectual Vanda Jorgetti, por ter me despertado o pensamento científico e por sua incansável dedicação à ciência e aos seus alunos de pós-graduação, sempre com muito amor, carinho, compreensão, honestidade e perseverança.

Agradecimentos

Aos pacientes transplantados renais do Serviço de Urologia e Nefrologia, pela confiança pessoal e por contribuírem para o desenvolvimento da ciência.

Aos colegas do transplante renal pelo apoio e cooperação à pesquisa.

Às enfermeiras do Ambulatório de Nefrologia (Lalá e Edna) pela ajuda na coleta dos materiais biológicos dos pacientes.

À Luciene(e o seu pequeno filhote) e Fabiana, biólogas pesquisadoras de excelência, que me ensinaram a vida dentro do laboratório, além da inesgotável paciência.

Ao Wagner, pela amizade e carinho, além do suporte técnico literalmente sem hora para acabar.

À Rosa Moysés e Katia Rodrigues, amigas, estimuladoras intelectuais e exemplo de dedicação ao conhecimento científico.

Às amigas-IRMÃS Melani e Dani, pelo carinho e amizade, incentivo e fidelidade, apoio emocional incondicional e por acreditar em mim.

Às amigas-IRMÃS Cris e Cilene, pelo maior exemplo de carinho, amor e amizade.

Às amigas do laboratório Andréa Magalhães e Samirah Abreu, idealizadoras do "making-off" da tese no laboratório, e pelos momentos de divertimentos e descontração.

À Liliam Takayama e Dra.Rosa Pereira do LIM da Reumatologia pela dedicação na realização das densitometrias ósseas

Aos companheiros pernambucanos Verônica Torres e Toinho pelo carinho, imensa amizade e por sempre me fazerem sentir perto de nossa casa Recife.

Às amigas da RADEN Vyvianne Azoubel e Cristine Souza-Leão, pela amizade e pelos momentos vividos juntos.

Aos meus colegas de trabalho do Ambulatório de pós-transplante renal do Hospital do Rim e Hipertensão (Lillian, Alexandre, Luciana, Ana Paula), em particular Kikume, pelo companheirismo, amizade e confiança.

À todos os meus amigos de Recife, São Paulo e Salvador...

Ao LIM-16, pelo apoio a todas as etapas da pesquisa no laboratório.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Normalização Adotada

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journal Rditors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de ª L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2º ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

Neves CL. Análise da doença óssea após o transplante renal estável: elevada prevalência de doença mista. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 82p

Introdução: Os corticosteróides e a persistência do hiperparatiroidismo são os principais fatores envolvidos na perda de massa óssea de pacientes ao longo do primeiro ano de transplante renal (TR).Os estudos no TR tardio são muito contraditórios,uma vez que as populações avaliadas foram heterogêneas.Os resultados revelaram diminuição da formação e aumento da reabsorção óssea além de defeito na mineralização.
Objetivos: 1) Avaliar o metabolismo mineral e o tecido ósseo após o segundo ano de transplante renal em pacientes com boa função do enxerto e sem fatores de risco para a perda de massa óssea. 2) Determinar os possíveis fatores determinantes da massa e remodelação óssea. 3) Estudar a atividade funcional dos osteoblastos "in vitro".
Métodos: Avaliamos 27 pacientes transplantados renais com idade entre 18 a 50 anos (36,4 ± 8,9 anos) boa função do enxerto (clearance de creatinina > 50ml/min), recebendo o mesmo esquema imunossupressor desde o início do TR e doses mínimas de corticosteróides. Todos apresentavam função gonadal normal. Excluímos os pacientes submetidos a paratiroidectomia, que receberam tratamento prévio com cálcio, vitamina D ou bisfosfonato. Os pacientes foram submetidos a avaliação clínica, laboratorial, densitometria óssea (DO) e biópsia óssea da crista ilíaca. Foi realizado cultura de células de osteoblastos, obtidos da biópsia óssea, e analisada a taxa de proliferação celular e expressão de fosfatase alcalina.
Resultados: A hipercalcemia esteve presente em 40% dos pacientes, hipofosfatemia em 26% e 15% apresentavam acidose metabólica. Nos pacientes em uso de tacrolimus (FK) os níveis de fósforo sérico foram significativamente inferiores aos do grupo ciclosporina (CSA) (p=0.019). Os níveis de PTH estavam adequados para a função renal na maioria dos pacientes, entretanto 30% tinham níveis superiores a 65 pg/ml. Os níveis de osteoprotegerina (OPG) (85%) e deoxipiridinolina (DPD) (95%) estavam elevados na maioria dos pacientes Quanto aos valores de 25(OH) D (25,4 ± 8,7 ng/ml) os mesmos encontravam-se reduzidos em 63% dos pacientes. Não houve perda óssea significativa pela análise do *score* Z lombar (-0,9 ± 1,5) e do femur (-0,8 ± 1,1), porém em 26% dos pacientes diagnosticamos osteoporose pela densitometria. A média do volume ósseo estava dentro da normalidade, porém, 30% dos pacientes apresentavam redução do BV/TV. Nossos pacientes tinham aumento da separação e diminuição do número das trabéculas ósseas, além de aumento das superfícies osteóide, osteoblástica, de reabsorção e osteoclástica. Em cerca de 60% dos pacientes observamos diminuição da taxa de formação óssea e em 85% deles da superfície mineralizante. Retardo na mineralização óssea foi observado em 46% dos pacientes. Insuficiência de 25(OH) D cursou com defeito de mineralização em todos os pacientes. Os osteoblastos em cultura apresentaram elevada taxa de proliferação apesar da diminuída expressão de fosfatase alcalina. A proliferação celular foi maior no grupo FK que CSA (p=0,0007). O PTH foi o determinante independente do fósforo sérico (p=0,042), DMO lombar (0,044) e volume osteóide (p=0,001).
Conclusões: Após dois anos de transplante renal estável no qual, os principais fatores de risco para perda de massa óssea, foram afastados nenhum paciente

apresentava tecido ósseo normal. Encontramos, predominantemente, diminuição da formação, aumento da reabsorção óssea e defeito de mineralização caracterizando a presença de doença mista. Esses achados se devem provavelmente à hipofosfatemia, persistência do hiperparatiroidismo, insuficiência de 25(OH) D e a ação de drogas imunossupressoras.

Descritores: 1.Transplante renal 2.Osteodistrofia renal 3.Osteoblastos/Fisiologia 4.Calcifediol 5.Hiperparatireoidismo 6. Hipofosfatemia 7. Imunossupressores 8. Densidade óssea

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Distúrbios do metabolismo mineral na doença renal crônica 1
1.2 Doença óssea após o transplante renal 2
1.3 Patogenia da doença óssea após o transplante renal 6
1.3.1 Hipercalcemia e hiperparatiroidismo persistente 6
1.3.2 Drogas imunossupressoras 7
1.3.2.1 Corticóides 7
1.3.2.2 Ciclosporina (CSA), Tacrolimus (FK) e outros imunossupressores 9
1.3.2.3 Situação hormonal 14
1.3.2.4 Hipofosfatemia 15
1.3.2.5 Distúrbios do metabolismo da vitamina D 15
2 OBJETIVOS 18
3 MÉTODOS 19
3.1 Seleção dos pacientes 19
3.2 Avaliação clínica da doença óssea 20
3.3 Avaliação laboratorial 20
3.4 Avaliação da densitometria óssea 21
3.5 Biópsia óssea e análise histomorfométrica 21
3.6 Cultura de células para obtenção de osteoblastos 25
3.7 Caracterização preliminar dos osteoblastos em cultura 27
3.8 Avaliação da proliferação celular 29
3.9 Avaliação da expressão de fosfatase alcalina 30
3.10 Análise estatística 32
4 RESULTADOS 34
4.1 Aspectos clínicos 34
4.2 Exames bioquímicos 36
4.3 Exames hormonais 38
4.4 Densitometria óssea 39
4.5 Histomorfometria óssea 40
4.6 Proliferação e expressão de fosfatase alcalina das células osteoblásticas 45
5 DISCUSSÃO 52
6 ANEXOS 62
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 65

Figura 1 - Mecanismo de ação da CSA e do FK nas células osteoblásticas 12

Figura 2 - Mecanismo de ação da CSA e do FK nas células osteoclásticas..... 13

Figura 3 - Expressão de fosfatase alcalina em osteoblastos obtidos de cultura de explante ósseo (histoquímica - enzimática)..... 28

Figura 4 - Coloração Vermelho de Alizarina positiva (+) em osteoblastos estimulados com β-glicerofosfato (5mM) e ácido ascórbico (100μg/ml)…… 29

Tabela 1 - Estudos clínicos que utilizaram a biópsia óssea para análise da doença óssea após o transplante, nos últimos 10 anos 5
Tabela 2 - Parâmetros clínicos no grupo geral e divididos conforme perda de tecido ósseo avaliada pelo BV/TV 34
Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos no grupo geral e divididos conforme perda de tecido ósseo avaliada pelo BV/TV 36
Tabela 4 - Dosagens hormonais conforme o sexo 38
Tabela 5 - Densidade mineral óssea no grupo geral e divididos conforme perda de tecido ósseo avaliada pelo BV/TV 39
Tabela 6 - Resultados da histomorfometria óssea (parâmetros estruturais) no grupo geral e divididos conforme perda de tecido ósseo avaliada pelo BV/TV 41
Tabela 7 - Resultados da histomorfometria óssea (parâmetros de formação) no grupo geral e divididos conforme perda de tecido ósseo avaliada pelo BV/TV 42
Tabela 8 - Resultados da histomorfometria óssea (parâmetros de reabsorção) no grupo geral e divididos conforme perda de tecido ósseo avaliada pelo BV/TV 43
Tabela 9 - Resultados da histomorfometria óssea (parâmetros dinâmicos) no grupo geral e divididos conforme perda de tecido ósseo avaliada pelo BV/TV ... 44
Tabela 10 - Expressão de fosfatase alcalina e proliferação das células osteoblásticas no grupo geral e divididos conforme perda de tecido ósseo avaliada pelo BV/TV 45
Tabela 11 - Correlações entre o PTH e parâmetros clínicos e bioquímicos 46
Tabela 12 - Correlações da DMO lombar com parâmetros clínicos e bioquímicos 47
Tabela 13 - Correlações da DMO do fêmur parâmetros clínicos e bioquímicos 47
Tabela 14 - Correlações entre BV/TV, Tb.Sp e Tb.N com parâmetros clínicos, bioquímicos e densitométricos 48
Tabela 15 - Correlações entre OV/BV, O.Th, OS/BS, Ob.S/BS, MS/BS, BFR/BS e Mlt com parâmetros clínicos, bioquímicos e densitométricos 48
Tabela 16 - Correlações entre ES/BS e Oc.S/BS com parâmetros clínicos, bioquímicos e densitométricos 49
Tabela 17 - Correlações entre BV/TV, Tb.Sp e Tb.N com a proliferação de células Osteoblásticas 50
Tabela 18 - Regressões lineares múltiplas nos parâmetros bioquímicos 50
Tabela 19 - Regressões lineares múltiplas na densitometria óssea 50
Tabela 20 - Regressões lineares múltiplas nos parâmetros histomorfométricos 51

1 INTRODUÇÃO

Atualmente no Brasil, cerca de 1,6 milhões de indivíduos apresentam algum grau de doença renal crônica (DRC), setenta mil encontram-se em programa de terapia renal substitutiva (hemodiálise ou diálise peritoneal) e aproximadamente 33 mil são elegíveis para transplante renal aguardando um órgão[1]. Em 2005, 3362 transplantes renais foram realizados no Brasil[2]. A melhora na qualidade de vida e diminuição da morbidade fazem do transplante renal a melhor alternativa de tratamento desses pacientes. Entretanto, apesar do sucesso dessa terapia, essa população apresenta elevada incidência de complicações, como doenças cardio-vasculares, metabólicas (dislipidemias, diabete melito e doença óssea) e neoplásicas. A persistência da doença óssea após o transplante é frequente, piora a qualidade de vida e aumenta a morbi-mortalidade.

1.1 Distúrbios do metabolismo mineral na doença renal crônica

As modificações sistêmicas decorrentes de alterações do metabolismo mineral [cálcio (Ca), fósforo (P), paratormônio (PTH) e vitamina D] da remodelação, mineralização, volume, resistência, crescimento ósseo, bem como a presença de calcificações vasculares e/ou ectópicas compõem o que se define atualmente como os distúrbios do metabolismo mineral na doença renal crônica (DMM-DRC). O termo Osteodistrofia Renal (OR) é usado para definir as alterações ósseas desses pacientes[3].

A biópsia óssea é considerada como o método diagnóstico mais preciso para avaliar e diferenciar os diversos tipos de OR. A taxa de formação óssea, parâmetro obtido da análise histomorfométrica, é o índice normalmente utilizado para classificar a OR em doença de alta ou baixa remodelação. A doença óssea de alta remodelação é representada pela Osteíte Fibrosa (OF), manifestação óssea do hiperparatiroidismo; e a de baixa remodelação, pela Doença Óssea Adinâmica (DOA) e Osteomalácia (OM), que também apresentam defeito de mineralização. O estado intermediário entre a alta e a baixa remodelação é denominado de Doença Mista, atualmente classificada como de alta remodelação[3].

1.2 Doença óssea após o transplante renal

O transplante renal (TxR) bem sucedido geralmente corrige ou melhora os DMM-DRC.

Porém muitos pacientes persistem com alterações ósseas, resultado de uma complexa interposição de diferentes fatores. Dentre eles, vale ressaltar a resolução incompleta dos DMM-DRC devido ao funcionamento deficiente do enxerto e a ação de drogas imunossupressoras.

Os transplantados também estão sujeitos aos mesmos fatores de risco para perda de massa óssea, isto é, o desenvolvimento de osteoporose, observados na população geral, ou seja, idade, sexo, raça, hipogonadismo, estado nutricional e atividade física. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS)[4], a OP caracteriza-se pela diminuição da massa óssea e por alterações na microarquitetura desse tecido. Estudos realizados em

mulheres caucasianas originaram os índices que a OMS utiliza para definir osteopenia (escore T entre -1 a -2.5 DP) e osteoporose (escore T < -2.5 DP). A definição de OP na população transplantada necessita ser mais ampla, distinta da utilizada para a população geral e estabelecida pela OMS, pois esses pacientes apresentam particularidades.

O *National Institute of Health* (NIH)[5] definiu a doença óssea após o transplante como "... alteração esquelética que compromete a integridade óssea predispondo à fratura. A integridade compreende: densidade e qualidade óssea." Por isso, "a integridade óssea e o risco de fraturas deverão ser avaliados pela combinação da densidade, arquitetura, remodelação, alterações pregressas ao transplante e a eficiência como as lesões do tecido ósseo foram corrigidas". A biópsia óssea (BxO) seria o método de escolha para o diagnóstico de osteoporose pois forneceria informações que contemplam esses aspectos. Entretanto, como a densidade mineral óssea (DMO) é um método não invasivo e muito difundido, a maior parte dos estudos utiliza essa técnica diagnóstica na população transplantada.

As principais conseqüências da diminuição da massa óssea são maior risco de fraturas e maior incidência de doenças cardio-vasculares (DCV). A prevalência de fraturas entre transplantados renais varia de 7 a 24%, de acordo com a presença de fatores, como: idade avançada, tempo de DRC, tempo de TxR, presença de diabete melito, neuropatia e vasculopatia periférica, menopausa e dose acumulada de corticóides[6,7,8,9,10]. Em um estudo populacional[7], o risco de fraturas nesta população chegou a ser 5

vezes maior que na população geral, sendo até 23 vezes maior quando analisada na coluna vertebral. A DMO normal em pacientes transplantados não afasta o risco de fratura, visto que pode haver alterações na integridade óssea não detectadas pela densitometria. Nesta população, a correlação entre DMO e risco de fratura não está estabelecida[5,11].

Apesar de tradicionalmente OP e DCV serem vistos como entidades distintas que aumentam em prevalência conforme a idade, várias evidências sugerem mecanismos fisiopatológicos comuns. Atualmente, a pós-menopausa, idade avançada, dislipidemia, estresse oxidativo, inflamação, hiperhomocisteinemia, hipertensão arterial e diabete melito são fatores de risco para DCV e OP[12]. Estudo com 5050 voluntários normais com idade entre 50 e 79 anos demonstrou que aqueles indivíduos com antecedentes de infarto agudo do miocárdio apresentavam 1,28 vezes mais chance de ter DMO reduzida[13]. Outro estudo que envolveu 2576 mulheres menopausadas, com média de idade de 66,5 anos e acompanhamento de 4 anos, revelou que aquelas com osteoporose tiveram 3,9 vezes mais risco de desenvolver eventos cardio-vasculares[14]. Entre os transplantados renais, a DCV ainda é a principal causa de morbi-mortalidade.

Nos últimos anos vários estudos avaliaram as alterações ósseas após o transplante renal, empregando a densitometria e/ou a biópsia óssea.

A Tabela 1 resume os resultados dos estudos realizados nos últimos 10 anos que utilizaram a biópsia para análise da doença óssea após o transplante.

Tabela 1 - Estudos clínicos que utilizaram a biópsia óssea para análise da doença óssea após o transplante, nos últimos 10 anos

AUTOR, ANO	Nº de PACIENTES	TEMPO TX RENAL	FUNÇÃO ENXERTO	ALTERAÇÕES ÓSSEAS
Rolla, 2006[15]	20	99,6 ± 22,8 m	1,5 ±0,14 mg/dl	35% Osteoporose 30% OF 30% OM 5% Normal
Abdallah, 2006[16]	13	12 m	1,6 ± 0,5 mg/dl	Pacientes com DOA na diálise 50% BX normal e 50% com graus diferentes de DOA.
Cruz, 2004[17]	20	6 m	1,15 mg/dl	55 % DOA 40% Doença leve 5% OM 10% Intox AL 15% Ferro
Cueto Manzano, 2003[18]	25	140 ± 75 m	1,39 mg/dl	42% Doença Mista 29% DOA 17% OF 12% Normal
Rojas, 2003[19]	20	0.7 - 5.3 m	1,3 ± 0,2 mg/dl	35% OF 30% Doença Mista 15% DOA 10% Osteoporose 5% OM 5% Normal
Montalban, 2003[20]	29	156 ± 40m	1,3 ± 0,33 mg/dl	75,8% Remodelação Normal 13,8% Alta remodelação 10,3% Baixa remodelação 34,5% Retardo mineralização 6,8% Intox AL 24% osteoporose lombar 45 % osteoporose fêmur
Parker, 2002[21]	37	96 ± 13.2 m (12-216 m)	1,4 ± 0,08 mg/dl	51,3% OF 37,8% DOA 5,4% OM 5,4% Normal
Monier-Faugere, 2000[22]	57	67.2 ± 9.6 m (6-324 m)	1,68 ± 0,11 mg/dl	56,1% Osteoporose 45,6% Baixa remodelação 28,1%Remodelação normal 26,3% Alta remodelação 87,5% Retardo da Mineralização 36,8% OM 0% Ferro / 15,8% Intox AL
Carlini, 2000[23]	25	90 ± 68.4 m	1,3 ± 0,1 mg/dl	44% Osteoporose 66% ? BFR e ? Mlt 0% Ferro nem AL
Martins, 2000[24]	8	6m	1,2 ± 0,3 mg/dl	50% OF 12,5% DOA 37,5% Normal 12,5% Defeito mineralização e osteoporose
Cueto-Manzano, 1999[25]	45	127 ± 70m	1,44 ± 0,25 mg/dl	46,5% Doença mista 23,2% DOA 13,9% OF 16,3% Normal
Velásquez-Forero, 1996[26]	16	84 m	1,1 ± 0,2 mg /dl	75% DOA e defeito de mineralização

DOA: doença óssea dinâmica; OM: osteomalácia; Intox AL: intoxicação por alumínio; OF: osteíte fibrosa; BFR/BS ($\mu m^3/\mu m^2$/dia): taxa de formação óssea; Mlt (dias): intervalo de tempo para mineralização.

1.3 Patogenia da doença óssea após o transplante renal

1.3.1 Hipercalcemia e hiperparatiroidismo persistente

A hipercalcemia é uma alteração freqüente após o TxR, geralmente secundária à persistência de níveis elevados de PTH. O PTH estimula a síntese de calcitriol, que aumenta a absorção intestinal de Ca, além de aumentar a reabsorção óssea e, portanto, a calcemia. A correção da uremia e a normalização dos níveis de P melhoram a mobilização de Ca do esqueleto através da correção da resistência óssea ao PTH. A reabsorção de calcificações em tecidos moles, imobilização prolongada, altas doses de corticóide e hipofosfatemia contribuem para a manutenção da hipercalcemia.

A prevalência de hipercalcemia nos primeiros 3 meses após o TxR varia de 45 a 52%, dependendo dos níveis de PTH e da função do enxerto[27,28]. No final do primeiro ano, a prevalência diminui para 10 a 45%[28,29]. A hipercalcemia pode favorecer a disfunção precoce do enxerto, aumentando em 2,5 vezes o risco de retardo no funcionamento do transplante[30]. Tardiamente, a nefrocalcinose pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de nefropatia crônica do transplante[31]. Raramente, a hipercalcemia pode ser a causa de calcifilaxia no pós-transplante renal[32].

Os níveis de PTH tendem a diminuir rapidamente com o funcionamento do enxerto. A queda é mais lenta nos 3 a 6 meses seguintes, estabilizando no final do primeiro ano[33]. A prevalência do hiperparatiroidismo no final do primeiro ano varia de 17 a 28%[28].

Os principais preditores da persistência do hiperparatiroidismo são tempo de DRC, níveis elevados de PTH prévios ao transplante, tamanho das glândulas paratiroideanas, presença de hiperplasia nodular, recuperação incompleta da função do enxerto, diminuição da absorção intestinal de Ca pelo uso de corticóides e diminuição dos níveis ou resistência à ação da 25(OH) D e 1,25$(OH)_2$ D[27,28,29,33,34].

A persistência do hiperparatiroidismo favorece a hipercalcemia e a perda de massa óssea precoce[17,35] e tardia[36,37,38]. Entretanto, Casez JP e cols, avaliando a densidade mineral óssea do corpo total, membros e tronco, de pacientes com níveis de PTH superiores a 109 pg/ml[37], encontraram recuperação ou estabilização da perda óssea após o primeiro ano do transplante. Esses autores sugerem a presença de um efeito anabólico do PTH no tecido ósseo.

A minoria dos pacientes transplantados (1,4 a 17,2%) necessita de paratiroidectomia (PTX)[39,40,41]. As principais indicações para PTX são hipercalcemia sintomática ou assintomática acompanhada por níveis elevados de PTH. Os níveis de PTH ideais são aqueles recomendados para os diferentes níveis de DRC e devem ser levados em consideração na indicação de PTX[42].

1.3.2 Drogas imunossupressoras

1.3.2.1 Corticóides

O corticóide é uma droga deletéria ao tecido ósseo, mesmo em indivíduos sem antecedentes de doenças ósseas metabólicas[43].

Os corticóides apresentam vários efeitos nas células ósseas. Contudo, seu efeito prejudicial mais evidente é sobre os osteoblastos e, portanto, sobre a formação óssea. Os corticóides diminuem o número de osteoblastos, através da menor diferenciação das células mesenquimais e da indução de apoptose de osteoblastos e osteócitos[44]. Além desses efeitos, inibem a função dessas células, diminuindo a síntese de colágeno tipo 1, osteocalcina, proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), fator de crescimento transformante ß (TGF-β) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1)[5]. Estimulam indiretamente a osteoclastogênese, através do aumento da síntese do ligante do receptor ativador do NFkB (RANKL) e da diminuição da osteoprotegerina (OPG)[45].

Os corticóides também favorecem o desenvolvimento ou perpetuação do hiperparatiroidismo secundário por diminuir a absorção intestinal de Ca e aumentar a calciúria. São drogas que também induzem o hipogonadismo hipogonadotrófico, diminuindo a ação trófica dos hormônios sexuais sobre o tecido ósseo.

Os efeitos dos corticóides no metabolismo ósseo de pacientes transplantados renais são precoces. Julian e cols.[46] em estudo prospectivo demonstraram perda de 6,8% da massa óssea, avaliada pela DMO, após 6 meses do TxR. Esses mesmos autores realizaram biópsia óssea e os resultados revelaram sinais da ação dos corticóides, ou seja, diminuição da formação e aumento da reabsorção óssea. A perda de massa óssea precoce e tardia foi correlacionada, em outros estudos, ao uso de corticóide e documentada por densitometria[47,48,49] e biópsia óssea[19,26]. Vários protocolos

de imunossupressão usam doses reduzidas ou preconizam interrupção precoce dos corticóides após o transplante, sem prejuízo para a função do enxerto e com diminuição da perda óssea, bem como menor incidência de necrose óssea e fraturas[50].

1.3.2.2 Ciclosporina (CSA), Tacrolimus (FK) e outros imunossupressores

Os inibidores de calcineurina, como CSA e FK, atuam nas células ósseas através de mecanismos complexos e pouco compreendidos.

Estudos experimentais em camundongos tratados com CSA demonstraram que a mesma estimula a remodelação óssea, intensificando a reabsorção em detrimento da formação[51,52]. Em outro estudo, também em camundongos, apesar do aumento na concentração sérica de $1,25(OH)_2D$ e osteocalcina, os animais mantiveram reabsorção óssea aumentada[53].

Avaliando osteoblastos em cultura, demonstrou-se que a CSA foi capaz de diminuir a proliferação e aderência dessas células[54,55]. Outros trabalhos revelaram que a CSA diminuiu a atividade da fosfatase alcalina e a síntese de proteínas da matriz extracelular como colágeno tipo 1[54,56]. Hofbauer e cols[57] evidenciaram que ratos expostos a CSA e FK, apresentavam diminuição do RNA mensageiro (RNAm) da OPG e aumento do RNAm do RANKL em células do estroma da medula óssea. Nesse mesmo estudo, a CSA também diminuiu o RNAm da OPG em cultura de células musculares lisas coronarianas.

Há outros mecanismos que explicam o aumento da reabsorção óssea promovido pela CSA. Wimalawansa e cols sugerem que a CSA induziria a

reabsorção através do aumento da síntese do óxido nítrico[58]. Essa droga não foi capaz de inibir a síntese de interleucina-6 (IL-6, um fator osteoclastogênico) pelos osteoblastos[59] e o transporte ácido nas vesículas da membrana celular dos osteoclastos[60].

Paradoxalmente, em estudo clínico, Westeel e cols[61] encontraram uma estabilização da DMO de pacientes transplantados renais entre 3 a 24 meses após o transplante. Relacionaram esse achado ao uso de doses elevadas de CSA e redução do corticóide, independente da função renal, dos níveis séricos de PTH e da vitamina D. Alguns autores sugerem que o estímulo da remodelação óssea, secundário ao uso de CSA, contrabalançaria o efeito inibitório do corticóide sobre a formação óssea[61,62].

Com relação ao FK, os estudos experimentais são contraditórios; alguns demonstram indução de hipocalcemia com aumento do PTH[51] e de marcadores de reabsorção[63], além de redução significativa da espessura trabecular quando comparados aos animais tratados com CSA. Por outro lado, outros estudos[64] revelaram menor redução da DMO em animais tratados com FK. Os autores atribuíram esse efeito a maior síntese de IGF-1. Abdelhadi e cols[65] relataram diminuição do conteúdo mineral ósseo e do volume trabecular em camundongos, cujo efeito foi dose-dependente tanto para CSA quanto para o FK.

Alguns autores chamam atenção para um provável potencial osteogênico do FK sobre enxertos ósseos em camundongos[66,67,68]. Essa ação foi atribuída à capacidade do FK em induzir diferenciação osteoblástica a partir de células mesenquimais. Esse estudo demonstrou também

aumento da expressão e atividade da fosfatase alcalina (FA) e osteocalcina (OC), que foi potencializado pela BMP-4[69].

Recentemente, evidenciou-se efeito direto de CSA e FK sobre osteoblastos e osteoclastos. Sun e cols. demonstraram a presença de calcineurina nos osteoblastos, proteína que atuaria na expressão de marcadores de diferenciação dessa linhagem celular como o fator transcricional Cbfa1 / Runx 2 *(core-binding factor alpha1)*, além de outras proteínas como a FA, sialoproteína e OC[70]. Sabe-se que tanto CSA como FK são inibidores da calcineurina. Koga e cols sugerem que o NFAT (fator nuclear de células T ativadas), assim como o NFkB, atuam no programa transcricional dos osteoblastos, estimulando a produção de colágeno 1, ação que seria inibida pelo FK[71]. Varanasi e cols demonstraram a presença da FKBP-12 nos osteoblastos. Trata-se de uma imunofilina citosólica responsável pela ação do FK, estando relacionada à supressão da expressão do RNAm do Cbfa1 e o gene OSTERIX, co-fator transcricional para expressão do Cbfa1[72]. A figura 1 resume os possíveis mecanismos de ação da CSA e do FK nas células osteoblásticas.

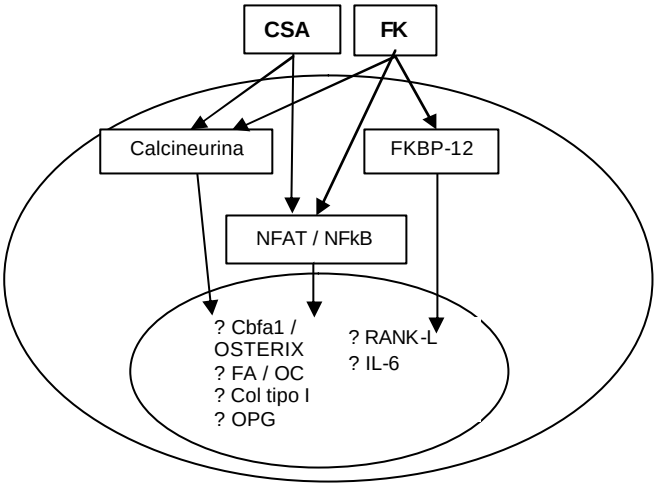

Figura 1 - Mecanismo de ação da CSA e do FK nas células osteoblásticas.

Nos osteoclastos, a CSA e o FK, através da inibição da calcineurina, levariam a uma diminuição da diferenciação mediada pelo NFAT e NFkB[71,73]. Acredita-se que a inibição da diferenciação dos osteoclastos, também seja mediada pela indução de apoptose de células precursoras[74]. Para justificar o aumento da reabsorção óssea induzida pela CSA e FK, Sun e cols demonstraram que a inibição da calcineurina estimularia a função de osteoclastos maduros[75]. A figura 2 resume os prováveis mecanismos de ação da CSA e do FK nas células osteoclásticas.

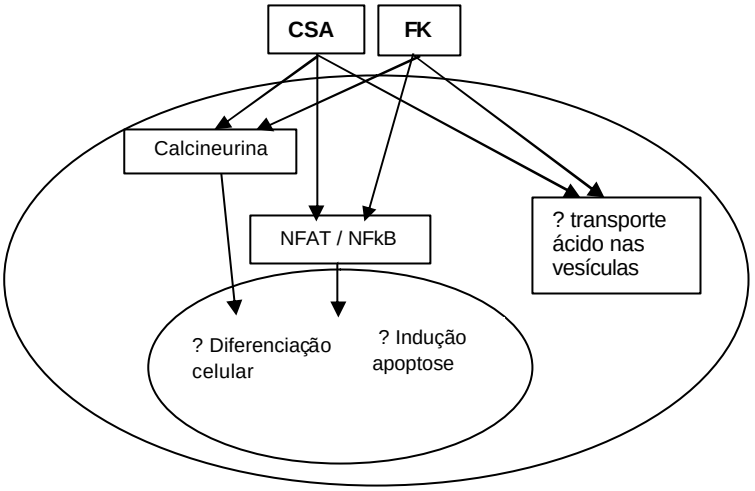

Figura 2 - Mecanismo de ação da CSA e do FK nas células osteoclásticas.

Há muita divergência com relação aos efeitos da CSA e do FK sobre a perda óssea de pacientes transplantados. Estudos clínicos prospectivos sugerem que no primeiro ano após TxR e de fígado, o tacrolimus promoveria uma menor perda de massa óssea que a CSA[77,78]. Outros estudos com transplantados cardíacos salientam importante perda óssea com o uso do FK[80]. Há ainda aqueles que demonstram não haver diferença do tipo de imunossupressão na DMO no TxR tardio[81]. Entretanto, esses estudos avaliaram um número pequeno de pacientes e não foram desenhados para investigar os efeitos dos imunossupressores sobre o tecido ósseo.

A rapamicina tem sido relatada como um imunossupressor capaz de diminuir a perda óssea em camundongos[52]. Outros estudos relatam estímulo à proliferação de osteoblastos, aumentando a atividade de FA e a expressão de osteopontina e osteocalcina[56]. Em cultura de osteoblastos, a rapamicina, aumentou a expressão do RNAm da OPG[57] e inibiu a diferenciação e função de osteoclastos[82]. Campistol e cols, em estudo aberto e randomizado, demonstraram que os pacientes em uso de CSA apresentavam aumento dos

marcadores de remodelação óssea quando comparados aos que utilizaram rapamicina[83].

1.3.2.3 Situação hormonal

Os estrógenos influenciam inúmeros processos fisiológicos, incluindo a reprodução, saúde cardiovascular, integridade óssea, cognição e comportamento. Por isso, podem estar implicados no desenvolvimento ou progressão de várias doenças como câncer (mama, ovário, endométrio e cólon), osteoporose, doenças neuro-vegetativas, cardio-vasculares, resistência à insulina e obesidade.

Poucos estudos abordam a insuficiência gonadal como causa de perda de massa óssea em mulheres transplantadas. Cueto-Manzano e cols estudaram 30 pacientes transplantados, sendo 13 mulheres menopausadas, com uma média de 13 meses de transplante. Os pacientes realizaram densitometria e biópsia óssea. Nas mulheres, os níveis de estradiol foram preditores independentes da superfície osteoblástica, superfície osteóide e espessura trabecular[84]. Em análise retrospectiva de 67 pacientes, com 6 a 20 anos de TxR, o estado pós-menopausal esteve associado com redução da DMO lombar. Entre as mulheres menopausadas, os níveis reduzidos de estradiol e elevados de hormônio luteinizante (LH) se correlacionaram com a intensidade da perda óssea avaliada pela DMO[85]. Não há estudos com intervenção terapêutica (terapia de reposição hormonal – TRH) em transplantadas renais.

1.3.2.4 Hipofosfatemia

A hipofosfatemia é frequente nos pacientes transplantados. Cerca de 50 a 80% desenvolvem hipofosfatemia severa entre 2 semanas a 3 meses do pós-operatório[86]. Essa alteração é atribuída à diminuição da reabsorção tubular e absorção intestinal de fosfato. O transporte tubular proximal de fosfato é um mecanismo ativo, Na-dependente, realizado pelos co-transportadores do tipo IIa, presentes na borda em escova.

Os principais mecanismos responsáveis pela hipofosfatemia seriam a persistência do hiperparatiroidismo, a necrose tubular aguda, a deficiência relativa de 1,25 $(OH)_2D$, o uso de corticóides e de ciclosporina[86], além de fatores séricos circulantes (fosfatoninas: FGF-23 - fator de crescimento do fibroblasto), que aumentam a fração de excreção de fósforo por inibir o co-transportador Na/Pi tipo IIa[87]. A hipofosfatemia pode contribuir para o retardo da mineralização, osteopenia[17,22], indução da apoptose dos osteoblastos e da reabsorção óssea[19].

1.3.2.5 Distúrbios do metabolismo da vitamina D

São poucos os estudos que avaliaram os níveis de 25 (OH)D e 1,25 $(OH)_2$ D no transplante renal, correlacionando-os com a DMO, marcadores de remodelação ou dados de biópsia óssea. Querings e cols[88] avaliaram 31 pacientes em diferentes períodos após TxR, no final do inverno e com boa função renal. Os níveis de 25 (OH) D foram menores quando comparados aos controles; porém, não demonstraram nenhuma correlação com os parâmetros de remodelação óssea. A deficiência de 25 (OH) D pode ser

mais um fator de risco para a persistência do hiperparatiroidismo após TxR[33]. Com relação à 1,25 $(OH)_2$ D, Sevaux e cols[89] estudaram prospectivamente 61 pacientes transplantados renais durante 6 meses. Todos apresentavam níveis reduzidos de 1,25 $(OH)_2$ D no momento do transplante. Apesar da elevação dos níveis séricos dessa vitamina após 3 e 6 meses do transplante, cerca de 64% e 47% dos pacientes, respectivamente, mantinham níveis abaixo do recomendado. A deficiência de calcitriol no final do primeiro ano do transplante pode ser preditor de perda óssea lombar tardiamente[81].

Com relação ao polimorfismo do receptor da vitamina D, alguns autores encontraram menor perda de massa óssea, mesmo na presença de níveis elevados de PTH, em pacientes com o genótipo bb[90,91].

Alguns estudos associaram a presença de retardo na mineralização óssea, detectada em transplantados tardios, com resistência à ação da vitamina D[20,22].

Vários estudos analisaram a doença óssea após o transplante renal, especialmente no primeiro ano. A maioria deles demonstraram sinais de hiperparatiroidismo ou doença adinâmica, provalmente refletindo a doença óssea presente na fase da diálise[17,24,46], além de alterações ósseas atribuídas à ação dos corticosteróides[19,46].

Os trabalhos que avaliaram a doença óssea após esse período são muito heterogêneos e descrevem um predomínio de baixo remanejamento associado a defeito de mineralização[26] ou doença mista com aumento do número de osteoclastos[25], osteoblastos e do volume osteóide[20,22,23]. A

osteoporose apresentou uma prevalência de 12 a 56%[15,22,23,24]. A correlação dos achados histomorfométricos com a dose acumulada de corticóide é variável[15,22,23]. Não houve correlação entre a densitomeria óssea e marcadores ósseos, como o PTH, nem entre a 1,25 $(OH)_2$ D e a histomorfometria[15,20,22,23]. Dentro de uma mesma série de pacientes houve muita variabilidade com relação ao tempo de transplante, à função do enxerto renal e à inclusão de mulheres menopausadas; fatores que interferem na remodelação óssea. Nesses estudos, encontramos um predomínio de doença de baixa remodelação ou de doença mista.

Ainda há muita controvérsia quanto a influência independente de todos os fatores aqui apresentados, sobre a doença óssea do transplante tardio.

2 OBJETIVOS

- **Principal**

Avaliar o metabolismo mineral e o tecido ósseo de pacientes adultos jovens transplantados renais, após o segundo ano, com função preservada, imunossupressão mantida desde início do transplante e utilizando dose mínima de corticosteróide.

- **Secundários**

Estabelecer os possíveis fatores, clínicos ou laboratoriais, determinantes da massa e remodelação óssea.

Avaliar “in vitro” as características funcionais dos osteoblastos obtidos de fragmentos de osso trabecular da biópsia óssea desses pacientes.

3 MÉTODOS

3.1 Seleção dos pacientes

No período de janeiro de 2003 a dezembro de 2004, avaliamos 520 prontuários de pacientes submetidos a transplante renal na Unidade de Transplante Renal do Serviço de Urologia do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Desses, 260 foram excluídos devido à idade, ou seja, apresentavam menos de 18 anos ou mais de 50 anos. Quarenta pacientes perderam o enxerto ou evoluíram para óbito, ainda com enxerto funcionante. Cinqüenta e sete foram excluídos porque o esquema de imunosupressão foi modificado ao longo do seguimento. Trinta e quatro pacientes foram excluídos, pois apresentavam *clearance* de creatinina inferior a 50 ml/minuto. Pacientes que receberam duplo transplante (rim-pâncreas ou rim fígado), que foram previamente paratireoidectomizados, mulheres na menopausa e aqueles tratados com bisfosfonatos e/ou análogos da vitamina D nos últimos 6 meses também foram excluídos. Dessa forma, restaram 125 pacientes. Somente 44 completaram a avaliação clínica, laboratorial, além de realizarem densitometria óssea. Vinte e sete pacientes concordaram em realizar a biópsia óssea, sendo essa a amostra final desse estudo.

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPESQ da Diretoria Clínica do Hospital das

Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo de Pesquisa nº 848-03).

3.2 Avaliação clínica da doença óssea

Inicialmente os pacientes responderam a um questionário sobre antecedentes de doença óssea no período da diálise e após o transplante renal (anexo A). Os parâmetros clínicos analisados foram: idade, sexo, raça, causa da DRC, tempo em diálise, fratura óssea no período da diálise (espontânea ou por mínimo trauma), número de transplantes, tempo de transplante, tipo de doador, fratura óssea após o transplante (espontânea ou por mínimo trauma), dose acumulada de corticosteróides até a inclusão no estudo, além do cálculo do índice de massa corpórea (IMC).

3.3 Avaliação laboratorial

Analisamos a creatinina sérica e calculamos a função renal pelo clearance de creatinina através da equação de Cockroft-Gault. Foram avaliadas as concentrações séricas de cálcio (Ca), fósforo (P), paratormônio (PTH), albumina, bicarbonato em sangue venoso, fosfatase alcalina total e fração óssea, deoxipiridinolina, 25 (OH) D, 1,25 $(OH)_2$ D, tiroxina (T4 livre) e hormônio tireo-estimulante (TSH), prolactina, hormônio luteinizante (LH), hormônio foliculo-estimulante (FSH), estradiol, progesterona, testosterona, osteoprotegerina (OPG). As mulheres foram orientadas a colher os hormônios sexuais até o 3º dia após o início da menstruação, na fase

folicular ou pré-ovulatória. No Anexo B encontram-se os valores normais de referência e o método de dosagem desses parâmetros.

3.4 Avaliação da densitometria óssea

A densitometria da coluna lombar e do fêmur foi realizada com aparelho da marca Hologic QDR 2000® através do método de DEXA (Dual-energy X-ray absorptiometry). A densidade mineral óssea foi mensurada em valor absoluto (g/cm²), "score" T (quando comparamos com indivíduos jovens no pico da massa óssea) e Z (quando comparamos com indivíduos do mesmo sexo e mesma faixa etária), fornecidos em desvio-padrão da média. Optamos pelo "score" Z. Nesse estudo avaliamos os valores da densidade mineral óssea de L1-L4 e fêmur total.

3.5 Biópsia óssea e análise histomorfométrica

A biópsia óssea foi realizada no osso ilíaco direito ou esquerdo (lado contrário ao enxerto renal), 2 cm posterior à espinha ilíaca ântero-superior e 2 cm abaixo da crista ilíaca, utilizando trefina elétrica (Gaulthier Medical, Rochester, EUA). Os pacientes recebiam sedação leve com midazolam 7,5mg intramuscular e anestesia local com lidocaína 2% sem vasoconstritor, injetando-se 15ml na pele, tecido celular subcutâneo, músculo e periósteo da tábua externa e 5ml no periósteo da tábua interna do osso ilíaco. No ponto indicado acima, realizamos incisão de aproximadamente 1 cm na pele e tecido subcutâneo. Após o afastamento dos planos musculares, o mandril foi fixado à superfície óssea (periósteo). Através do mandril introduzimos a

trefina elétrica, retirando um fragmento de ± 1 cm de comprimento por 0,8cm de largura, onde se identificavam as duas corticais e osso trabecular. O fragmento ósseo foi colocado em meio de cultura estéril (Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM - com tampão HEPES 25 mM, 500 μg/mL de Ampicilina, 500 μg/mL de Estreptomicina e 3 μg/mL de Anfotericina B).

Antes da biópsia, os pacientes receberam Tetraciclina 500mg por via oral de 12/12h, em duas tomadas de 3 dias, com 10 dias de intervalo entre as mesmas.

Após a retirada dos fragmentos para obtenção de células para cultura, o tecido ósseo foi processado conforme protocolo:

a) Fixação no etanol 70% por 3 dias.

b) Permanência no etanol 100% por 3 dias.

c) Permanência no Tolueno por 1 dia.

d) Permanência na solução A (75% metilmetacrilato + 25% dibutilftalato) por 3 dias.

e) Permanência na solução A + peróxido de benzoíla 1% por 3 dias.

f) Permanência na solução A + peróxido de benzoíla 2% por 3 dias.

g) Transferência do fragmento para um frasco de vidro e deixado em estufa a 37°C por 24h, período em que ocorre a polimerização do metilmetacrilato. O fragmento incluído na solução de metilmetacrilato foi cortado em micrótomo de impacto Policut S (Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Alemanha) com navalha de tungstênio e dele obtidos cortes de 5μm que foram corados com azul de toluidina 0,1%, pH 6,4 (Sigma Chemical, St. Louis, EUA). Outros cortes de 10 μm não corados, foram utilizados para

análise das marcações de tetraciclina, empregando-se uma fonte de luz ultravioleta.

A análise histomorfométrica avaliou parâmetros estruturais, de formação e de reabsorção óssea, além de parâmetros dinâmicos que analisaram a mineralização óssea. Os parâmetros seguiram a nomenclatura padronizada pela *American Society of Bone and Mineral Research* (ASBMR), traduzida para o português, com exceção das abreviações[92]. Os valores normais dos parâmetros estruturais, de formação e de reabsorção óssea foram obtidos de dados de Dos Reis e cols[93] e os dinâmicos de Melsen e cols[94] (anexo C). Para leitura dos parâmetros histomorfométricos utilizamos microscópio Nikon Labophot-2A e o software Osteomeasure (Osteometrics, Inc, Atlanta, EUA). A quantificação da biópsia se fez entre as duas regiões corticais, com aumento de 125x. Os parâmetros analisados foram:

a) Parâmetros estruturais

Volume ósseo (BV/TV %): volume ocupado pelo osso trabecular, mineralizado ou não, expresso em porcentagem do volume ocupado pelas traves e pela medula óssea.

Espessura das traves (Tb.Th µm): espessura das trabéculas ósseas, em micrômetro.

Separação das traves (Tb.Sp µm): distância entre as trabéculas ósseas.

Número de traves (Tb.N /mm): número de trabéculas ósseas, por milímetro do tecido, expressa a densidade trabecular.

b) Parâmetros de formação óssea

Volume osteóide (OV/BV %): volume ocupado pelo osso não mineralizado (osteóide), expresso em porcentagem do volume ocupado pelas traves e pela medula óssea.

Espessura osteóide (O.Th µm): a espessura, em micrômetro, da matriz osteóide depositada.

Superfície osteóide (OS/BS %): porcentagem da superfície óssea trabecular recoberta por matriz osteóide.

Superfície osteoblástica (Ob.S/BS %): porcentagem da superfície trabecular recoberta por osteoblastos ativos, em relação à superfície total de traves ósseas.

c) Parâmetros estáticos de reabsorção óssea

Superfície de reabsorção (ES/BS %): porcentagem da superfície trabecular recoberta por lacunas de Howship.

Superfície osteoclástica (Oc.S/BS %): porcentagem da superfície trabecular em contato com osteoclastos, em relação à superfície total de traves ósseas.

d) Parâmetros dinâmicos

Taxa de aposição mineral (MAR µm/dia): distância entre os bordos de duas marcações pela tetraciclina dividida pelos dias decorridos entre as duas marcações.

Superfície mineralizante (MS/BS %): porcentagem de superfície trabecular recoberta por duplas e simples marcações pela tetraciclina, em relação à superfície de traves ósseas.

Taxa de formação óssea (BFR/BS µm³/µm²/dia): produto entre a taxa de aposição mineral e superfície mineralizante.

Taxa de formação óssea ajustada/corrigida (Aj.Ar µm/dia): taxa de formação óssea dividida pela superfície osteóide.

Intervalo de tempo para mineralização (Mlt dias): intervalo de tempo médio para deposição e a mineralização de certo volume de matriz osteóide.

O volume ósseo (BV/TV) foi utilizado para descriminar os pacientes que perderam tecido ósseo (RVO) daqueles que o mantiveram (NVO). Pacientes cujo BV/TV era menor que 1 desvio-padrão (DP) da média dos controles apresentavam perda óssea. A média do BV/TV nos homens normais foi de 25,8 ± 5,8% e nas mulheres 23,5 ± 7,5%. Assim, neste estudo homens e mulheres com BV/TV menor que 20,0% e 16%, respectivamente, apresentavam perda óssea. Todos os parâmetros histomorfométricos foram considerados como alterados se estivessem acima ou abaixo de 1 DP (um desvio-padrão) da média. A formação óssea foi avaliada através da taxa de formação (BFR/BS), ou seja, pacientes com BFR/BS = 0,05 µm³/µm²/dia apresentavam diminuição da formação óssea.

3.6 Cultura de células para obtenção de osteoblastos (anexo D).

Em ambiente estéril sob fluxo laminar, retiramos da biópsia óssea pequenos fragmentos de aproximadamente 1 mm^3 do osso trabecular. Os fragmentos foram lavados com PBS (tampão fosfato salino) para a retirada de células da medula óssea. A seguir, foram distribuídos em placa de Petri

de poliestireno 100mm² (Nunc, Ilinois, EUA) na qual foram adicionados 10 mL de meio de cultivo DMEM suplementados com 100µg/mL de Ampicilina, 100µg/mL de Estreptomicina, 2,5µg/mL de Anfotericina B e 10% de soro fetal bovino – SFB (Cultilab, Campinas, Brasil) = (DMEM + SFB + ANTB)=(DMEM suplementado).

As placas foram cultivadas a 37°C em estufa de CO_2 a 5%, trocando-se o meio de cultura três vezes por semana. Após um período de 2 a 3 semanas, os fragmentos foram retirados e as células mantidas em meio de cultura até atingir confluência.

Uma vez confluentes as células foram dissociadas com solução de Tripsina 0,5 g/L (1:250)/EDTA 0,2 g/L (Invitrogen Corporation, São Paulo, Brasil). Uma alíquota foi transferida para novo cultivo em garrafa de 75 cm^2 (NUNC, Illinois, EUA) com DMEM + SFB + ANTB (1ª passagem). Outra alíquota foi utilizada para realização de histoquímica para fosfatase alcalina, visando demonstrar se na amostra havia predomínio de osteoblastos. O restante foi congelado em meio de congelamento composto de 80% soro fetal bovino , 10% de DMEM e 10% de DMSO – Dimetil sulfóxido, a -70°C, durante 24 horas e posteriormente, armazenada em nitrogênio líquido.

Após confluência nas garrafas de 75cm^2, as células foram novamente dissociadas com solução de Tripsina/EDTA (2ª passagem). Uma aliquota de células foi dividida e semeada em placas de 6 orifícios (NUNC, Illinois, EUA) para avaliação da formação de nódulos ósseos, coloração para fosfatase alcalina através de histoquímica enzimática, e para adipócitos (Oil red 0,5%). O restante das células foi congelado, conforme descrito anteriormente.

Nesse estudo também foi avaliada a proliferação celular pela incorporação da ^{3}H-Timidina e a expressão de fosfatase alcalina pela citometria de fluxo.

3.7 Caracterização preliminar dos osteoblastos em cultura

Utilizamos 2 métodos para demonstrar que nossas amostras eram constituídas predominantemente por osteoblastos e um método para descartar a presença de adipócitos.

a) Histoquímica para fosfatase alcalina

Empregamos a técnica de histoquímica – método enzimático para avaliar expressão de fosfatase alcalina e caracterização das células. O meio de cultura foi aspirado, as células lavadas com PBS e em seguida tratadas com a Solução A [0,025g de Naphthol Phosphate AS-MX (Sigma, St Louis, EUA), 0,05g de 4-chloro-2-methylbenzenediazonium salt - Fast Red (Sigma,St Louis, EUA) dissolvidos em 500µl de N,N Dimetilformamida - (Merck, Darmstadt, Alemanha) e completados com 50 ml de Tris-HCl 0,05M]. Com essa solução, as células foram incubadas por 30 minutos a 37°C. Em seguida foram lavadas com PBS e fixadas com formaldeído 4%. As células foram visualizadas ao microscópio e a cor vermelha na superfície das mesmas revela a presença da fosfatase alcalina (Figura 3).

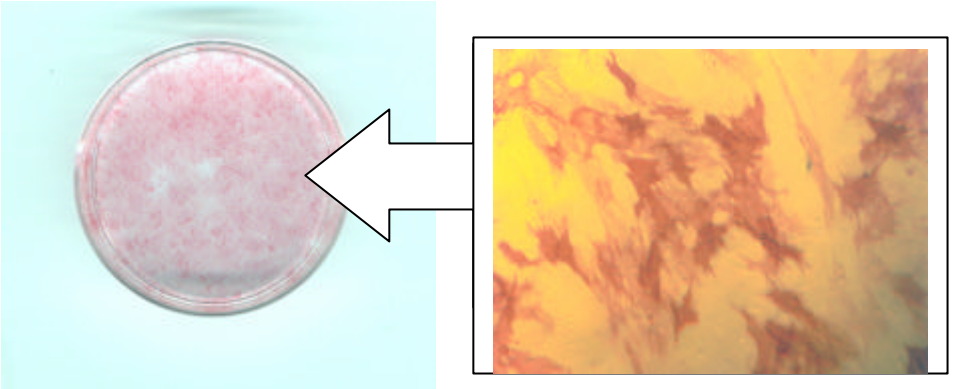

Figura 3 - Expressão de fosfatase alcalina em osteoblastos obtidos de cultura de explante ósseo (histoquímica - enzimática)

b) Formação de nódulos ósseos

A capacidade dessas células precipitarem ou não o cálcio foi avaliada com de células da 2ª passagem. Distribuímos $1x10^5$ células/orifício em placa de 6 orifícios, em meio de cultivo com DMEM + SFB + ANTB. Após a confluência das células, adicionamos ao meio de cultivo 100μg/mL de ácido ascórbico (Sigma, St Louis, EUA) e 5mM β-glicerofosfato (Sigma, St Louis, EUA) – meio de diferenciação, em 4 dos orifícios da placa, sendo que 2 dos orifícios serviram como controle. Os demais orifícios foram corados para fosfatase alcalina (histoquímica) e "Oil red". Após 21 dias de estímulo com meio de diferenciação, fixamos as células com fomaldeído a 4% e coramos com Vermelho de Alizarina 1% (Merck, Darmstadt, Alemanha), pH= 6,3, por 15 minutos. Lavamos com água destilada e observamos os depósitos de cálcio ao microscópio óptico (Figura 4).

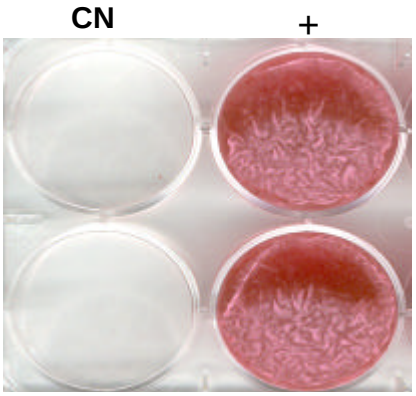

Figura 4 - Coloração vermelho de Alizarina positiva (+) em osteoblastos estimulados com β-glicerofosfato (5mM) e ácido ascórbico (100μg/ml). CN: controle negativo

c) Coloração com Oil Red para exclusão de adipócitos

Para descartar a presença de adipócitos utilizamos a coloração de "Oil Red" a 0,5% (Sigma, St Louis, EUA) em isopropanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) - solução estoque. Após a confluência das células, essas foram lavadas com PBS e coradas com a solução estoque de "Oil Red" diluída a 60 % em água destilada, durante 1 hora, acompanhando-se a coloração no microscópio óptico. Após esse intervalo de tempo, as células foram lavadas com isopropanol diluído a 60% em água, durante 2 segundos. Após essa lavagem, as células foram novamente lavadas com água destilada. Para coloração dos núcleos, utilizamos hematoxilina segundo Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha), durante 1 minuto, lavando as células a seguir.

3.8 Avaliação da proliferação celular

Avaliamos a proliferação celular através da incorporação de ^{3}H-timidina no DNA de células obtidas da 1ª passagem, semeadas em garrafas de cultivo (75cm²) até atingir confluência. Em seguida, as células foram

retiradas e distribuídas em placas de 24 orifícios ($1,8x10^4$ células em cada orifício) com meio de cultivo. No 10º dia as células foram mantidas por 12-16 horas com meio de cultivo e sem adição de soro fetal bovino. No 11º dia da cultura, acrescentamos 5µCi/ml de ^{3}H-timidina (Amersham Pharmacia Biotech Brasil Ltda, SP, Brasil) por 2 horas. Retiramos o meio com timidina, as células foram lavadas com PBS, o DNA foi precipitado com 5% de ácido tricloroacético – TCA (Merck, Darmstadt, Alemanha) e ressuspenso com 300µl de 0,2N NaOH/0,3% sarcosine (Serva, Heidelberg, Alemanha). Transferimos 60µl desse homogeneizado para um frasco de cintilação com 3ml de líquido de cintilação (Amersham Pharmacia Biotech Brasil Ltda, SP, Brasil) estabilizado com ácido acético glacial (Merck, Darmstadt, Alemanha). A incorporação de ^{3}H-timidina foi avaliada em um contador de cintilação beta Beckman modelo LS6200 (Beckman Instruments, Palo Alto, EUA).

Os resultados foram comparados aos obtidos com osteoblastos de biópsias de 10 indivíduos normais pareados por idade e sexo.

3.9 Avaliação da expressão de fosfatase alcalina

Avaliamos a intensidade média de fluorescência pela citometria de fluxo, emitida por anticorpo dirigidos contra a fosfatase alcalina presente na superfície das células osteoblásticas, conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Os osteoblastos de indivíduos normais e dos pacientes (obtidos de amostras com coloração positiva para fosfatase alcalina-histoquímica) foram

incubados durante 10 minutos a 4°C com 10µl de IgG humana não imune a 10mg/ml (Sigma Aldrich, St Louis, EUA), visando bloquear receptores da porção Fc das imunoglobulinas. Para avaliação da quantidade de fosfatase alcalina, as células foram novamente incubadas por 30 minutos a 4°C com 10µg/ml do anticorpo monoclonal anti-fosfatase alcalina humana (Mab-3H414, IgG_1) (USBiological, Massachusetts, EUA) e sua auto-fluorescência foi determinada através da marcação com controle isotípico IgG_1 de camundongo (R&D Systems, Minneapolis, EUA). Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS contendo 1% de BSA (albumina de soro bovino) (Sigma, St Louis, EUA) e 0,1% de azida sódica (Sigma, St Louis, EUA) e centrifugadas por 5 minutos a 4°C e 1200rpm. Na etapa seguinte, as células foram incubadas com 10µl de GAM-FITC, anticorpo de cabra anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína a 50µg/ml (Molecular Probes, Oregon, EUA). As células foram lavadas com PBS contendo 1% de BSA e 0,1% de azida sódica por duas vezes. A análise foi realizada no citômetro FACScalibur (Becton Dickinson, San Diego, Califórnia, EUA) e com o programa CellQuest® (Becton Dickinson, San Diego, Califórnia, EUA).

Os resultados foram comparados aos obtidos com osteoblastos de biópsias de 10 indivíduos normais pareados por idade e sexo.

Princípio da citometria de fluxo: Células pré-incubadas com anticorpos ligados a um fluorocromo são absorvidas pelo fluxo de aspiração do aparelho FACScalibur. Cada célula marcada passa diante de um raio laser. Este desvia o fluorocromo em ângulos grandes ou pequenos, que

correspondem ao tamanho e à granulosidade das células. A seguir, os fluorocromos são excitados pelos raios laser a Argônio e pelo fotodiodo, o que permite quantificar a emissão de fluorescência. O sinal é amplificado e transformado em sinal elétrico, que, por sua vez, pode ser interpretado pelo programa *Cellquest*. A autofluorescência das células não marcadas serve como controle negativo do experimento.

3.10 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (MS±DP). Utilizamos o software *Prism* versão 4.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Os parâmetros estudados foram avaliados quanto ao tipo de distribuição. Utilizamos o teste de Pearson para correlações simples entre variáveis de distribuição normal e o teste não-paramétrico de Spearman para variáveis sem distribuição normal. A comparação entre os grupos experimentais se fez com teste "t" de Student não-pareado (com correção de Welch quando necessário), se apresentavam distribuição normal ou através do teste não paramétrico de Mann-Whitney, para variáveis sem distribuição normal. Os pacientes com e sem perda de tecido ósseo foram comparados aos indivíduos controles pelo teste de ANOVA, seguida do pós-teste, quando necessário. As variáveis também foram comparadas pela distribuição de eventos entre dois grupos de pacientes através do teste exato de Fisher ou teste Qui-Quadrado. Com o software *SPSS for Windows* versão 10.0.1 (Copyright® SPSS Inc. 1989-1999, Chicago, IL, USA) realizamos a regressão linear múltipla. Todas as variáveis que atingiram o

nível de significância na análise univariada com $p<0,15$, foram incluídas no modelo de regressão linear. As variáveis que não apresentavam distribuição normal foram previamente transformadas para serem analisadas. Foi considerado significativo valor de $p<0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Aspectos clínicos

Os resultados serão apresentados no grupo total de pacientes (N=27) bem como naqueles com volume ósseo normal (NVO) e reduzido (RVO). Na tabela 2 resumimos os dados clínicos.

Tabela 2 - Parâmetros clínicos no grupo geral e divididos conforme perda de tecido ósseo avaliada pelo BV/TV

Parâmetros clínicos	TOTAL	Pacientes NVO	Pacientes RVO
Número de pacientes	27	19	8
Sexo: M/F	12 (44,4%) / 15 (55,6%)	6 (31,6%) / 13 (68,4%)	6 (75%) / 2 (25%)
Idade (anos)	36,4 ± 8,9	35 ± 8,9	39,6 ± 8,4
IMC (kg/cm²)	24,6 ± 4,9	25,3 ± 5,0	22,7 ± 4,6
Causa da IRC			
GNC	11 (40,8%)	9 (47,4%)	2 (25%)
HAS	3 (11,1%)	1 (5,3%)	2 (25%)
DM	1 (3,7%)	1 (5,3%)	0
PNC/ITU	3 (11,1%)	2 (10,5%)	1 (12,5%)
RP	1 (3,7%)	1 (5,3%)	0
Indeterminada/Outras	8 (29,6%)	5 (26,3%)	3 (37,5%)
Tempo em diálise (meses)	40,2 ± 32,9	38,3 ± 34,9	44,7 ± 29,5
Tempo em transplante (meses)	31,1 ± 4,4	31,8 ± 4,8	29,2 ± 2,3
Doador: vivo/cadáver	18 (66,7%) / 9 (33,7%)	14 (73,7%) / 5 (26,3%)	4 (50%) / 4 (50%)
Pacientes com fratura referida no período da diálise	1	1	0
Pacientes com fratura referida no período do transplante	0	0	0
Dose de Prednisona acumulada (g)	7,2 ± 1,3	7,1 ± 1,4	7,4 ± 0,7

BV/TV: volume ósseo; M/F: masculino/feminino; IMC: índice de massa corpórea; GNC: glomerulonefrite crônica; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DM: diabetes mellitus; PNC/ITU: pielonefrite crônica/infecção do trato urinário; RP: rins policísticos

A média da idade dos pacientes foi de 36,4 ± 8,9 (18 a 50) anos com predomínio de indivíduos da raça branca (63%) e do sexo feminino (55,6%). A obesidade, determinada pelo IMC >25, foi observada em 42,3% dos pacientes. Nos pacientes com RVO, 75% deles eram homens e 25% eram obesos.

A principal etiologia da DRC foi a GNC em 40,8%, sendo que 36,4% deles utilizaram corticosteróide no período pré-diálise. O tempo médio em diálise no grupo geral foi de 40,2 ± 32,9 meses (variando entre 5 a 136 meses).

O tempo médio de transplante até a inclusão no estudo foi de 31,1 ± 4,4 meses (variando de 25 a 43 meses). A maioria dos pacientes recebeu o enxerto de doadores vivos (66,7%) e apenas 2 deles se submeteram a mais de um transplante. Um único paciente apresentava, como etiologia da DRC, diabete melito (DM). Porém, dois outros desenvolveram DM após o transplante renal, e ambos estavam no grupo NVO. O tempo de transplante no grupo NVO foi maior que no RVO, porém essa diferença não foi significativa (p=0,07).

Como esquema de imunossupressão, 14 pacientes (51,9%) receberam FK x PRED (prednisona) x MMF (micofenolato mofetil), 10 (37%) foram tratados com CSA x PRED x MMF, 2 (7,4%) com CSA x PRED x AZA (azatioprina) e 1 (3,7%) com FK x PRED x AZA. Entre os pacientes com RVO, 75% deles estavam em uso de FK. Apenas 1 paciente (3,7%) referiu fratura no período da diálise, nenhum paciente referiu fratura após o transplante.

4.2 Exames bioquímicos

Na tabela 3 apresentamos os resultados dos exames bioquímicos.

Tabela 3 - Parâmetros bioquímicos no grupo geral e divididos conforme perda de tecido ósseo avaliada pelo BV/TV

Parâmetros bioquímicos	TOTAL (N=27)	Pacientes NVO (N=19)	Pacientes RVO (N=8)
Creat. (mg/dl)	1,14 ± 0,25	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,3
Ca T (mg/dl)	10,0 ± 0,6	9,9 ± 0,6	10 ± 0,6
Ca i (mg/dl)	5,4 ± 0,3	5,4 ± 0,3	5,3 ± 0,3
P (mg/dl)	2,9 ± 0,7	3,0 ± 0,7	2,8 ± 0,5
PTH (pg/ml)	59,9 ± 31,4	62,4 ± 32,8	54,1 ± 28,9
Bic. (mEq/l)	23,9 ± 3,0	23,4 ± 3,0	25,3 ± 2,7
Clear. Creat (ml/min) Cockcroft-Gault	75,6 ± 22,5	77,9 ± 20	69,2 ± 28,9
Calciúria (mg/24h) (coleta de 24h)	113,6 ± 102,2	113,4 ± 107,2	114,2 ± 96,1
25 (OH) D (ng/ml)	25,4 ± 8,7	23,2 ± 7,8*	30,6 ± 9,0
1,25(OH)$_2$ D (pg/ml)	64,4 ± 28,8	63,9 ± 29,7	65,7 ± 28,7
FA (U/l)	82,4 ± 26,4	81,6 ± 28,1	84,4 ± 23,7
FA óssea (U/l)	20,0 ± 9,1	18,8 ± 6,3	22,8 ± 13,9
OPG (pmol/l)	3,39 ± 2,67	3,1 ± 2,5	3,9 ± 3,2
Deoxipiridinolina (nmol/l)	5,02 ± 0,77	5,0 ± 0,8	4,9 ± 0,8

BV/TV: volume ósseo; Creat: creatinina; Ca T: cálcio total; Ca i: cálcio iônico; P: fósforo; PTH: paratormônio; Bic: bicarbonato sérico no sangue venoso; FA: fosfatase alcalina; OPG: osteoprotegerina; DEOXI: deoxipiridinolina sérica
* 25-OH vit NVO x 25-OH vit RVO (p=0,04)

A creatinina sérica variou de 0,6 a 1,8 mg/dl. No grupo total, 6 pacientes (22,2%) apresentaram elevação do cálcio total (>10,5 mg/dl) e 11 (40,7%) do cálcio iônico (>5,3 mg/dl). A albumina sérica foi normal em todos os pacientes. Sete pacientes (26%) apresentaram hipofosfatemia (<2,5 mg/dl). Porém, nos pacientes que usaram FK, as concentrações de fósforo

sérico foram significativamente inferiores àqueles em uso de CSA (2,7 ± 0,5 x 3,3 ± 0,7) (p=0,019). Somente 1 paciente (3,7%) mantinha PTH maior que 100 pg/ml para clearance de creatinina superior a 50ml/min, limite superior de normalidade segundo NKF-DOQI. No entanto, oito pacientes (30%) apresentaram PTH maior que 65 pg/ml, considerado o limite superior do teste. Quanto ao bicarbonato sérico, 2 pacientes não realizaram a gasometria venosa; dentre os que fizeram, 9 pacientes (36%), apresentavam valores abaixo da normalidade (<23 mEq/l) e em apenas 3 (12%) o pH sérico era inferior a 7,32.

O clearance de creatinina calculado pela equação de Cockcroft-Gault variou de 54,1 a 134,7 ml/min. Quanto à calciúria de 24h, dois pacientes não realizaram adequadamente a coleta; nos demais, observamos uma variação de 9 a 401 mg/24h. Apenas 1 paciente apresentava calciúria superior a 300mg/dia.

Os níveis séricos de 25 (OH) D variaram entre 10,4 a 49 ng/ml. Segundo o NKF-DOQI, em 10 pacientes (37%) os níveis séricos eram adequados (>30 ng/ml). Porém, 14 pacientes (51,9%) apresentavam insuficiência (15-30 ng/ml) e 3 (11,1%) deficiência (<15 ng/ml). A concentração de 1,25 $(OH)_2$ D variou entre 17,7 a 134,6 pg/ml. Os pacientes NVO apresentavam níveis séricos de 25 (OH) D menor que os com RVO (23,2 ± 7,8 x 30,6 ± 9,0) (p=0,04). Porém, quando classificamos estes pacientes em insuficientes ou não em 25 (OH) D (<30 ng/ml e = 30 ng/ml, respectivamente), não obtivemos diferença significativa entre os pacientes NVO e RVO.

A FA variou de 41 a 134 U/l, sendo que 7,4% apresentavam FA elevada (>120 U/l). A FA óssea variou de 9,5 a 54,5 U/l, onde 1 paciente apresentava níveis elevados (>38 U/l). A OPG variou de 1,23 a 12,72 pmol/l e 85,2% dos pacientes apresentavam níveis elevados de OPG (>1,8 pmol/l). A DEOXI variou de 3,07 a 6,28 nmol/l, sendo que 95,4% deles apresentavam níveis elevados (>3,2 nmol/l).

4.3 Exames hormonais

Na tabela 4 demonstramos os resultados das dosagens hormonais distribuídos conforme o sexo. Não separamos pela perda óssea, pois havia poucas mulheres no grupo osteoporótico, não permitindo análise estatística.

Tabela 4 - Dosagens hormonais conforme o sexo

Hormônio	Mulheres (N=15)	Homens (N=12)
T4l (ng/dl)	1,15 ± 0,15	1,18 ± 0,11
TSH (µU/ml)	2,05 ± 0,82	2,44 ± 1,27
FSH (UI/l)	6,4 ± 3,6	5,2 ± 4,7
LH (UI/l)	5,3 ± 6,5	6,8 ± 7,0
Estrog. (pg/ml)	91,4 ± 85,6	-
Test. (ng/ml)	-	637,9 ± 367,8
Prolact. (ng/ml)	8,8 ± 3,7	7,3 ± 3,3

T4l: T4 livre; TSH: hormônio tireo-estimulante; FSH: hormônio folículo estimulante; LH: hormônio luteinizante; Estrog.: estrogênios totais; Test.: testosterona; Prolact.: prolactina.

As mulheres apresentavam níveis de T4 livre (0,9 a 0,5 ng/dl) e TSH (0,86 a 3,82 µU/ml) dentro da normalidade. Duas (13,3%) pacientes cursavam com FSH (1,5 a 13,8 UI/l) elevado (>9,3 UI/l), porém com níveis inferiores aos observados na menopausa. Nessas pacientes os níveis de

estrógeno eram normais (35,6 a 371 pg/ml) assim como em todas as mulheres do grupo. Apenas 1 paciente (6,7%) apresentou elevação da prolactina (>14,5ng/ml).

Em todos os homens, os níveis de T4 livre (1,05 a 1,39 ng/ml) foram normais. Dois pacientes (16,7%) apresentavam elevação do TSH (1,06 a 4,78 µU/ml), porém com T4 livre normal. Um paciente apresentou LH (2,2 a 27,9 UI/l) elevado (>9,2 UI/l), apesar de nível de testosterona normal (165 a 1417 ng/ml). Um paciente apresentou testosterona diminuída (<270 ng/dl), apesar de LH normal. Neste paciente foi dosada a fração livre da testosterona que estava normal. Um paciente apresentou hiperprolactinemia (>11,5 ng/ml).

4.4 Densitometria óssea

Na tabela 5 apresentamos os resultados das medidas de densidade mineral óssea.

Tabela 5 - Densidade mineral óssea no grupo geral e divididos conforme perda de tecido ósseo avaliada pelo BV/TV

DMO/Score Z	TOTAL (N=27)	Pacientes NVO (N=19)	Pacientes RVO (N=8)
Fêmur (g/cm²)	0,860 ± 0,157	0,895 ± 0,156	0,776 ± 0,134
Score Z (fêmur)	-0,8 ± 1,1	-0,5 ± 1,0	-1,5 ± 0,9*
Lombar (g/cm²)	0,961 ± 0,142	0,979 ± 0,142	0,916 ± 0,141
Score Z (lombar)	-0,9 ± 1,5	-0,6 ± 1,3	-1,8 ± 1,6

DMO: densidade mineral óssea; * score z F NVO x score z F RVO (p=0,022)

A densidade mineral óssea no fêmur do grupo geral variou de 0,616 a 1,323 g/cm^2 (Score Z -2,64 a 1,93) e na coluna lombar de 0,744 a 1,207 g/cm^2 (Score Z -3,63 a 1,56). O resultado da DMO no fêmur do grupo geral revelou 12 pacientes (44,4%) osteopênicos e 1 (3,7%) osteoporótico. O resultado da DMO na coluna lombar do grupo geral mostrou 7 pacientes (25,9%) com osteopenia e 6 (22,2%) com osteoporose. Sete pacientes (26%) apresentaram osteoporose pela densitometria, em pelo menos um dos locais avaliados.

Analisando os pacientes divididos conforme a perda ou não de tecido ósseo observamos que os pacientes NVO apresentaram maior DMO no fêmur que no grupo RVO, porém essa diferença não foi significativa (p=0,07). O score Z do fêmur foi menor nos pacientes NVO (p=0,02). Quando analisamos esse score na coluna lombar, os pacientes NVO apresentavam níveis maiores que os RVO, porém sem significância estatística (p=0,06).

4.5 Histomorfometria óssea

Os resultados obtidos da análise histomorfométrica da biópsia óssea estão descritos nas tabelas 6, 7, 8 e 9. Em um paciente não foi possível realizar a leitura dos parâmetros dinâmicos pela ausência de marcação pela tetraciclina. A média da área analisadas nas biópsias foi de 32,9 ± 8,5 mm^2.

Tabela 6 - Resultados da histomorfometria óssea (parâmetros estruturais) no grupo geral e divididos conforme perda de tecido ósseo avaliada pelo BV/TV

Parâmetros estruturais	TOTAL (N=27)	Pacientes NVO (N=19)	Pacientes RVO (N=8)	Indivíduos normais[93]
Volume ósseo (BV/TV)%	22,2 ± 6,9	25,3 ± 5,3	14,8 ± 4,0 *	24,7 ± 6,7
Espessura das traves (Tb.Th)µm	131,3 ± 26,6	140,3 ± 25,8	110 ± 12,9 **	127,8 ± 28,4
Separação das traves (Tb.Sp)µm	508 ± 204 §	433 ± 137	686 ± 236 ***	415 ±144
Número de Traves (Tb.N) /mm	1,69 ± 0,46 §§	1,83 ± 0,40	1,36 ± 0,42 #	1,93 ± 0,44

*BV/TV NVO x BV/TV RVO (p<0,0001) ; ** Tb.Th NVO x TbTh RVO (p=0,0005) ; ***Tb.Sp NVO x Tb.Sp RVO (p=0,019);
§Tb.Sp pacientes x Tb.Sp normais (p=0,038) ; §§Tb.N pacientes x Tb.N normais (p=0,030); #Tb.N NVO x Tb.N RVO (p=0,011).

Não houve diferença no volume ósseo (BV/TV) e na espessura trabecular (Tb.Th) dos pacientes do grupo geral quando comparados aos indivíduos normais. Porém, 8 pacientes (30%) apresentavam diminuição do BV/TV (RVO) e 2 (7,4%) da Tb.Th. A separação (Tb.Sp) e o número de trabéculas (Tb.N) foram, respectivamente, maiores e menores nos pacientes que nos indivíduos normais. No grupo com RVO, além de BV/TV menor (p<0,0001) encontramos maior separação entre as traves (Tb.Sp) (p=0,019), menor número (Tb.N) (p=0,011) e espessura das traves ósseas (Tb.Th) (p=0,0005).

Tabela 7 - Resultados da histomorfometria óssea (parâmetros de formação) no grupo geral e divididos conforme perda de tecido ósseo avaliada pelo BV/TV

Parâmetros de formação	TOTAL (N=27)	Pacientes NVO (N=19)	Pacientes RVO (N=8)	Indivíduos normais[93]
Volume osteóide (OV/BV)%	3,71 ± 4,90	3,6 ± 5,4	4,0 ± 3,8	2,33 ± 2,55
Espessura osteóide (O.Th)µm	8,47 ± 2,57 *	9,0 ± 2,3	7,0 ± 2,7	11,58 ± 3,62
Superfície osteóide (OS/BS)%	22,4 ± 18,2 **	20,8 ± 17,6	26,2 ± 20,1	12,5 ± 11,6
Superfície osteoblástica (Ob.S/BS)%	3,78 ± 2,03 ***	3,8 ± 2,1	3,7 ± 1,8	1,47 ± 2,84

*O.Th pacientes x O.Th normais (p<0,0001); **OS/BS pacientes x OS/BS normais (p=0,013) ;
***Ob.S/BS pacientes x Ob.S/BS normais (p<0,0001)

Quando analisamos os parâmetros de formação óssea, observamos que o volume osteóide (OV/BV) não foi diferente dos controles (p=0,08); porém, 6 pacientes (22,2%) apresentavam aumento desse parâmetro. As superfícies osteóide (OS/BS) e osteoblástica (Ob.S/BS) foram mais elevadas nos pacientes, enquanto a espessura osteóide (O.Th) foi menor. Os pacientes NVO apresentavam maior espessura osteóide (O.Th), quando comparados aos RVO, sem significância estatística (p=0,059). Nos pacientes NVO a superficie osteóide (OS/BS) foi maior que a dos indivíduos normais, porém sem significância estatística (p=0,067).

Tabela 8 - Resultados da histomorfometria óssea (parâmetros de reabsorção) no grupo geral e divididos conforme perda de tecido ósseo avaliada pelo BV/TV

Parâmetros de reabsorção	**TOTAL (N=27)**	**Pacientes NVO (N=19)**	**Pacientes RVO (N=8)**	**Indivíduos normais[93]**
Superfície reabsorvida (ES/BS)%	3,1 ± 1,7 †	3,2 ± 1,9	2,8 ± 1,3	2,1 ± 1,9
Superfície osteoclástica (Oc.S/BS)%	0,41 ± 0,34 ††	0,42 ± 0,40	0,37 ± 0,18	0,04 ± 0,11

†ES/BS pacientes x ES/BS normais (p=0,018); ††Oc.S/BS pacts x Oc.S/BS normais (p<0,0001)

A análise dos parâmetros de reabsorção revelou que as superfícies de reabsorção (ES/BS) e osteoclástica (Oc.S/BS) também foram significativamente mais elevadas nos pacientes do grupo geral quando comparadas aos controles. Trinta e três por cento dos pacientes cursavam com aumento da ES/BS. Não houve diferença entre os parâmetros de reabsorção nos grupos NVO e RVO.

Tabela 9 - Resultados da histomorfometria óssea (parâmetros dinâmicos) no grupo geral e divididos conforme perda de tecido ósseo avaliada pelo BV/TV

Parâmetros Dinâmicos	TOTAL (N=26)	Pacientes NVO (N=18)	Pacientes RVO (N=8)	Indivíduos normais[94]
Superfície mineralizante (MS/BS) %	5,71 ± 3,46 *	5,1 ± 2,9	7,1 ± 4,3	15 ± 6,5
Taxa de aposição mineral (MAR) µm/dia	0,96 ± 0,42 **	0,99 ± 0,47	0,89 ± 0,29	0,65 ± 0,12
Taxa de formação óssea (BFR/BS) µm³/µm²/dia	0,05 ± 0,03 ***	0,04 ± 0,03	0,05 ± 0,03	0,10 ± 0,05
Taxa de formação corrigida (Aj.Ar) µm/dia	0,37 ± 0,28 †	0,37 ± 0,27	0,38 ± 0,32	0,50 ± 0,20
Intervalo de tempo para mineralização (Mlt) dias	59,9 ± 89,3 ††	60,1 ± 85,2	59,7 ± 104,0	22,5 ± 2,5

*MS/BS pacientes x MS/BS normais (p<0,0001) ; **MAR pacientes x MAR normais (p=0,011); ***BFR pacientes x BFR normais (p<0,0001);
†Aj.AR pacientes x Aj.Ar normais (p0,046) ; ††Mlt pacientes x Mlt normais (p=0,046).

Nos parâmetros dinâmicos, os pacientes do grupo geral apresentavam aumento na taxa de aposição mineral (MAR) e diminuição da superfície mineralizante (MS/BS). A taxa de formação óssea (BFR) estava diminuída em 60% dos pacientes. O intervalo de tempo para mineralização (Mlt) estava aumentado no grupo geral em relação aos normais, em 46% dos pacientes. Os pacientes do grupo NVO apresentavam maior intervalo de tempo para mineralização que os do grupo RVO, sem significância estatística (p=0,07). Todos os pacientes com redução dos níveis de 25(OH) D, apresentavam retardo na mineralização óssea.

4.6 Proliferação e expressão de fosfatase alcalina das células osteoblásticas

As células em cultura apresentaram coloração positiva para fosfatase alcalina e o vermelho de alizarina demonstrou que houve precipitação de cálcio dessas células. A coloração pelo “Oil Red” foi negativa nas amostras de cultura. Assim, em todas as culturas de células que confirmaram a predominância de células osteoblásticas realizamos os experimentos de expressão de fosfatase alcalina, pela citometria de fluxo, e a taxa de proliferação celular, representadas na tabela 10.

Tabela 10 - Expressão de fosfatase alcalina e proliferação das células osteoblásticas no grupo geral e divididos conforme perda de tecido ósseo avaliada pelo BV/TV

	TOTAL (N=25)	**Pacientes NVO (N=17)**	**Pacientes RVO (N=8)**	**Indivíduos normais**
Expressão de FA (intensidade média de fluorescência)	29,1 ± 22,4	28,8 ± 23,4	29,7 ± 21,8	57,8 ± 40,5
Taxa de proliferação celular (cpm)	154,6 ± 111 *	109,7 ± 63,5	178,3 ± 179,5	76,7 ± 32,6

* Pacientes x normais (p<0,0001)

A expressão da fosfatase alcalina foi numericamente inferior no grupo geral do que nos normais, embora não se tenha obtido significância estatística (p=0,059). A taxa de proliferação dos osteoblastos foi significativamente maior nas células osteoblásticas obtidas de pacientes. Os osteoblastos dos pacientes em uso de FK apresentaram maior taxa de proliferação em relação àqueles em uso de CSA (181,2 ± 130,3 cpm x 120,8

± 67,4 cpm) (p=0,0007). Não houve diferença estatística entre os grupos NVO e BVO quanto à expressão de fosfatase alcalina nas células osteoblásticas e à proliferação celular.

Para a análise das correlações, consideramos os pacientes do grupo geral, visto que o número de pacientes no grupo RVO era reduzido. A tabela 11 descreve as correlações entre o PTH e os parâmetros clínicos e bioquímicos.

Tabela 11 - Correlações entre o PTH e parâmetros clínicos e bioquímicos

Variáveis	r	p
Fósforo	-0,48	0,011
Tempo em diálise	0,41	0,031

O índice de massa corpórea (IMC) apresentou correlação positiva com a DMO lombar (r=0,67, p=0,0002) e o score z (r=0,65, p=0,0003); bem como a DMO fêmur (r=0,66, p=0,0002) e o score z (r=0,69, p<0,0001).

As correlações da DMO e parâmetros clínicos e bioquímicos foram observados na coluna lombar e fêmur (tabelas 12 e 13).

Tabela 12 - Correlações da DMO lombar com parâmetros clínicos e bioquímicos

Variáveis	r	p
IMC	0,67	0,0002
Fosfatase alcalina	-0,42	0,027
Fosfatase alcalina óssea	-0,39	0,041
Deoxipiridinolina	-0,43	0,045

IMC: índice de massa corpórea

Tabela 13 - Correlações da DMO do fêmur parâmetros clínicos e bioquímicos

Variáveis	r	p
IMC	0,66	0,0002
Clear. Creat. Cockcroft-Gault	0,46	0,017

IMC – índice de massa corpórea

Separamos os parâmetros histomorfométricos em estruturais (BV/TV, Tb.Sp, Tb.N), de formação óssea (OV/BV, O.Th, OS/BS, Ob.S/BS, MS/BS, MAR, BFR/BS, Mlt) e de reabsorção óssea (ES/BS, Oc.S/BS). Correlacionamos cada grupo com os parâmetros clínicos, bioquímicos e densitométricos.

A tabela 14 resume as correlações entre os parâmetros estruturais e os parâmetros clínicos, bioquímicos e densitométricos.

Tabela 14 - Correlações entre BV/TV, Tb.Sp e Tb.N com parâmetros clínicos, bioquímicos e densitométricos

	BV/TV	**Tb.Sp**	**Tb.N**
IMC	r = 0,55 p = 0,003	r = -0,47 p = 0,015	r = 0,49 p = 0,010
DMO lombar	r = 0,49 p = 0,008	r = -0,47 p = 0,013	r = 0,45 p = 0,017
DMO fêmur	r = 0,58 p = 0,001	r = -0,61 p = 0,0007	r = 0,65 p = 0,0002

IMC: índice de massa corpórea; DMO: densidade mineral óssea.

Nas tabelas 15 e 16 descrevemos as correlações entre os parâmetros de formação e reabsorção óssea, com os parâmetros clínicos e bioquímicos.

Tabela 15 - Correlações entre OV/BV, O.Th, OS/BS, Ob.S/BS, MS/BS, BFR/BS e Mlt com parâmetros clínicos, bioquímicos e densitométricos

	OV/BV	**O.Th**	**OS/BS**	**Ob.S/BS**
Tempo em diálise	r = 0,59 p = 0,001	-	r = 0,55 p = 0,002	r = 0,59 p = 0,001
Fósforo	-	-	r = -0,40 p = 0,037	-
PTH	r =0,74 p<0,0001	r = 0,55 p = 0,002	r = 0,68 p<0,0001	-
Deoxipiridinolina	r = -0,49 p = 0,018	-	-	-

PTH: paratormônio

Tabela 16 - Correlações entre ES/BS e Oc.S/BS com parâmetros clínicos, bioquímicos e densitométricos

	ES/BS	**Oc.S/BS**
IMC	r = -0,46 p = 0,018	r = -0,41 p = 0,035
Tempo transplante	-	r = -0,39 p = 0,042
Dose acumulada pred	-	r = -0.41 p = 0,034
Fósforo	r = 0,37 p = 0,050	-
Deoxipiridinolina	r = 0,47 p = 0,025	-
DMO lombar	r = -0,41 p = 0,031	-

IMC: índice de massa corpórea; DMO: densidade mineral óssea; pred: prednisona.

A proliferação das células osteoblásticas correlacionou-se positivamente com os níveis séricos de 25 (OH) D (r=0,44, p=0,029) e negativamente com a OPG (r= -0,41, p=0,044). Na tabela 17 demonstramos as correlações entre a proliferação de osteoblastos e os parâmetros estruturais da biópsia óssea.

Tabela 17 - Correlações entre BV/TV, Tb.Sp e Tb.N com a proliferação de células osteoblásticas

	BV/TV	**Tb.Sp**	**Tb.N**
Proliferação de células osteoblásticas	r = -0,43 p = 0,038	r = 0,56 p = 0,004	r = -0,57 p = 0,004

A seguir, apresentamos as regressões lineares múltiplas entre os parâmetros bioquímicos (Tabela 18), densitométricos (Tabela 19) e histomorfométricos (Tabela 20).

Tabela 18 - Regressões lineares múltiplas nos parâmetros bioquímicos

Variáveis dependentes	**Variáveis independentes**	**Coeficiente**	**Valor de p**
P	PTH	-0,374	0,042
	Clear. Creat. Cockroft-Gault	-0,424	0,023
FA	Tempo em diálise	0,404	0,024
	1,25 $(OH)_2$ D	0,361	0,042

P: fósforo; PTH: paratormônio; FA: fosfatase alcalina.

Tabela 19 - Regressões lineares múltiplas na densitometria óssea

Variáveis dependentes	**Variáveis independentes**	**Coeficiente**	**Valor de p**
DMO lombar	IMC	0,538	0,002
	FA	-0,417	0,008
	PTH	0,326	0,044
DMO fêmur	IMC	0,653	0,0001

DMO: densidade mineral óssea; PTH: paratormônio; IMC: índice de massa corporea; FA: fosfatase alcalina

Tabela 20 - Regressões lineares múltiplas nos parâmetros histomorfométricos

Variáveis dependentes	Variáveis independentes	Coeficiente	Valor de p
BV/TV	DMO fêmur	0,581	0,002
Tb.Sp	DMO Fêmur	-0,615	0,001
Tb.N	DMO fêmur	0,656	0,0001
OV/BV	PTH	0,590	0,001
	Tempo em diálise	0,396	0,012
O.Th	PTH	0,576	0,006
OS/BS	PTH	0,715	0,0001
ES/BS	IMC	-0,487	0,025
MS/BS	DMO fêmur	-0,410	0,038
BFR/BS	P	0,464	0,034
Mlt	Clear. Creat. Cockroft-Gault	0,414	0,050

DMO: densidade mineral óssea; PTH: paratormônio; IMC: índice de massa corporea; BV/TV: volume ósseo; Tb.Sp: separação das traves; Tb.N: número de traves; OV/BV: volume osteóide; O.Th: espessura osteóide; OS/BS: superfície osteóide; MS/BS: superfície mineralizante; BFR/BS: taxa de formação óssea; Mlt: intervalo de tempo para mineralização, ES/BS: superfície de reabsorção

5 DISCUSSÃO

O transplante renal bem sucedido melhora a qualidade de vida dos pacientes com DRC e corrige os distúrbios secundários à uremia como anemia, hipertensão arterial, desnutrição, acidose metabólica e as alterações do metabolismo mineral. Entretanto, a persistência do hiperparatiroidismo, com conseqüente hipercalcemia e hipofosfatemia, e a toxicidade óssea das drogas imunossupressoras contribuem para o desenvolvimento da doença óssea pós-transplante.

Essa doença tem sido muito estudada nos últimos anos[16,17], pois aumenta as morbidades dessa população, como desenvolvimento de osteoporose e fraturas. Os estudos que avaliaram a doença óssea no pós-transplante apresentam resultados heterogêneos, uma vez que foram realizados em tempos distintos em relação ao transplante, em populações não selecionadas, com diferentes níveis de função renal e recebendo diferentes esquemas imunosupressores[15,18,20,22,23].

Estudamos 27 pacientes transplantados renais tardios, com boa função do enxerto, recebendo o mesmo esquema imunossupressor desde o início do transplante e doses reduzidas de corticosteróides. Nossos pacientes eram jovens, sem insuficiência gonadal e tireodeana. Excluímos também pacientes que receberam tratamento prévio para osteoporose e paratiroidectomizados. Apesar da seleção restritiva, nenhum paciente

apresentava tecido ósseo normal. Encontramos em 30% diminuição do volume ósseo, 60% cursavam com diminuição da formação óssea, em 33% a superfície de reabsorção estava elevada e em 46% observamos defeito na mineralização. Assim, esses pacientes apresentavam um predomínio de doença mista.

Vários estudos[18,22,23,25] demonstraram resultados semelhantes, mesmo sem adotar os critérios rígidos de seleção que empregamos, revelando que a doença óssea pós transplante tardio se deve a outros fatores ou predominantemente à ação das drogas imunosupressoras.

Encontramos elevada prevalência de hipercalcemia e hipofosfatemia em nossos pacientes (40% e 26%, respectivamente), quando comparamos com outros estudos[36,37,95]. Esses dados sugerem a presença de hiperparatiroidismo. Apesar dos níveis de PTH estarem dentro da faixa de normalidade para a função renal, 30% dos pacientes cursavam com PTH acima do limite superior (65 pg/ml). Vale lembrar que a hipercalcemia poderia também ser decorrente da reabsorção de calcificações extra-ósseas, da hipofosfatemia, e da mobilização do cálcio ósseo pela acidose pois, surpreendentemente, 12% dos pacientes eram acidóticos apesar da adequada função renal. Imunosupressores como a CSA e o FK favorecem o aumento da reabsorção óssea, podendo contribuir para hipercalcemia.

O hiperparatiroidismo contribuiu para a hipofosfatemia, uma vez que encontramos correlações entre o P e o PTH. Não podemos afastar disfunção tubular como causa da hipofosfatemia, pois não avaliamos a fosfatúria dos pacientes. Nos pacientes que receberam FK, os níveis de fósforo eram

inferiores àqueles em uso de CSA; porém, não detectamos diferenças quanto à dose acumulada de prednisona, nível do PTH e 1,25 $(OH)_2$ D. A hipofosfatemia não foi secundária à deficiência de 1,25 $(OH)_2$ D, pois a concentração desse metabólito era normal em todos os pacientes.

Um achado surpreendente foi a elevada porcentagem de pacientes com insuficiência de 25 (OH) D (63%), refletindo talvez ingestão alimentar, exposição solar inadequadas[96], ou aumento do catabolismo desse metabólito pelos imunossupressores. Essa deficiência pode ter contribuído para a manutenção do hiperparatiroidismo e consequentemente hipofosfatemia. Sabemos que a diminuição da 25 (OH) D é um importante fator de risco para a elevação do PTH, especialmente após o TxR[33,96] onde a reposição desse metabólito nem sempre corrige os níveis de PTH[96]. Recentemente, Ritter e cols[97] demonstraram que a 25 (OH) D suprime a síntese de PTH em células paratireodeanas por uma ação direta no receptor de vitamina D.

Os marcadores de formação óssea FA e FAO encontravam-se dentro da normalidade. Por outro lado, os níveis séricos de DEOXI, marcador de reabsorção, estavam elevados em 95% dos pacientes. O estudo de Coco e cols. também encontrou resultados semelhantes[98]. Os marcadores bioquímicos têm sido muito empregados no diagnóstico e seguimento das doenças ósseas metabólicas, principalmente por não serem invasivos. A literatura é controversa quanto à correlação entre esses marcadores e a densitometria e a histologia na doença óssea após o TxR[21,99,100]. Enquanto Parker e cols[21] não demonstraram correlação entre DEOXI e a reabsorção

óssea, Cayco e cols[100] evidenciaram que a piridinolina urinária foi um preditor da massa óssea, avaliada pela densitometria. Em nosso estudo, tanto os marcadores de formação quanto os de reabsorção apresentavam correlação negativa com a DMO lombar, sugerindo que a remodelação influenciou a massa óssea. Porém, somente a FA foi determinante da DMO lombar. Os níveis séricos da OPG (osteoprotegerina) estavam elevados em 85% dos pacientes; no entanto, não encontramos correlação entre a OPG, marcadores de formação e reabsorção, bem como com os parâmetros analisados na biópsia óssea. Nossos resultados diferem de Malyszko e cols[101] que encontraram níveis normais OPG em relação a indivíduos normais e demonstraram ainda correlação positiva da OPG sérica com o tempo em diálise, os níveis de 25 (OH) D e marcadores de reabsorção em transplantados renais. Sabemos que o sistema OPG, RANK e RANK-L atua na remodelação óssea, no sistema imune e vascular, participando inclusive da calcificação vascular[102,103]. Nos nossos pacientes, a OPG não refletiu a remodelação óssea. Como não avaliamos a presença de calcificações vasculares, não podemos afastar que essa elevação se relacione a calcificação vascular como observado em outros estudos [104,105].

A função gonadal dos pacientes era normal. Apesar de alguns estudos demonstrarem correlação dos níveis de estradiol com a DMO lombar e parâmetros de formação na histomorfometria[84,85], não encontramos correlação dos parâmetros hormonais com nenhum parâmetro bioquímico, densitométrico ou histomorfométrico. Provavelmente, isto ocorreu porque estávamos avaliando apenas pacientes sem disfunção gonadal.

Vários estudos avaliaram a perda de massa óssea no primeiro ano do TxR através da densitometria. Alguns descrevem perdas ósseas que variaram de 4 a 10%[37,46], dependendo do local avaliado (coluna lombar ou colo do fêmur), sendo essas perdas correlacionadas com o hiperparatiroidismo e a dose acumulada de corticosteróides[46,100]. No TxR tardio, os estudos que empregaram densitometria revelaram resultados heterogêneos. A maioria deles demonstrou diminuição da DMO em qualquer período após o transplante, quando comparados à população normal[23,34,48]. No entanto, a porcentagem de pacientes com osteoporose variou de 30 a 56%[35,49,81,100]. Em nosso estudo, os pacientes apresentavam uma média de 31 meses de transplante (25 a 43 meses) e 26% deles foram diagnosticados como osteoporóticos em pelo menos um dos locais analisados.

A velocidade da perda de massa óssea após o primeiro ano do transplante é menor, tanto na coluna lombar como no colo do fêmur[34,46,48,81]. Após o segundo ano, a DMO lombar pode, manter-se estável[34,36,81,106], diminuir[49,62,81] ou raramente aumentar[21,23,34,81]. Já no colo do fêmur, a perda óssea parece ser contínua e constante[34,36,38,106]. Também nesses estudos os principais determinantes da perda óssea foram o hiperparatiroidismo[34,35,63,107] e a dose acumulada de prednisona[34,36,48,49,62,81]. Alguns trabalhos relatam que a deficiência de vitamina D[36,81,107] e a alta remodelação óssea secundária a CSA[61,62,83,100] também favorecem a perda óssea.

Nesse estudo, o IMC foi o principal determinante da DMO lombar e do fêmur. Essa associação foi descrita em pacientes urêmicos, osteoporóticos e

também em transplantados renais[108]. Acredita-se que a obesidade favoreça a elevação da leptina sérica que por sua vez, atuaria como um inibidor da reabsorção óssea[109].

Observamos que quanto mais preservada a função renal, melhor a DMO do fêmur, demonstrando que a insuficiência renal, e conseqüente alteração da remodelação óssea é um fator que leva a perda de massa óssea nesses pacientes[98]. Um resultado interessante foi encontrar o PTH como determinante independente da DMO lombar lembrando que nos nossos pacientes os níveis de PTH eram inferiores a 100 pg/ml. Nossos resultados contrastam com os obtidos por Casez e cols., que demonstraram perda óssea nos primeiros 18 meses do transplante renal em pacientes com níveis de PTH inferiores a 110 pg/ml no momento do transplante[33]. Sabe-se que dependendo da concentração do PTH, esse hormônio tem ação anabólica no tecido ósseo; porém esse fato ainda não foi demonstrado em pacientes transplantados renais, efeito já descrito em pacientes com DRC leve a moderada[110].

Quando analisamos os parâmetros estruturais do tecido ósseo, verificamos que nossos pacientes apresentavam alteração da microarquitetura, ou seja, maior separação entre as traves (Tb.Sp) e diminuição do número de traves (Tb.N), apesar do BV/TV estar dentro dos limites de normalidade. Esses achados refletem provavelmente um efeito dos corticosteróides, pois essa droga pode aumentar a profundidade da lacuna de reabsorção perfurando as traves ósseas e separando as mesmas.

Somente 50% dos pacientes com diminuição do volume trabecular diagnosticado na histomorfometria apresentavam densidade mineral óssea diminuída na densitometria. Esse achado demonstra a baixa sensibilidade da densitometria no diagnóstico de osteoporose[111], confirmando que a biopsia óssea, apesar de invasiva, ainda é o melhor método de se avaliar o tecido ósseo. Encontramos uma menor prevalência de perda de volume ósseo em relação a outros trabalhos (35-58%)[15,18,20,22,23,25], provavelmente pelo critério de seleção dos pacientes ser restritivo. Na literatura, o tempo de transplante[18,22,25], a dose acumulada de corticosteróides[22], sexo masculino[25] e marcadores de reabsorção[20] foram determinantes do volume ósseo. Em nosso estudo, o IMC, DMO lombar e do fêmur apresentaram correlação positiva com o BV/TV e Tb.N; porém, somente a DMO do fêmur foi capaz de predizer o volume ósseo e a microarquitetura de nossos pacientes. Esses resultados foram semelhantes aos de Carlini e cols[23].

Analisando os parâmetros de formação óssea, verificamos um aumento da superfície osteóide (OS/BS) e osteoblástica (Ob.S/BS). Alguns estudos encontraram resultados semelhantes[15,22,23] enquanto outros observaram diminuição do número de osteoblastos[18,22,25]. Essa diferença se deve provavelmente à dose acumulada de prednisona[15], menor nos nossos pacientes. Nossos resultados revelaram uma correlação positiva do tempo de diálise e do PTH com OV/BV, OS/BS, O.Th e Ob.S/BS, o que sugere novamente, um efeito trófico do PTH no tecido ósseo.

Analisando os parâmetros de reabsorção encontramos aumento dos mesmos em relação aos controles, resultado encontrado por vários

autores[15,18,22,23,25]. Esses estudos demonstraram uma correlação direta da DMO lombar[23], sexo masculino[18] e idade[25] com a superfície de reabsorção (ES/BS). Em nossos pacientes, além do aumento da reabsorção óssea, observamos uma correlação negativa do IMC e DMO lombar com a ES/BS, corroborando o fato que pacientes obesos apresentam menor reabsorção e consequentemente maior DMO lombar[109]. No entanto, somente o IMC foi o preditor independente da ES/BS. Na literatura, a superfície osteoclástica (Oc.S/BS) correlacionou-se diretamente com marcadores de formação e reabsorção[20] e idade[18]; e indiretamente com o tempo em diálise[25]. Alguns estudos sugerem que a Oc.S/BS tende a diminuir com o tempo em transplante revelando que, com o passar do tempo, a diminuição da reabsorção óssea favoreça a manutenção da massa óssea[34,104].

A maioria dos estudos demonstram diminuição da taxa de formação[18,22,23,25,26] (BFR/BS) e defeito de mineralização óssea[15,18,22,23,25,26,112]. Poucos trabalhos mostraram BFR normal[20,21]. Nossos resultados são semelhantes, uma vez que 60% dos pacientes apresentavam diminuição da formação óssea. Apesar da diminuição da superfície mineralizante (MS/BS), os osteoblastos apresentavam adequada taxa de aposição mineral (MAR), sugerindo um mecanismo compensatório. Provavelmente essa compensação não é suficiente, pois ocorre diminuição da formação óssea e retardo da mineralização, presente em 46% dos pacientes. Alguns estudos atribuem esse retardo a reduzidos níveis de calcitriol[20,25] e outros à ação dos corticosteroides[22].

Em nossos pacientes, o fósforo foi um determinante direto da taxa de formação óssea sugerindo que a hipofosfatemia contribuiu para o retardo da mineralização. Observamos também que a função renal foi um determinante direto do intervalo de tempo de mineralização (Mlt). Outros estudos revelaram que o tempo de transplante[25], sexo masculino[18,25] e a deficiciência do calcitriol[20,22,25,112] estariam relacionados ao retardo da mineralização. Apesar da elevada prevalência de pacientes com deficiência de 25 (OH) D (63%), não encontramos correlação com os índices que avaliaram a mineralização óssea.

Vários estudos compararam os índices histomorfométricos de formação óssea com as características dos osteoblastos "*in vitro*"[113,114,115,116,117]. Esse é o primeiro estudo que realizou essa comparação em pacientes transplantados renais.

As células obtidas da biopsia óssea apresentavam fenótipo de osteoblastos uma vez que expressavam fosfatase alcalina, analisada por histoquímica enzimática e por citometria de fluxo, além de promover precipitação de cálcio quando estimuladas com ácido ascórbico e β-glicerofosfato.

No nosso estudo a expressão da fosfatase alcalina nos osteoblastos dos pacientes estava reduzida quando comparadas aos controles. Essa redução ficou próxima da significância. Apesar de não encontrarmos correlações entre a expressão da fosfatase alcalina, e os parâmetros histomorfométricos, pode-se supor que essa alteração tenha contribuído para a diminuição da formação e mineralização óssea observada nos

pacientes. A diminuição dessa expressão também poderia ser conseqüente à ação dos inibidores da calcineurina, CSA e FK, utilizados em todos os pacientes[70].

A taxa de proliferação celular dos pacientes foi superior aos controles, sugerindo que essas células fossem menos diferenciadas[113]. As correlações encontradas entre a proliferação e os parâmetros estruturais demonstraram que, mesmo proliferando mais intensamente, essas células não trabalhavam adequadamente, uma vez que expressavam menos fosfatase alcalina o que poderia diminuir a formação óssea levando às alterações estruturais.

As células obtidas de pacientes tratados com ciclosporina apresentaram menor proliferação que a de pacientes tratados com FK. Sabe-se que o FK é capaz de induzir diferenciação osteoblástica[66,67,68] a partir de células mesenquimais o que poderia contribuir para o aumento da proliferação celular.

Em resumo, nosso estudo demonstrou que a doença óssea está presente mesmo em pacientes com função adequada do enxerto, sem disfunção gonadal, sem hiperparatiroidismo severo, e uso de doses reduzidas de corticosteróides.

O principal achado histológico do tecido ósseo desses pacientes foi a diminuição da formação óssea. Esse achado esteve associado a hipofosfatemia e diminuição dos níveis de 25 (OH) D. Portanto esses fatores devem ser corrigidos mesmo nessa população que se julgava de baixo risco para a doença óssea pós transplante.

6 ANEXOS

Anexo A – Questionário aplicado aos pacientes

PROTOCOLO -- Perda óssea após o TX Renal : CSA x TAC

DADOS CLÍNICOS **Data consulta:**

Nome: **RG:**
Idade : **Data nasc:**
Fone:
Sexo: ÿ **Fem** ÿ **Masc**
Raça: ÿ **Branco** ÿ **Negro** ÿ **Pardo** ÿ **Amarelo**

ANTECEDENTES DA DIÁLISE

Causa da IRC: ÿ **HAS** ÿ **DM** ÿ **GN** ÿ **RP** ÿ **PNC/ITU** ÿ **NF** ÿ **Outros/desconhecida**
DM: ÿ **sim** ÿ **não**
Tempo total em diálise (meses): **Tipo:** ÿ **HD** ÿ **DP**
Fratura: ÿ **sim** ÿ **não**
Nº:
Onde:
Antecedentes de ODR: ÿ **HP** ÿ **DA** ÿ **Al** ÿ **não sabe**
Uso de: ÿ **desferal** ÿ **vit. D** ÿ **Ca** ÿ **bisfosfonatos** ÿ **TRH** ÿ **calcitonina**
ÿ **fluoretos**
PTX: ÿ **sim** ÿ **não**
Quando (mm/aa):

ANTECEDENTES DO TRANSPLANTE

Nº de TXs: ÿ **1** ÿ **2** ÿ **3 ou mais**
Data do Tx (mm/aa):
Doador: ÿ **vivo relac.** ÿ **vivo não-relac.** ÿ **cadáver**
Esquema imunossupressor: ÿ **Pred** ÿ **AZA** ÿ **CSA** ÿ **FK** ÿ **Rapa** ÿ **MMF**
Queixas clínicas (relacionada à doença óssea):
Usa: ÿ **anticoagulante** ÿ **anticonvulsivante**
Rejeição: ÿ **sim** ÿ **não** **nº:**
Fratura: ÿ **sim** ÿ **não**
Nº:
Onde:
Quando (meses após TX):
Menstruação: ÿ **ausente** ÿ **presente**
Tratamento para osteoporose: ÿ **bisfosfonatos** ÿ **Vit.D** ÿ **Ca** ÿ **TRH**
ÿ **calcitonina** ÿ **fluoretos**

Peso: **IMC:**
Alt:

Anexo B – Valores de normalidade dos parâmetros laboratoriais e métodos de dosagem

Parâmetros Laboratoriais	**Feminino** (valores referência)	**Masculino** (valores referência)	**Método de dosagem**
Creatinina	0,6-1,4 mg/dl	0,6-1,4 mg/dl	Colorimétrico automatizado
Cálcio total	8,5-10,5 mg/dl	8,5-10,5 mg/dl	Colorimétrico automatizado
Cálcio iônico	4,64-5,28 mg/dl	4,64-5,28 mg/dl	Eletrodo íon sensível
Fósforo	2,3-4,6 mg/dl	2,3-4,6 mg/dl	Colorimétrico automatizado
Albumina	3,5-5,0 g/dl	3,5-5,0 g/dl	Enzimático colorimétrico automatizado
Bicarbonato sérico	23-28 mE/l	25-30 mE/l	Membrana íon seletivo
Paratormônio	11-62 pg/ml	11-62 pg/ml	Imunoradiométrico
Clearance creatinina	90-130ml/min	90-130ml/min	Colorimétrico automatizado
Calciúria de 24h	100-300 mg /24h	100-300 mg /24h	Colorimétrico automatizado
Fosfatase alcalina	32-104 U/l	45-122 U/l	Cinético automatizado
Fosfatase alcalina óssea	8-38 U/l	8-38 U/l	Separação eletroforética
T 4 livre	0,6-1,54 ng/dl	0,6-1,54 ng/dl	Fluorimétrico
TSH	0,5-4,2 µU/ml	0,5-4,2 µU/ml	Imunofluorimétrico ultra-sensível
FSH	1,7-9,3 UI/l	1,0-12 UI/l	Imunofluorimétrico
LH	0,95-9,3 UI/l	1,4-9,2 UI/l	Imunofluorimétrico
Estrógeno	35-184 pg/ml		Fuorimétrico
Testosterona		271-965 ng/dl	Fluoroimunoensaio
Prolactina	2,5-14,5 ng/ml	2,3-11,5 ng/ml	Imunofluorimétrico
OPG	1,8pmol/l	1,8pmol/l	ELISA
Deoxipiridinolina	3,43 nmol/l	3,25 nmol/l	ELISA
25-OH vitamina D	8,9 – 46,7 ng/ml	8,9 – 46,7 ng/ml	Radioimunoensaio
1,25-OH vitamina D	15,9 – 55,6 pg/ml	15,9 – 55,6 pg/ml	Radioimunoensaio

Anexo C – Parâmetros da histomorfometria óssea, com valores de normalidade para cada sexo

Parâmetros Estáticos/Estruturais	Valores de referência	
	Feminino	**Masculino**
Volume ósseo (BV/TV)%	23.5 ± 7.5	25.8 ± 5.8
Volume osteóide (OV/BV)%	1.6 ± 2.2	2.9 ± 2.6
Espessura osteóide(O.Th) µm	11.1 ± 3.6	12 ± 3.6
Superfície osteóide (OS/BS)%	8.9 ± 8.8	15.8 ± 12.8
Osteoblasto (Ob.S/BS)%	1.5 ± 3.7	1.5 ± 1.6
Superfície reabsorvida (ES/BS)%	2.2 ± 2.4	1.9 ± 1.2
Osteoclasto (Oc.S/BS)%	0.03 ± 0.07	0.05 ± 0.17
Espessura das traves (Tb.Th)µm	123.7 ± 26.7	131.4 ± 29.8
Separação das traves (Tb.Sp) µm	443,8 ± 177.2	389.5 ± 102.8
Número de Traves (Tb.N)mm	1.8 ± 0.5	2.0 ± 0.4
Fibrose (FB.V)%	0	0

Parâmetros Dinâmicos	Valores de referência	
	Feminino	**Masculino**
Superfície mineralizante (MS.BS)%	12.0 ± 5.0	18.0 ± 8.0
Taxa de aposição mineral (MAR) µm/dia	0.65 ± 0.12	
Taxa de formação óssea (BFR/BS) $\mu m^3/\mu m^2$/dia	0.07 ± 0.03	0.13 ± 0.07
Taxa de formação corrigida (Aj.AR) µm/dia	0.50 ± 0.20	
Intervalo de tempo para mineralização (MLT) dias	23.7 ± 2.7	21.3 ± 2.3

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Romão Junior JE. Epidemiologia da doença renal crônica no Brasil-2004. www.sbn.org.br/Censo/epidemiologia2004.pps.

2. www.abto.org.br/profissionais/profissionais.asp.

3. Moe S, Drüeke T, Cunningham J,Goodman W, Martin K, Olgaard K, Ott S, Sprague S, Lameire N, Eknoyan G. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from kidney disease: Improving Global Outcome (KDIGO). *Kidney Int* 2006;69:1945-53.

4. Assesment of fracture risk and its application to screening for post menopausal osteoporosis. Report of a WHO study group. *WHO technical report series* 1994;843:1-129.

5. Cunningham J. Posttransplantation bone disease. Transplantation 2005;79:629-34.

6. Ramsey-Goldman R, Dunn JE, Dunlop DD, Stuart FP, Abecassis MM, Kaufman DB, Langman CG, Salinger MH e Sprague SM. Incresed risk of fracture in patients receiving solid organ transplants. *J Bone Miner Res* 1999;14:456-63.

7. Vantour LM, Melton LJ, Clarke BL, Achenbach SJ, Oberg AL e McCarthy JT. Long-term fracture risk following renal transplantation: a population-based study. *Osteoporos Int* 2004;15:160-7.

8. O'Shaughnessy EA, Dahl DC, Smith CL e Kasiske BL. Risk factors for fracture in kidney transplantation. *Transplantation* 2002;74:362-6.

9. Patel S, Kwan JTC, McCloskey E, McGee G, Thomas G, Johnson D, Wills R, Ogunremi L e Barron J. Prevalence and causes of low bone density and fractues in kidney transplant patients. *J Bone Miner Res* 2001;16:1863-70.

10. Braga Junior JWR, Neves RMS, Pinheiro MM, Frisoli Junior A, Castro HM, Szejnfeld VL, Carvalho AB. Prevalence of low trauma fracture in long-term kidney transplant patients with preserved renal function. *Braz J Med Biol Res* 2006;39:137-47.

11. Durieux S, Mercadal L, Orcel P, Dao H, Rioux C, Bernard M, Rozenberg S, Barrou B, Bourgeois P, Deray G e Bagnis CI. Bone mineral density and fracture prevalence in long-term kidney graft recipients. *Transplantation* 2002;74:496-500.

12. Mc Farlane SI, Muniyappa R, Shin JJ, Bahtiyar G e Sowers JR. Osteoporosis and cardiovascular disease: brittle bones and boned arteries, is there a link? *Endocrine* 2004;23:1-10.

13. Magnus JH e Broussard DL. Relationship between bone mineral density and myocardial infarction in US adults. *Osteoporos Int* 2005;16:2053-62.

14. Tanko LB, Christiansen C, Cox DA, Geiger MJ, McNabb MA e Cummings SR. Relationship between osteoporosis and cardiovascular disease in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2005;20:1912-20.

15. Rolla D, Ballanti P, Marsano L, Bianchi G, Messa P, Paoletti E e Cannella G. Bone disease in long-term renal transplant recipients with severe osteopenia: A Cross-sectional study. *Transplantation* 2006;81:915-21.

16. Abdallah KA, Jorgetti V, Pereira RC, Dos Reis LM, Pereira LM, Correa PHS, Borelli A, Ianhez LA, Moyses RMA e David-Neto E. Improvement of dynamic bone disease after renal transplantation. *Braz J Med Biol Res* 2006;38:31-41.

17. Cruz EAS, Lugon JR, Jorgetti V, Draibe SA e Carvalho AB. Histologic evolution of bone disease 6 months after successful kidney transplantation. *Am J Kidney Dis* 2004;44:747-56.

18. Cueto-Manzano AM, Konel S, Crowley V, France MW, Freemont AJ, Adams JE, Mawer B, Gokal R e Hutchison AJ. Bone histopathology and densitometry comparison between cyclosporine A monotherapy and prednisolone plus azathioprine dual immunosuppression in renal transplant patients. *Transplantation* 2003;75:2053-8.

19. Rojas E, Carlini RG, Clesca P, Arminio A, Suniaga O, Elguezabal K, Weisinger JR, Hruska KA e Bellorin-Font E. The pathogenesis of osteodystrophy after renal transplantation as detected by early alterations in bone remodeling. *Kidney Int* 2003:63:1915-23.

20. Montalban C, Francisco ALM, Marinoso ML, Zubimendi JA, Unzueta MG, Amado JA e Arias M. Bone disease in long-term adult kidney transplant patients with normal renal function. *Kidney Int* 2003;63,Suppl 85:S129-32.

21. Parker CR, Blackwell PJ, Freemont A e Hosking DJ. Biochemical measurements in the prediction of histologic subtype of renal transplant bone disease in women. *Am J Kidney Dis* 2002;40:385-96.

22. Monier-Faugere MC, Mawad H, QI Q, Friedler RM e Malluche HH. High prevalence of low bone turnover and occurrence of osteomalacia after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:1093-99.

23. Carlini RG, Rojas E, Weisinger JR, Lopez M, Martinis R, Arminio A e Bellorin-Font E. Bone disease in patients with log-term renal transplantation and normal renal function. *Am J Kidney Dis* 2000;36:160-6.

24. Martins L, Queiros A, Ferreira AC, Henriques AM, Sarmento MC, Pereira MC e Guimarães S. Renal osteodistrophy: histologic evaluation after renal transplantation. *Transplantation Proc* 2000;32:2599-601.

25. Cueto-Manzano AM, Konel S, Hutchison AJ, Crowley V, France MW, Freemont AJ, Adams JE, Mawer B e Gokal R. Bone loss in long-term renal transplantation: Hisopathology and densitometry analysis. *Kidney Int* 1999;55:2021-9.

26. Velasquez-Forero F, Mondragon A, Herrero B e Pena JC. Adynamic bone lesion in renal transplant recipients with normal renal function. *Nephrol Dial Transplant* 19996;11 Suppl 3:58-64.

27. Torres A, Lorenzo V e Salido E. Calcium metabolism and skeletal problems after transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:551-8.

28. Reinhardt W, Bartelworth H, Jockenhovel F, Schmidt-Gayk H, Witzke O, Wagner K, Heemann UW, Reinwein D, Philipp T e Mann K. Sequential changes of biochemical bone parameters after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:436-42.

29. Boom H, Mallat MJK, Fitjer JW, Paul LC, Bruijn JA e Es LA. Calcium levels as a risk factor for delayed graft function. *Transplantation* 2004;77:868-73.

30. Schwarz A, Mengel M, Gwinner W, Radermacher J, Hiss M, Kreipe H e Haller H. Risk factors for chronic allograft nephropathy after renal transplantation: A protocol biopsy study. *Kidney Int* 2005;67:341-8.

31. Brewster UC e Perazella MA. Calcific Uremic arteriolopathy in a transplanted kidney. *Am J Med Sci* 2005;329:102-3.

32. Lewin E. Involution of the parathyroid glands after renal transplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003;12:363-71.

33. Lomonte C, Antonelli M, Vernaglione L, Cazzato F, Casucci F, Chimienti D, Bruno A, Cocola S, Verrelli EA e Basile C. Are low plasma levels of 25-OH vitamin D a major risk factor for hyperparathyroidism independent of calcitriol in renal transplant patients? *J Nephrol* 2005;18:96-101.

34. Grotz WH, Mundinger FA, Rasenack J, Spidel L, Olschewski M, Exner VM e Schollmeyer PJ. Bone loss after kidney transplantation: a longitudinal study in 115 graft recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2005;10:2096-100.

35. Roe SD, Porter CJ, Godber IM, Hosking DJ e Cassidy MJ. Reduced bone mineral density in male renal transplant recipients: evidence for persisting hyperparathyroidism. *Osteoporos Int* 2005;16:142-8.

36. Heaf J, Tvedegaard E, Kanstrup IL e Fogh-Andersen N. Hyperparathyroidism and long-term bone loss after renal transplantation. *Clin transplant* 2003;17:268-74.

37. Casez JP, Lippuner K, Horber FF, Montandon A e Jaeger P. Changes in bone mineral density over 18 months follwing kidney transplantation: the respective roles of prednisone and parathyroid hormone. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:1318-26.

38. Akaberi S, Lindergard B, Simonsen O e Nyberg. Impact of parathyroid hormone on bone density in long-term renal transplant patients with good graft function. *Transplantation* 2006;82:749-52.

39. Kilgo MS, Pirsch JD, Warner TF e Starling JR. Tertiary hyperparathyroidism after renal transplantation: surgical strategy. *Surgery* 1998;124:677-83.

40. Christensen MS, Nielsen HE e Torring S. Hypercalcemia and parathyroid function after renal transplantation. *Acta Med Scand* 1977;201:35-9.

41. Evenepoel P, Claes K, Kuypers D, Maes B e Vanrenterghem Y. Impact of parathyroidectomy on renal graft function, blood pressure and serum lipids in kidney transplant recipients: a single center study. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:1714-20.

42. Eknoyan G, Levin A e Levin NW. Bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2003;42 Suppl 3:1-201.

43. Shaker JL e Lukert BP. Osteoporosis associated with excess glucocorticoids. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2005;34:341-56.

44. Canalis E. Mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:454-7.

45. Hofbauer LC, Gori F, Riggs L, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC e Khosla S. Stimulation os osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 1999;140:4382-9.

46. Julian BA, Laskow DA, Dubovsky J, Dubovsky EV, Curtis JJ e Quarles D. Rapid loss of vertebral mineral density after renal transplantation. *N Engl J Med* 1991;325:544-50.

47. Horber FF, Casez JP, Steiger U, Czerniak A, Montandon A e Jaeger P. Changes in bone mass early after kidney transplantation. *J Bone Miner Res* 1994;9:1-9.

48. Grotz WH, Mundinger FA, Gugel B, Exner VM, Kirste G e Schollmeyer PJ. Bone Mineral density after kidney transplantation. A cross-sectional study in 190 graft recipients up to 20 years after transplantation. *Transplantation* 1995;59:982-6.

49. Pichette V, Bonnardeaux A, prudhomme l, Gagne M, Cardinal J e Ouimet D. Long-term bone loss in kidney transplant recipients: a cross-sectional and longitudinal study. *Am J Kidney Dis* 1995;28:105-14.

50. Opelz G, Dohler B, Laux G, Collaborative Transplant Study. Long-term prospective study of steroid withdrawal in kidney and heart transplant recipients. *Am J Transplant* 2005;5:720-8.

51. Cvetkovic M, Mann GN, Romero DF, Liang XG, Ma Y, Jee WSS e Epstein S. The deleterius effects of long-term cyclosporine A, cyclosporine G, and FK506 on bone mineral metabolism in vivo. *Transplantation* 1994;57:1231-7.

52. Goodman GR, Dissanayake IR, Sodam BR, Gorodestky E, Lu J, Ma YF, Jef WSS e Epstein S. Immunosupressant use without bone loss - Implications for bone loss after transplantation. *J Bone Miner Res* 200116:72-8.

53. Goodman GR, Dissanayake IR, Bowman AR, Pun S, Ma Y, Jee WS, Bryer HP e Epstein S. Transforming growth factor-beta administration modifies cyclosporine A- induced bone loss. *Bone* 200128:583-8.

54. Fornoni A, Cornacchia F, Howard GA, Ross BA, Striker GE e Striker LJ. Cyclosporin A affects extracellular matrix synthesis and degradation by mouse MC3T3-E1 osteoblast in vitro. *Nephrol Dial Transplant* 200116:500-5.

55. McCauley LK, Rosol TJ e Capen CC. Effects of Cyclosporin A on rat osteoblast (ROS 17/2.8 cells) in vitro. *Calcif Tissue Int* 1992;51:291-7.

56. Ogawa T, Tokuda M, Tomizawa K, Matsui H, Itano T, Konishi R, Nagahata S e Hatase O. Osteoblastic differentiation is enhanced by rapamycin in rat osteoblast-like osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;249:226-30.

57. Hofbauer LC, Shui C, Riggs BL, Dunstan CR, Spelsberg TC, O'Brien T e Khosla S. Effects os immunosuppresants on receptor activator of NF-kappaB ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery amooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:334-9.

58. Wimalawansa SM, Shankar VS, Simmins DJ, Wimalawansa SJ. The mechanism of bone resorption by cyclosporin: Involvement of the NO-cGMP pathway. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2000;1:141-3.

59. Rifas L, Avioli LV. A novel T cell cytokine stimulates interleukin-6 in human osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 1999;14:1096-103.

60. Williams JP, Mckenna MA, Thames III AM e McDonald J. Effects of cyclosporine on osteoclast activity: inhibition of calcineurin activity with minimal effects on bone resorption and acid transport activity. *J Bone Miner Res* 2003;18:451-7.

61. Westeel FP, Mazouz H, Ezaitouni F, Hottelart C, Ivan C, Fardellone P, Brazier M, Esper IE, Petit J, Achard JM, Pruna A e Fournier A. Cyclosporine bone remodeling effect prevents steroid osteopenia after kidney transplantation. *Kidney Int* 2000;58:1788-96.

62. McIntyre HD, Menzies B, Rigby R, Perry-Keene DA, Hawlwy CM e Hardie IR. Long-term bone loss after renal transplantation: comparison of immunosuppressive regimens. *Clin Transplant* 1995;9:20-4.

63. Kirino S, Fukunaga J, Ikegami, Tsuboi H, Kimata M, Nakata N, Nakano M, Ueno T, Mizukawa N e Sugahara T. Regulation of bone metabolism in immunosuppressant (FK506)-treated rats. *J Bone Miner Metab* 2004;22:554-60.

64. Inoue T, Kawamura I, Matsuo M, Aketa M, Mabuchi M, Seki J e Goto T. Lesser reduction in bone mineral density by the immunosuppressant, FK506, compared with cyclosporine in rats. *Transplantation* 2000;70:774-9.

65. Abdelhadi M, Ericzon BG, Hultenby K, Sjoden G, Reinholt FP e Nordenstrom J. Structural skeletal impairment induced by immunosuppressive therapy in rats: cyclosporin vs tacrolimus. *Transplant Int* 2002;15:180-7.

66. Yoshikawa T, Nakajima H, Yamada E, Akahane M, Dohi Y, Ohgushi H, Tamai S e Ichijima K . In vivo osteogenic capability of cultured allogeneic bne in porous hydroxyapatite: immunosuppressive and osteogenic potential of FK 506 in vivo. *J Bone Miner Res* 2000;15:1147-57.

67. Voggenreiter G, Assenmacher S, Kreuzfelder E, Wolf M, Kim MR, Nast-Kolb D e Schade FU. Immunosuppression with FK506 increases bone induction in deminaralized isogeneic and xenogeneic bone matrix in the rat. *J Bone Miner Res* 2000;15:1825-34.

68. Akahane M, Ohgushi H, Yoshikawa T, Sempuku T, Tamai S, Tabata S e Dohi Y. Osteogenic phenotype expression of allogeneic rat marrow cells in porous hydroxyapatite ceramics. *J Bone Miner Res* 1999;14:561-8.

69. Tang L, Ebara S, Kawasaki S, Wakabayashi S, Nikaido T e Takaoka K. FK506 enhanced osteoblastic differentiation in mesenchymal cells. *Cell Biol Int* 2002;26:75-84.

70. Sun L, Blair HC, Peng Y, Zaidi N, Adebanjo OA, Wu XB, Wu XY, Iqbal J, Epstein S, Abe E, Moonga BS e Zaidi M. Calcineurin regulates bone formation by the osteoblast. *PNAS* 2005;102:17130-5.

71. Koga T, Matsui Y, Asagiri M, Kodama T, de Crombrugghe B, Nakashima K e Takayanagi H. NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat Med* 2005;11:880-5.

72. Varanasi SS e Datta HK. Characerisation of cytosolic FK506 binding protein 12 and its role in modulating expression of Cbfa1 and osterix in ROS 17/2.8 cells. *Bone* 2005;36:243-53.

73. Hirotani H, Tuohy NA, Woo JT, Stern PH e Clipstone NA. The calcineurin/NFAT signaling pathway regulates osteoclatogenesis in RAW264.7 cells. *J Bio Chem* 2004;279:13984-92.

74. Igarashi K, Hirotani H, Woo JT e Stern PH. Cyclosporine A and FK 506 induced osteoclast apoptosis in mouse bone marrow cell cultures. *Bone* 2004;35:47-56.

75. Sun L, Moonga BS, Lu M, Zaidi N, Iqbal J, Blair HC, Epstein S, Abe E, Troena BR, Huang CL e Zaidi M. Molecular cloning, expression, and function os osteoclastic calcineuri A alpha. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284:F575-83.

76. Goffin E, Devogelaer JP, Depresseux G, Squifflet JP, Pirson Y, van Yperselede de Strihou C. Evaluation of bone mineral density after renal transplantation under a tacrolimus-based immunosuppression: a pilot study. *Clin Nephrol* 2003;59:190-5.

77. Monegal A, Navasa M, Guanabens N, Peris P, Pons F, Martinez de Osaba MJ, Rimola A, Rodes J e Munoz-Gomez J. Bone mass and mineral metabolism in liver transplant patients treated with FK506 or cyclosporin A. *Calcif Tissue Int* 2001;68:83-6.

78. Goffin E, Devogelaer JP, Lalaoui A, Depresseux G, De Naeyer P, Squifflet JP, Pirson Y and Ypersele de Strihou C. Tacrolimus and low-dose steroid immunosuppression preserves bone mass after renal transplantation. *Transplant Int* 200215:73-80.

79. Ott R, Bussenius-Kammerer M, Koch CA, Yedibela S, Kissler H, Hohenberger W e Muller V. Does conversion of immunosuppressive monotherapy from cyclosporine A to tacrolimus improve bone mineral density in long-term stable liver transplant recipients? *Transplantation Proc* 2003;35:3032-4.

80. Stempfle HU, Werener C, Siebert U, Assum T, Wehr U, Rambeck WA, Meiser B, Theisen K e Gartner R. The role of tacrolimus-based immunosuppression on bone mineral density and bone turnover after cardiac transplantation: a prospective, longitudinal, randomized, double-blid trial with calcitriol. *Transplantation* 2002;73:547-52.

81. Marcen R, Caballero C, Pascual J, Teruel JL, Tenorio M, Ocana J, Villafruela JJ, Burgos FJ, Fernandez AM, Muriel a e Ortuno J. Lumbar bone mineral density in renal transplant patients on neoral and tacrolimus: a four-year prospective study. *Transplantation* 2006;81:826-31.

82. Romero DF, buchinsky FJ, Rucinsky B, Cvetkovic M, Bryer HP, Liang XG, Ma YF, Jee WS e Epstein S. Rapamycin: a bone sparing immunosuppressant? *J Bone Miner Res* 1995;10:760-8.

83. Campistol JM, Holt DW, Epstein S, Gioud-Paquet M, Rutalt K, Burke JT, The Sirolimus European Renal Transplant Study Group. Bone metabolism in renal transplant patients treated with cyclosporine or sirolimus. *Transplant Int* 2005;18:1028-35.

84. Cueto-Manzano AM, Freemont AJ, Adams JE, Mawer B, Gokal R e Hutchison. Association of sex hormone status with the bone loss of renal transplant patients. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:1245-50.

85. Brandenburg VM, Ketteler M, Heussen N, Politt D, Frank RD, Westenfeld R, Ittel TH e Floege J. Lumbar bone mineral density in very long-term renal transplant recipients: impact of circulating sex hormones. *Osteoporos Int* 2005;16:1611-20.

86. Ghanekar H, Welch BJ, Moe OW, Sakhaee K. Post-renal transplantation hypophosphatemia: a review and novel insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006;184:97-104.

87. Green J, Debby H, Lederer E, Levi M, Zajicek HK e Bick T. Evidence for PTh-independent humoral mechanism in post-transplant hypophosphatemia and phosphaturia. *Kidney Int* 2001;60:1182-96.

88. Querings K, Girndt M, Geisel J, Georg T, Tilgen W e Reichrath J. 25-OH vitamin D deficiency in renal transplant recipients. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:526-9.

89. de Sevaux RG, Hoitsma AJ, van Hoof HJ, Corstens FJ e Wetzels JF. Abnormal vitamin D metabolism and loss of bone mass after renal transplantation. *Nephron Clin Pract* 2003;93:C21-8.

90. Falklewicz K, Bidzinska B, Demissie M, Boratynska m, Zmonarski SC, Tworowska M, Klinger M, Milewicz A e Patrzalek D. Influence of vitamin D receptor gene polymorphism on secondary hyperparathyroidism and bone density after kidney transplantation. *Transplant Proc* 2005;37:1023-5.

91. Torres A, Machado M, Concepcion MT, Martin N, Lorenzo V, Hernandez D, Rodriguez AP, Rodriguez A, de Bonis E, Gonzalez-Posada JM, Hernandez A e Salido E.. Influence of vitamin D receptor genotype on bone mass changes after renal transplantation. *Kidney Int* 1996;50:1726-33.

92. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis J, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry nomenclature: Standardization of nomenclature, symbols and Units. *J Bone Mineral Res* 1987;2:595-610.

93. dos Reis LM, Batalha JR, Munoz DR, Borelli A, Corrrea PHS, Carvalho AB e Jorgetti V. Brazilian normal static bone histomorphometry: effects of age, gender and race. *J Bone Mineral Metab*, in press, 2007.

94. Melsen F. e Mosekilde L. Tetracycline double-labeling of iliac trabecular bone in 41 normal adults. *Calcif Tiss Res* 1978,26:99-102.

95. Evenepoel P, Claes K, Kuypers D, Maes B, Bammens B e Vanrenterghem Y. Natural History of parathyroid function and calcium metabolism after kidney transplantation: a single-center study. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:1281-7.

96. Boudville NC e Hodsman AB. Renal function and 25-hydroxyvitamina D concentrations predict parathyroid hormone levels in renal transplant patients. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:2621-4.

97. Ritter CS, Armbrecht HJ, Statopolsky E, Brown AJ. 25-Hydroxyvitamina D(3) suppresses PTH synthesis and secretion by bovine parathyroid cells. *Kidney Int* 2006;70:654-9.

98. Coco M, Glicklich D, Faugere MC, Burris L, Bognar I, Durkin P, Tellis V, Greenstein S, Schechner R, Figueroa K, McDonough P, Wang G e Malluche H. Prevention of bone loss in renal transplant recipients: A prospective, Randomized, Trial of Intravenous Pamidroante. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:2669-76.

99. Malyszko J, Wolczynski S, Malyszko JS, Konstatynowicz J, Kaczmarski M e Mysliwiec M. Correlations of new markers of bone formations and resorption in kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 2003;35:1351-4.

100. Cayco AV, Wysolmerski J, Simpson C, Mitnick MA, Gundberg C, Kliger A, Lorber M, Silver D, Basadonna G, Friedman A, Isogna K, Cruz D e Bia M. *Transplantation* 2000;70:1722-8.

101. Malyszko J, Malyszko JS, Wolczynski S e Myliwiec M. Osteoprotegerin and its correlations with new markers of bone formation and bone resorption in kidney transplant rcipients. *Transplant Proc* 2003: 35:2227-9.

102. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular fuction. *Arterioscler Thromb Vasc Bio* 2002;22: 549-53.

103. Pritzker LB, Scatena M e Giachelli CM. The role of osteoprotegerin and tumor necrosis factor-related apoptosis-indicing ligand in human microvascular endothelial cell survival. *Mol Biol Cell* 2004: 15:2834-41.

104. Mazaferro S, Pasquali M, Pugliese F, Barresi G, Carbone I, Francone M, Sardella D e Taggi F. Serum levels of calcification inhibition proteins and coronary artery calcium score: comparison between transplantation and dialysis. *Am J Nephrol* 2007;27:75-83.

105. Hjelmesaeth J, Ueland T, Flyvbjerg A, Bollerslev J, Leivestad T, Jenssen T, Hansen TK, Thiel S, Sagedal S,Roislien J e Hartmann A. Early posttransplantation serum osteoprotegerin levels predict long-term (8years) patient survival and cardiovascular death in renal transplant patients. *J Am Soc Nephrol* 2006;17: 1746-54.

106. Bradenburg VM, Ketteler M, Fassbender WJ, Heussen N, Freuding T, Floege J e Ittel T. Development of lumbar bone mineral density in the late course after kidney transplantation. *Am J Kidney Dis* 2002;40: 1066-74.

107. Heaf J, Tvedegaard E, Kanstrup IL, Fogh-Andersen N. Bone loss after transplantation: role of hyperparathyroidism, acidosis, cyclosporine and systemic disease. *Clin Transplantation* 2000;14: 457-63.

108. Sezer S, Ozdemir FN, Ibis A, Sayin B e Haberal M. Risk factors for osteoporosis in young renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2005;37:3116-8.

109. Coen G, Ballanti P, Fischer MS, Balducci A, Calabria S, Colamarco L, Zazzo G, Lifrieri F, Manni M, Sardella D, Nofroni I e Bonucci E. Serum leptin in dialysis renal osteodystrophy. *Am J Kidney Dis* 2003;42:1036-42.

110. Miller PD, Schwartz EN, Chen P, Misurski DA, Krege JH. Teriparatide in postmenopausal women with osteoporosis and mild or moderate renal impairment. *Osteoporos Int* 2007;18:59-68.

111. Duboeuf F, Uebelhart D, Boivin G, Edouard C, Delmas PD, Meunier PJ. Comparison between radial bone mineral density measured by single photon absorptiometry and histomorphometric bone mass parameters measured on iliac crest biopsies. *Clin Rheumatol* 1990;9:367-73.

112. Briner VA , Thiel G, Monier-Faugere MC, Bognar B, Landmann J, Kamber V, Malluche HH. Prevention of cancellous bone loss but persistence of renal bone disease despite normal 1,25 vitamin D levels two years after kidney transplantation. *Transplantation* 1995; 59: 1393-400.

113. Marie PJ, Lomri A, Sabbagh A e Basle M. Culture and behavior of osteoblastic cells isolated from normal trabecular bone surfaces. *In Vitro Cell Dev Biol* 1989;25: 373-80.

114. Marie PJ, Lomri A, de Vernejoul MC, Morieux C, Graulet AM, Gueris J, e Llach F. Relationships between histomorphometric features of bone formation and bone cell characteristics in vitro in renal osteodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69:1166-73.

115. Iwasaki-Ishizuka Y, Yamato H, Nii-Kono T, Kurokawa K e Fukagawa M. Down-regulation of parathyroid hormone receptor gene expression and osteoblastic dysfunction associated with skeletal resistance to parathyroid hormone in rat model of renal failure with low turnover bone. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:1904-11.

116. Sanchez MC, Bajo MA, Selgas R, Mate A, Sanchez-Cabezudo MJ, Lopez-Barea F, Esbrit P, Martinez ME. Cultures of human osteoblastic cells from dialysis patients: influence of bone turnover rate on in vitro selection of interleukin-6 and osteoblastic cells markers. *Am J Kidney Dis* 2001;37: 30-7.

117. Dias CB, dos Reis LM, Caparbo VF, Graciolli FG, Moyses RM, Barros RT, Jorgetti V e Woronik V. Decreased in vitro osteoblast proliferation and low turnover bone disease in nonuremic proteinuric patients. *Kidney Int* 2007;71:562-8.