IGOR DENIZARDE BACELAR MARQUES

**Efeito do ácido zoledrônico na perda óssea de
pacientes submetidos a transplante renal:
um estudo prospectivo e randomizado**

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

Programa de Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Elias David Neto

Coorientadora: Profa. Dra. Rosa Maria Affonso
Moysés

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Marques, Igor Denizarde Bacelar

Efeito do ácido zoledrônico na perda óssea de pacientes submetidos a transplante renal : um estudo prospectivo e randomizado / Igor Denizarde Bacelar Marques. -- São Paulo, 2016.

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

Orientador: Elias David Neto

Coorientadora: Rosa Maria Affonso Moyses.

Descritores: 1.Hiperparatireoidismo 2.Insuficiência renal crônica 3.Hormônio paratireóide 4.Densidade óssea 5.Difosfonatos 6.Transplante de rim 7.Ensaio clínico

USP/FM/DBD-108/16

Dedicatória

À minha amada esposa,

Larissa Almeida Moreira Marques,

pelo amor e carinho em todos estes anos, e pela paciência e compreensão na
execução desta tese; e

à minha família, sem a qual não teria tido a base para desenvolver minha
formação acadêmica.

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Elias David Neto, que aumentou em mim a curiosidade científica, abriu as portas para que eu desenvolvesse meu conhecimento e meu trabalho, por sua motivação e apoio para a realização desta tese.

À minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Rosa Maria Affonso Moysés, pelo grande estímulo e ensinamentos, e pela orientação imprescindível em todas as etapas desta tese.

Em especial à Prof^a. Dr^a. Vanda Jorgetti, que me recebeu no grupo de distúrbios do metabolismo mineral e ósseo da Disciplina de Nefrologia do HCFMUSP, juntamente com a Prof^a. Dr^a. Rosa Maria Affonso Moysés, pelo apoio, paciência, incentivo, valiosos ensinamentos e pelo exemplo de simplicidade e grandeza.

Aos amigos e colegas da Disciplina de Nefrologia do HCFMUSP, por acreditarem no trabalho e fornecerem suporte à sua realização, em especial à Maria Júlia Correia Lima Nepomuceno, pela grande ajuda em várias etapas deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Rosa Maria Rodrigues Pereira, pela ajuda com a realização e análise dos exames de densitometria e microtomografia ósseas.

Ao Programa de Pós-Graduação da Disciplina de Nefrologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na pessoa do Dr. Rui Toledo Barros e do Prof. Dr. Emanuel de Almeida Burdmann, pelo incentivo e suporte acadêmico.

À Disciplina de Nefrologia, representada por seus titulares Prof. Dr. Roberto Zatz e Prof^a. Dra. Irene Noronha, pela oportunidade de realizar a residência médica em Nefrologia em um centro de excelência.

À equipe do LIM 16, pela grande ajuda em etapas fundamentais desta tese, em especial à Dr^a. Melani Custódio, Dr^a. Fabiana G. Graciolli e à Dr^a. Luciene dos Reis.

Aos pacientes que colaboraram para o estudo, sem os quais não teríamos alcançado nosso objetivo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro de auxílio à pesquisa.

A todos que, apesar de não citados, opinaram e me incentivaram ao longo de todo o caminho percorrido até a elaboração desta tese.

Normalização adotada

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. 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. 3a edição. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de abreviaturas	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Resumo	
Abstract	
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo primário.....	12
2.2 Objetivos secundários	12
3 PACIENTES E MÉTODOS	13
3.1 Critérios de inclusão	14
3.2 Critérios de exclusão.....	14
3.3 Protocolo do estudo	15
3.4 Exames bioquímicos	17
3.5 Biópsia óssea.....	17
3.6 Avaliação da densidade mineral óssea.....	19
3.7 Tomografia computadorizada periférica quantitativa de alta resolução	19
3.8 Tamanho da amostra.....	20
3.9 Tempo de recrutamento	20
3.10 Análise estatística	20
4 RESULTADOS	21
4.1 Características clínicas e laboratoriais basais do grupo inteiro	24
4.2 Densidade mineral óssea.....	27
4.3 Correlações entre HR-pQCT e características clínicas e parâmetros laboratoriais	28
4.4 Biópsias basais e suas correlações com HR-pQCT e DXA.....	31
4.5 Características clínicas e laboratoriais basais e após 1 ano de tratamento	35
4.6 Histomorfometria: ácido zoledrônico versus placebo	42
5 DISCUSSÃO	46
6 CONCLUSÕES	55
7 ANEXOS	58
8 REFERÊNCIAS.....	63
9 APÊNDICES	74

Listas

ABREVIATURAS

BFR/BS	Taxa de formação óssea (do inglês, <i>bone formation rate</i>)
BV/TV	Volume trabecular (do inglês, <i>bone volume / tissue volume</i>)
Ct.Po	Porosidade cortical (do inglês, <i>cortical porosity</i>)
Ct.Th	Espessura cortical (do inglês, <i>cortical width</i>)
CTX	Telopeptídeo C-terminal
D100	Densidade mineral total
Dcomp	Densidade cortical
DMO	Densidade Mineral Óssea
DOA	Doença Óssea Adinâmica
DP	Desvio-Padrão
DRC	Doença Renal Crônica
Dtrab	Densidade trabecular
DXA	Absortometria de raio-x de dupla energia (do inglês, <i>dual energy x-ray absorptiometry</i>)
ES/BS	Superfície de reabsorção (do inglês, <i>eroded surface</i>)
FA	Fosfatase Alcalina
FAo	Fração óssea da fosfatase alcalina
Fb.V/TV	Fibrose medular (do inglês, <i>fibrous volume</i>)
FSH	Hormônio folículo-estimulante
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HR-pQCT	Tomografia computadorizada periférica quantitativa de alta resolução (do inglês, <i>high-resolution peripheral quantitative computed tomography</i>)

IMC	Índice de Massa Corpórea
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
LH	Hormônio luteinizante
LIM	Laboratório de Investigação Médica
MAR	Taxa de aposição mineral (do inglês, <i>mineral apposition rate</i>)
Mlt	Tempo de mineralização (do inglês, <i>mineralization lag time</i>)
MS/BS	Superfície mineralizante (do inglês, <i>mineralized surface</i>)
O.Th	Espessura osteoide (do inglês, <i>osteoid thickness</i>)
Ob.S/BS	Superfície osteoblástica (do inglês, <i>osteoblast surface</i>)
Oc.S/BS	Superfície osteoclástica (do inglês, <i>osteoclast surface</i>)
OS/BS	Superfície osteoide (do inglês, <i>osteoid surface</i>)
OV/BV	Volume osteoide (do inglês, <i>osteoid volume</i>)
P1NP	Propeptídeo aminoterminal do procolágeno tipo 1
PTH	Paratormônio
Tb.N	Número trabecular (do inglês, <i>trabecular number</i>)
Tb.Sp	Separação trabecular (do inglês, <i>trabecular separation</i>)
Tb.Th	Espessura trabecular (do inglês, <i>trabecular thickness</i>)
TRAP5b	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
TSH	Homônio estimulante da tireóide

TABELAS

Tabela 1 -	Características clínicas e parâmetros laboratoriais dos pacientes (n=31).....	25
Tabela 2 -	Hormônios sexuais. Resultados basais	26
Tabela 3 -	Densidade mineral óssea. Resultados basais do grupo inteiro (n = 31).....	27
Tabela 4 -	Características clínicas e parâmetros laboratoriais basais (n=30).....	35
Tabela 5 -	Parâmetros laboratoriais, DXA e HR-pQCT do grupo inteiro (n = 30).....	36
Tabela 6 -	Parâmetros laboratoriais, DXA e HR-pQCT dos pacientes ao final de 12 meses.....	37
Tabela 7 -	DXA, HR-pQCT e biópsia óssea dos pacientes no início do estudo e ao final de 12 meses.....	40
Tabela 8 -	Histomorformetria. Parâmetros estáticos e dinâmicos do grupo inteiro (n=30)	43

FIGURAS

Figura 1 -	Tomografia computadorizada periférica quantitativa de alta resolução	6
Figura 2 -	Protocolo do estudo	16
Figura 3 -	Relação entre o sistema TMV e os tipos clássicos de osteodistrofia renal.....	18
Figura 4 -	Randomização dos pacientes. H, homem; M, mulher	23
Figura 5 -	Correlações entre HR-pQCT e características clínicas e parâmetros laboratoriais. 5a. Dcomp do rádio vs. idade. 5b. Dcomp do rádio vs. tempo em diálise. 5c. Dcomp do rádio vs. PTH. 5d. Dcomp do rádio vs. FA.	29
Figura 5 (continuação) -	Correlações entre HR-pQCT e características clínicas e parâmetros laboratoriais. 5e. Dtrab do rádio vs. idade. 5f. Dtrab do rádio vs. FSH em mulheres. 5g. Dtrab do rádio vs. testosterona em homens.	30
Figura 6 -	Biópsias basais	32
Figura 7 -	Correlações entre biópsia óssea, HR-pQCT e DXA. 7a. 2D BV/TV vs. DXA da coluna lombar. 7b. 2D BV/TV vs. DXA fêmur total. 7c. 2D BV/TV vs. HR-pQCT BV/TV do rádio. 7d. 2D Md.V/TV vs. DXA da coluna lombar.....	33
Figura 7 (continuação) -	Correlações entre biópsia óssea, HR-pQCT e DXA. 7e. 2D Md.V/TV vs. DXA do fêmur total. 7f. 2D Md.V/TV vs. HR-pQCT BV/TV do rádio. 7g. Correlação entre a porosidade cortical e Dcomp do rádio. 7h. Correlação entre a porosidade cortical e Dcomp do rádio.....	34
Figura 8 -	Bioquímica: ácido zoledrônico versus placebo	38
Figura 9 -	Marcadores de formação e reabsorção: ácido zoledrônico versus placebo.....	38
Figura 10 -	Densidade mineral óssea (g/cm ²): ácido zoledrônico versus placebo	41
Figura 11 -	HR-pQCT do rádio: ácido zoledrônico versus placebo	41
Figura 12 -	Biópsia pré e pós-tratamento em um paciente do grupo ácido zoledrônico.....	43

Figura 13 -	Histomorfometria: ácido zoledrônico <i>versus</i> placebo. Parâmetros estruturais.....	44
Figura 14 -	Histomorfometria: ácido zoledrônico <i>versus</i> placebo. Parâmetros de formação e reabsorção óssea.....	45
Figura 15 -	Histomorfometria: ácido zoledrônico <i>versus</i> placebo	45

Resumo

Marques IDB. *Efeito do ácido zoledrônico na perda óssea de pacientes submetidos a transplante renal: um estudo prospectivo e randomizado* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Distúrbios do metabolismo mineral e da remodelação óssea são complicações comuns que afetam pacientes após o transplante renal e representam importantes causas de morbidade e mortalidade. Estas alterações esqueléticas são resultantes de uma complexa interposição de fatores, incluindo uma resolução incompleta das alterações minerais e ósseas devido ao funcionamento deficiente do enxerto, a ação de drogas imunossupressoras e a presença de fatores de risco para o desenvolvimento de osteoporose que acometem a população geral. Bisfosfonatos podem prevenir ou atenuar a perda óssea após o transplante renal. Receptores de transplante renal com doador vivo foram randomizados para tratamento com dose única de 5 mg de ácido zoledrônico após o transplante associado à suplementação de colecalciferol ou com apenas colecalciferol. Realizamos densitometrias (DXA), microtomografias (HR-pQCT) e biópsias ósseas à época do transplante e ao final dos 12 meses do estudo, e avaliamos a correlação entre estas técnicas invasivas e não invasivas. Houve uma boa concordância entre a HR-pQCT e a biópsia óssea transilíaca com relação ao compartimento cortical. No osso trabecular, embora estatisticamente significantes e maiores do que as descritas na população geral, as correlações entre os dois métodos foram apenas de moderada intensidade. Os pacientes não perderam tanta massa óssea quanto era esperado. Houve um aumento da densidade mineral óssea (DMO) medida por DXA no fêmur total em ambos os grupos, mas na coluna lombar apenas nos pacientes que receberam ácido zoledrônico. Por HR-pQCT do rádio, observou-se que esta diferença de DMO em favor do grupo ácido zoledrônico foi evidenciada na região cortical. A análise histomorfométrica das biópsias ósseas demonstrou uma diminuição na porosidade e aumento da espessura cortical, mais evidente nos pacientes que receberam ácido zoledrônico. Os pacientes do grupo ácido zoledrônico apresentaram supressão dos parâmetros de formação e reabsorção óssea; entretanto, não houve um risco aumentado de desenvolvimento de doença óssea adinâmica (DOA) ou defeito de mineralização, quando comparados com o grupo controle. Os benefícios observados sobre osso cortical, aliados a um perfil de segurança favorável e à possibilidade de prevenir fraturas, fazem com que ainda haja espaço para o uso dos bisfosfonatos após o transplante renal. Mais estudos são necessários até que o uso profilático de bisfosfonatos seja recomendado para prevenir a perda óssea em receptores de transplante de rim.

Descritores: hiperparatireoidismo; insuficiência renal crônica; hormônio paratireóide; densidade mineral óssea; bisfosfonatos; transplante de rim; ensaio clínico.

Abstract

Marques IDB. *A prospective and randomized trial of zoledronic acid to prevent bone loss in the first year after kidney transplantation* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

Bone and mineral disorders occur frequently in kidney transplant recipients and are associated with a high risk of fracture, morbidity, and mortality. Post-transplantation bone disease results from the evolution of preexisting renal osteodystrophy, use of glucocorticoids and other immunosuppressive drugs and other risk factors for osteoporosis. Bisphosphonates may prevent or ameliorate the bone loss after kidney transplantation. We randomly assigned 34 new living-donor kidney recipients to either 5 mg of zoledronic acid plus cholecalciferol or cholecalciferol alone for 12 months. We obtained bone mineral density (BMD) by DXA, microcomputed tomography (HR-pQCT) and bone biopsies at the time of kidney transplant and after 12 months of protocol treatment. Correlations between invasive and noninvasive techniques that assesses trabecular and cortical bone microarchitecture were made. There was a good agreement between HR-pQCT and transiliac bone biopsies regarding cortical compartment. Conversely, in trabecular bone, despite being statistically significant and greater than that described for the general population, the correlations between both methods were modest. The expected decrease in BMD after kidney transplantation did not occurred. On the contrary, there was an increase in BMD at total femur in both groups, and at lumbar spine in the zoledronic acid group. HR-pQCT data showed that this gain of bone mass in zoledronic acid group was in cortical bone. The bone histomorphometric analysis demonstrated a decrease in cortical porosity and increase in cortical width, more evident in zoledronic acid group. Bone turnover markers decreased in both groups, however there was no risk of adynamic bone disease or mineralization defect with zoledronic acid. The benefits observed on cortical bone, combined with a favorable safety profile and the ability to prevent fractures suggest that there is still room for the use of bisphosphonates after kidney transplantation. Further studies are needed before the use of prophylactic bisphosphonates to attenuate bone loss can be recommended in kidney transplant recipients.

Descriptors: hyperparathyroidism; renal insufficiency, chronic; parathyroid hormone; bone density; diphosphonates; kidney transplantation; clinical trial.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Distúrbios do metabolismo mineral e da remodelação óssea são complicações comuns que afetam pacientes após o transplante renal e representam importantes causas de morbidade e mortalidade. O transplante renal bem sucedido geralmente corrige os distúrbios do metabolismo mineral e consequentemente a doença óssea; porém, muitos pacientes persistem com alterações esqueléticas resultantes de uma complexa interposição de fatores. Dentre eles vale ressaltar a resolução incompleta das alterações minerais e ósseas devido ao funcionamento deficiente do enxerto, a ação de drogas imunossupressoras e a presença de fatores de risco para o desenvolvimento de osteoporose que acometem a população geral, tais como, idade avançada, sexo feminino, raça braca, hipogonadismo, estado nutricional inadequado e ausência de atividade física ¹⁻⁸.

A perda de massa óssea após o transplante é um fenômeno bem descrito, que se inicia precocemente e pode persistir por vários anos, mesmo em pacientes com função renal preservada. Estudos com biópsias ósseas antes e depois do transplante já demonstram alterações na morfologia dos osteoblastos três semanas após o transplante ⁹. Os corticoides exercem um papel importante na doença óssea pós-transplante. Monier-Faugere e colaboradores estudaram 53 transplantados renais com um tempo médio de transplante de 5,4 anos, recebendo imunossupressão com prednisona, ciclosporina e azatioprina, e observaram que tanto a remodelação óssea, medida por frequência de ativação, quanto o volume trabecular foram inversamente proporcionais à dose cumulativa de corticoides ¹⁰.

Uma rápida diminuição na densidade mineral óssea (DMO) medida por absorptometria de raio-x de dupla energia (DXA) é observada nos primeiros 6 meses após o transplante, diminuindo a partir de então, possivelmente refletindo o decréscimo da dose de corticoides. É relatada uma diminuição na DMO de 5,5 a 19,5% durante os primeiros 6 meses, e de apenas 2,6 a 8,2% entre 6 a 12 meses após o transplante ^{11,12}. DMO avaliada por DXA correlaciona-se com a incidência de fraturas em transplantados renais, embora esta associação não seja tão robusta quanto em pacientes sem doença renal ¹³. Estimativas demonstraram que de 7 a 10% dos pacientes transplantados renais sofrerão uma ou mais fraturas durante suas vidas. O risco de fraturas após o transplante renal é 360 a 380% maior do que em indivíduos saudáveis, e 30% maior durante os primeiros três anos de transplante do que nos pacientes em diálise ^{14,15}.

Transplantados renais têm um risco particularmente elevado de fraturas vertebrais. Este risco parece ser maior pela maior quantidade de osso trabecular nas vértebras, e pela influência dos imunossupressores neste tipo de osso ¹⁵. Embora em um estudo a incidência relatada de fraturas necessitando de hospitalização tenha sido de 8,9 por 1.000 pacientes-ano ¹⁴, um estudo populacional que também levou em consideração fraturas tratadas fora do ambiente hospitalar relatou uma incidência bem maior (128 fraturas por 1.000 pacientes-ano) ¹⁵. Neuropatia e doença vascular periférica, perda de acuidade visual, idade avançada, sexo feminino (especialmente no período pós-menopausa), dose cumulativa de corticosteróides, diabetes e transplante duplo pâncreas-rim são fatores de risco identificados para fraturas pós-transplante renal ^{16,17}. Estudos mais recentes, entretanto, não têm conseguido reproduzir esta elevada taxa de fraturas. Naylor e colaboradores encontraram uma

incidência cumulativa de fraturas em transplantados renais de 1,7% em dez anos. Nesta coorte canadense de 4821 receptores de transplante renal com idade média de 50 anos, a incidência cumulativa de fraturas não vertebrais em transplantados renais foi 1,6% em três anos, maior do que a da população geral sem fraturas prévias (0,5%) e a de pacientes com DRC pré-dialítica (1,1%), mas menor do que a da população geral com fraturas prévias (2,3%) ¹⁸.

Além da incidência elevada, fraturas em pacientes com DRC e transplantados renais têm consequências mais graves. Nitsch e colaboradores observaram que, em pacientes com DRC, a presença de taxa de filtração glomerular menor do que 45 ml/min/1,73m² aumentou em quase duas vezes a mortalidade associada a fratura de quadril em um seguimento médio de sete anos ¹⁹. A mortalidade de pacientes em diálise após uma fratura de quadril é aproximadamente o dobro da observada em pacientes não dialíticos, e nos primeiros três anos de transplante, pacientes hospitalizados por fratura de quadril apresentam um risco de óbito por todas as causas sessenta por cento maior ^{14,20}.

Embora na população geral a DMO por DXA seja aceita como uma medida não invasiva do risco de fratura, o valor destas medidas na avaliação de pacientes com DRC e transplantados renais não é bem estabelecido. A biópsia óssea com dupla marcação por tetraciclina é o único meio acurado e razoavelmente disponível de diagnosticar a histopatologia da doença óssea pós-transplante, embora não seja realizada com frequência. Os estudos com biópsia óssea em transplantados demonstram diminuição na formação e distúrbios na mineralização, além de aumento na reabsorção óssea. As alterações na formação óssea devem-se a uma diminuição da osteoblastogênese, aumento da apoptose e déficit de função dos osteoblastos ^{4,9,21}.

Como a realização de biópsia óssea de crista ilíaca é um procedimento invasivo, e que, além disso, demanda tempo e custos elevados, há um grande interesse em técnicas de imagem não invasivas que permitam a avaliação da microestrutura óssea *in vivo*. Uma destas técnicas é a tomografia computadorizada periférica quantitativa de alta resolução (HR-pQCT). As imagens em três dimensões obtidas com esta técnica possibilitam a visualização da microarquitetura do osso trabecular, antes avaliada apenas através de biópsia óssea. Camada cortical e osso trabecular são avaliados de forma separada, uma vantagem em relação à DXA. A HR-pQCT fornece medidas semelhantes às obtidas em análises histomorfométricas de parâmetros estáticos, como número de trabéculas, separação de trabéculas, espessura trabecular, relação de volume ósseo e volume total, porosidade e espessura cortical, como pode ser visto na Figura 1. Além disso, a análise do elemento finito, um modelo matemático que pode ser aplicado às imagens em 3D da HR-pQCT para calcular o módulo de Young, fornece uma estimativa da força ou rigidez do osso trabecular que demonstra excelente correlação com verdadeiros testes biomecânicos de espécimes ósseos ^{22,23}. Dados de HR-pQCT são capazes de discriminar em mulheres pós-menopáusicas grupos com e sem fraturas, e podem ser utilizados como um preditor clínico do risco de fratura ²⁴.

Figura 1 - Tomografia computadorizada periférica quantitativa de alta resolução

Negri e colaboradores avaliaram a microestrutura óssea através de HR-pQCT em um grupo de 50 pacientes em hemodiálise e 50 controles pareados por idade e sexo, e observaram que os pacientes em diálise apresentavam uma diminuição acentuada na densidade, espessura e área cortical, e uma redução significativa nos parâmetros trabeculares, que se correlacionaram com a severidade do hiperparatireoidismo apenas em mulheres²⁵. Nickolas e colaboradores avaliaram

DMO por DXA e densidade mineral volumétrica, geometria e microarquitetura óssea por HR-pQCT em pacientes com DRC pré-dialítica. Pacientes com fraturas apresentavam menor DMO por DXA e menores densidade mineral e espessura cortical, além de maior perda trabecular (diminuição do número e densidade, aumento da separação e da heterogeneidade) por HR-pQCT ²⁶.

Não há estudos comparando os achados da HR-pQCT com biópsia óssea transilíaca em pacientes adultos com DRC. Cohen e colaboradores realizaram esta comparação em um grupo de 54 pacientes, com idade média de 39 anos e função renal normal. Os autores encontraram que os parâmetros de HR-pQCT do rádio e tíbia geralmente não se correlacionam com aqueles obtidos pela análise histomorfométrica das biópsias de crista ilíaca. Apenas o volume trabecular (BV/TV) atingiu significância estatística, e apenas no rádio. As associações entre as medidas de microarquitetura óssea e as estimativas de competência mecânica (análise do elemento finito) entre o esqueleto periférico (HR-pQCT) e axial (biópsias transilíacas) foram significativas, no entanto apenas de moderada intensidade ²⁴.

Para o tratamento da osteoporose na população geral, há um grande número de drogas disponíveis capazes de reduzir a perda de massa óssea e a incidência de fraturas. Os bisfosfonatos, por exemplo, melhoram a DMO, reduzem as taxas de fraturas de quadril e diminuem a mortalidade em mulheres pós-menopáusicas ²⁷⁻²⁹. Pela carência de dados de segurança e um risco aumentado de efeitos adversos, o uso destas drogas é controverso em pacientes com DRC e anormalidades do PTH (paratormônio) ou vitamina D, filtração glomerular menor do que 30 ml/min/1,73m² (estágios 4 e 5) e após o transplante renal. A eficácia destas drogas em curto e longo prazo têm sido avaliada em transplantados renais; entretanto, poucos estudos

empregaram biópsia óssea e avaliaram o impacto das drogas na redução de fraturas
30-39

Coco e colaboradores realizaram um dos poucos estudos randomizados e controlados com o uso de bisfosfonatos para evitar a perda óssea após o transplante renal em que os pacientes foram submetidos à biópsia óssea. Os pacientes receberam pamidronato endovenoso, vitamina D e cálcio no grupo intervenção e apenas vitamina D e cálcio no grupo controle. Vinte e um pacientes foram submetidos a biópsia óssea antes do tratamento e, destes, 14 realizaram biópsias de controle seis meses após. O uso de pamidronato preservou a DMO na coluna vertebral após seis meses de término do tratamento. No entanto, foi responsável pelo desenvolvimento de doença óssea adinâmica (DOA) em todos os pacientes tratados que foram submetidos à biópsia óssea de controle. Os marcadores de formação e reabsorção óssea não foram diferentes entre os dois grupos estudados. O pequeno número de pacientes, especialmente os que foram submetidos à biópsia óssea de controle (n=8), e as doses altas de pamidronato utilizadas (60 mg na ocasião do transplante, e 30 mg nos meses 1, 2, 3 e 6) são importantes críticas a este estudo ³¹. Haas e colaboradores randomizaram 20 pacientes para receberem ácido zoledrônico ou placebo após o transplante renal, e destes, 13 (7 no grupo intervenção e 6 no grupo controle) realizaram biópsias ósseas pré e pós-tratamento. Os pacientes que receberam bisfosfonato apresentaram um aumento da DMO da coluna lombar e estabilização da DMO do fêmur. A doença óssea de alta remodelação resolveu-se similarmente nos dois grupos, e DOA não foi encontrada nos pacientes tratados com ácido zoledrônico ³². Entretanto neste estudo e no de anteriormente citado apenas parâmetros estáticos

da histomorfometria foram analisados. Em nenhum dos dois estudos foi realizada avaliação dinâmica através da dupla marcação com tetraciclina ^{31,32}.

Aproximadamente 10 anos depois destas duas publicações pioneiras ^{31,32}, o mesmo grupo de Coco e colaboradores publicou um novo estudo randomizado e controlado, agora com o uso do risedronato, um bisfosfonato de terceira geração, para atenuar a perda óssea em pacientes transplantados renais. Foram randomizados 42 pacientes receptores de transplante renal com doador vivo para receber profilaticamente 35 mg de risedronato por semana ou placebo. Foram realizadas biópsias ósseas na ocasião do transplante e um ano após. Dezesesseis pacientes no grupo intervenção e 13 no grupo controle realizaram as duas biópsias. Parâmetros histomorfométricos dinâmicos foram avaliados em poucos pacientes e os dados não puderam ser analisados. De forma geral o risedronato não afetou a DMO; entretanto, em uma análise de subgrupos, houve uma tendência de preservação da DMO em pacientes do sexo feminino. Não houve evidência do desenvolvimento de DOA ⁴⁰.

Não há nenhum estudo clínico controlado e randomizado que demonstre efeitos benéficos ou maléficos de drogas utilizadas para evitar a perda óssea após o transplante renal, considerando desfechos ligados ao paciente, especialmente fraturas, hospitalizações e mortalidade. Há apenas dados inconsistentes e de baixa qualidade mostrando efeitos positivos da vitamina D, análogos da vitamina D e bisfosfonatos na DMO de pacientes com doença óssea pós-transplante estabelecida. Visto que a DMO não é um marcador bem estabelecido do risco de fraturas em pacientes transplantados (e nem mesmo aceito como desfecho para o estudo de drogas contra a osteoporose na população geral), a qualidade das evidências existentes até o momento é muito ruim. As diretrizes recentemente publicadas do

KDIGO (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*) sugerem que a medida da DMO seja realizada nos primeiros três meses após o transplante renal naqueles pacientes com filtração glomerular acima de 30 ml/min/1,73m², e que o tratamento com vitamina D e análogos, ou bisfosfonatos, deve ser considerado, especialmente para pacientes com um risco elevado de fraturas. Dada a complexidade e heterogeneidade da doença óssea pós-transplante, é sugerido o uso da biópsia óssea e outros marcadores bioquímicos da DMO-DRC, ao invés da DXA, para nortear a terapêutica, especialmente no caso do uso de bisfosfonatos, pelo potencial de suprimir a remodelação óssea e causar DOA ⁴¹.

Em resumo, ainda não há consenso sobre o uso de bisfosfonatos após o transplante renal, sendo que alguns centros realizam esta prática para todos os seus pacientes e outros não a realizam ^{21,30,34,42}. Provavelmente, seu uso deve estar indicado em um grupo selecionado de indivíduos, que apresentam doença de alta remodelação na época do transplante e que teriam um risco menor de vir a desenvolver DOA após este procedimento. No entanto, esta hipótese somente poderia ser confirmada através de um estudo clínico que avaliasse prospectivamente os efeitos desta medicação em pacientes que fossem submetidos a transplante renal, comparados a outros indivíduos que receberiam apenas a terapia padrão.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

1.1 PRIMÁRIO

- Avaliar a capacidade do ácido zoledrônico em prevenir a perda óssea no primeiro ano após o transplante renal.

1.2 SECUNDÁRIOS

- Avaliar o efeito do uso de bisfosfonatos sobre os parâmetros de histomorfometria óssea após o transplante renal, considerando os novos esquemas imunossupressores utilizados atualmente, especialmente com uma menor carga de corticoides.
- Avaliar a correlação dos achados da tomografia computadorizada periférica quantitativa de alta resolução com os dados histomorfométricos obtidos com biópsia óssea de crista ilíaca.

3 Pacientes e Métodos

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Pacientes candidatos a transplante renal com doador vivo no Serviço de Transplante Renal do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com condição clínica estável no peri-operatório e capacidade de manter seguimento regular após o transplante, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os pacientes foram abordados antes do transplante, pela necessidade de agendamento prévio da biópsia óssea após a dupla marcação com tetraciclina.

3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Filtração glomerular $> 30 \text{ ml/min/1,73m}^2$ após uma semana de transplante.
- Pacientes menores de 18 anos.
- Pacientes com transplantes de outros órgãos simultaneamente.
- Pacientes que tiverem realizado paratireoidectomia ou com passado de doença óssea adinâmica (diagnosticada por biópsia óssea).
- PTH pré-transplante $< 130 \text{ pg/ml}$.
- Uso prévio de bisfosfonatos.

3.3 PROTOCOLO DO ESTUDO

Os pacientes foram randomizados para um dos dois grupos. A randomização foi feita em blocos, através de um programa desenvolvido especificamente para este fim. Um grupo recebeu ácido zoledrônico em dose única de 5 mg endovenosa e reposição de vitamina D₃ com o objetivo de manter os níveis séricos de 25 (OH) vitamina D acima de 30 ng/ml. O grupo controle recebeu apenas vitamina D₃ com os alvos anteriormente descritos. O ácido zoledrônico foi infundido diluído em solução salina ao longo de 15 minutos. Os pacientes foram previamente hidratados para evitar efeitos colaterais nefrotóxicos. Para pacientes do sexo feminino incluídas no estudo, foram oferecidos métodos anticoncepcionais e as devidas orientações, assim como já é feito rotineiramente para mulheres em idade fértil durante o primeiro ano de transplante no Serviço de Transplante Renal do HCFMUSP.

Os pacientes foram submetidos a uma biópsia óssea de crista ilíaca com dupla marcação por tetraciclina na primeira semana de transplante e após um ano de seguimento. Este procedimento é realizado rotineiramente pelos médicos da Disciplina de Nefrologia do HCFMUSP, sob anestesia local, e as análises histomorfométricas feitas no Laboratório de Fisiopatologia Renal (LIM16). DMO medida por DXA foi avaliada no momento do transplante, após 6 e 12 meses. Tomografia computadorizada periférica quantitativa de alta resolução foi realizada no momento do transplante e ao final dos 12 meses.

Parâmetros bioquímicos, incluindo cálcio e fósforo séricos, PTH, fosfatase alcalina, marcadores de formação e reabsorção óssea (fração óssea da fosfatase alcalina e deoxipiridinolina, respectivamente), 25-hidroxivitamina D, hormônios

tireoidianos e sexuais, calciúria e fosfatúria foram coletados. Dados do transplante, medicações imunossupressoras e função renal também foram documentados, inicialmente a intervalos semanais, de acordo com a rotina de retornos ambulatoriais no período de pós-transplante imediato, e a partir do terceiro mês mensalmente, como mostrado na Figura 2.

Mês	Tx	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Cálcio	X			X			X			X			X
Fósforo	X			X			X			X			X
Creatinina	X			X			X			X			X
Gasometria venosa	X			X			X			X			X
Magnésio	X			X			X			X			X
PTH	X			X			X			X			X
25 (OH) vitD	X						X						X
FA	X			X			X			X			X
Fração óssea da FA	X						X						X
TRAP5b	X						X						X
Esclerostina	X						X						X
TSH, T4I, FSH, LH, Testosterona	X												X
Ca e P urinários	X						X						X
Bx óssea	X												X
DXA	X						X						X
HR-pQCT	X						X						X

Figura 2 - Protocolo do estudo

3.4 EXAMES BIOQUÍMICOS

As análises de PTH e 25-hidroxivitamina D foram feitas pelo método imunoquimioluminométrico. Hormônio estimulante da tireóide (TSH), tiroxina livre (T4 livre), hormônio folículo-estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH) e testosterona foram dosados por fluoroimunoensaio. Fosfatase alcalina (FA) foi analisada pelo método cinético automatizado. Cálcio e fósforo séricos e urinários foram dosados pelo método colorimétrico automatizado. As análises da esclerostina, fração óssea da FA e TRAP5b foram realizadas por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

3.5 BIÓPSIA ÓSSEA

Os pacientes foram submetidos a uma biópsia óssea de crista ilíaca com dupla marcação por tetraciclina antes do transplante e após um ano de seguimento. Este procedimento foi realizado sob anestesia local, e as análises histomorfométricas feitas no Laboratório de Fisiopatologia Renal (LIM16), sob a coordenação da Professora Dra. Vanda Jorgetti.

As biópsias foram analisadas por histomorformetria, e medidas do volume trabecular total e mineralizado foram realizadas (2D BV/TV e 2D Md.V/TV, respectivamente), assim como da espessura e porosidade cortical, e avaliação dos parâmetros dinâmicos.

A histologia óssea foi classificada com base na remodelação (*turnover*), mineralização (*mineralization*) e volume (*volume*) – TMV, de acordo com as

recomendações do KDIGO ⁴¹, como está representado esquematicamente na Figura 3. Foi considerado um defeito de mineralização um tempo de mineralização superior a 50 dias. Para a análise do volume ósseo, considerou-se como referência de normalidade uma amostra composta por 125 brasileiros saudáveis, de diferentes idades, raças e sexos ⁴³.

Adaptado de Ott, S. M.⁴⁴

Figura 3 - Relação entre o sistema TMV e os tipos clássicos de osteodistrofia renal

3.6 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE MINERAL ÓSSEA

A DMO foi avaliada por DXA, usando o densitômetro HOLOGIG Discovery (Hologic Inc, Bedford, MA, USA) no Laboratório de Metabolismo Ósseo da Disciplina de Reumatologia – LIM17, sob a coordenação da Professora Dra. Rosa M. R. Pereira. As DMO foram expressas em g/cm^2 e analisadas na coluna lombar e quadril, sendo calculados os escores T e Z, para comparações com indivíduos jovens e pareados pela idade, respectivamente, da mesma raça e sexo.

3.7 TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA PERIFÉRICA QUANTITATIVA DE ALTA RESOLUÇÃO

A avaliação da microarquitetura óssea trabecular e cortical foi realizada através do equipamento de tomografia computadorizada periférica quantitativa de alta resolução (HR-pQCT) modelo XtremeCT (SCANCO Medical AG) no Laboratório de Metabolismo Ósseo da Disciplina de Reumatologia – LIM17, sob a coordenação da Professora Dr. Rosa M. R. Pereira.

A realização da HR-pQCT permite a análise da região de tíbia e rádio, com avaliação dos seguintes parâmetros: densidade mineral total (D100), densidade cortical (Dcomp) e densidade trabecular (Dtrab), número de trabéculas (Tb.N), separação de trabéculas (Tb.Sp), espessura trabecular (Tb.Th), relação de volume ósseo e volume total (BV/TV), porosidade cortical (Ct.Po) e espessura cortical (Ct.Th), como mostrado na Figura 1. Como ainda não dispomos de um padrão de normalidade, principalmente na população brasileira, não colocamos os valores de referência para os parâmetros da HR-pQCT.

3.8 TAMANHO DA AMOSTRA

Para detectar uma diferença na taxa de formação óssea de 50% entre os 2 grupos foi estimado um total de 15 pacientes por grupo, considerando uma perda de seguimento durante o tempo do estudo de 10%.

3.9 TEMPO DE RECRUTAMENTO

O tempo de recrutamento foi de 12 meses.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados descritivos foram expressos como médias e desvios-padrão ou medianas e intervalo 25-75%, para variáveis com distribuição paramétrica e não paramétrica, respectivamente. A distribuição normal foi avaliada pelo teste de D'Agostino-Pearson. Variáveis categóricas foram analisadas por qui-quadrado.

Para comparação das médias das variáveis contínuas de distribuição paramétrica intra e entre os grupos foi aplicado o teste t de Student, pareado e não pareado, respectivamente. Os testes de Wilcoxon e Mann-Whitney U foram usados para determinar a significância entre variáveis não paramétricas.

Correlações entre parâmetros histomorfométricos, tomografia computadorizada periférica de alta resolução e DXA foram realizadas. Foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman para avaliar a associação entre as variáveis.

Significância estatística foi assumida para resultados de $p < 0,05$.

4 Resultados

4 RESULTADOS

Nós analisamos inicialmente os dados basais de 31 dos pacientes incluídos neste estudo clínico, que está registrado na plataforma *ClinicalTrials.gov* com o identificador NCT01675089. Conforme demonstrado na Figura 4, durante o período de inclusão foram realizados 64 transplantes com doador vivo no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Destes, 34 eram elegíveis para o estudo e foram incluídos na randomização. Nenhum paciente recusou a participação. Dos 17 pacientes incluídos no grupo intervenção, um foi excluído por ter perdido o enxerto precocemente (< 7 dias), devido a uma trombose venosa, e uma paciente não realizou a biópsia de controle por dificuldade técnica. No grupo controle uma paciente foi excluída por ter seu transplante suspenso. Dois pacientes foram excluídos da análise final por apresentar perda acentuada da função renal.

Figura 4 - Randomização dos pacientes. H, homem; M, mulher

4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS BASAIS DO GRUPO INTEIRO

A maioria dos pacientes era jovem, com idade média de 41 ± 11 anos, e com um tempo em diálise de 27 (14 – 49) meses, sendo que 15 (48%) estavam em diálise há menos de 2 anos. Vinte e sete (87%) dos pacientes estavam em hemodiálise, 3 (10%) em diálise peritoneal e uma paciente foi transplantada preemptivamente. A principal causa de DRC foi glomerulonefrite crônica, em 58% dos pacientes. Dezenove (61%) eram homens e 23 (74%) da raça branca.

Com relação aos achados bioquímicos, o cálcio sérico médio foi de $8,4 \pm 0,6$ mg/dl. Hipocalcemia estava presente em 18 (58%) dos pacientes. Nenhum paciente apresentava hipercalcemia. O fósforo médio foi de $3,4 \pm 1,5$ mg/dl, sendo que 11 (35%) pacientes apresentavam hipofosfatemia e 9 (29%) hiperfosfatemia. Os valores médios de PTH foram 688 ± 489 pg/ml (variação, 79 – 1872 pg/ml). Apenas 2 pacientes apresentavam PTH baixo (< 130 pg/ml, ou 2 vezes o limite superior do valor de referência, de acordo com as recomendações do KDIGO). Estes pacientes apresentavam valores prévios de PTH (< 3 meses) acima de 130 pg/ml, e por isso foram incluídos no estudo. Treze pacientes (42%) apresentavam valores de PTH dentro da faixa adequada para a população (2-9 vezes o limite superior do valor de referência, ou 130 – 585 pg/ml) e 16 (52%) apresentavam valores elevados de PTH. Cinco (16%) pacientes apresentavam deficiência de 25-vitamina D (< 15 ng/ml), 16 (29%) insuficiência (15 – 30 ng/ml) e 10 (32%) suficiência (> 30 ng/ml). Valores elevados de esclerostina foram encontrados em 17 (55%) pacientes. Os parâmetros clínicos e laboratoriais estão detalhados na Tabela 1.

Tabela 1 - Características clínicas e parâmetros laboratoriais dos pacientes (n=31)

Característica	Valores
Sexo masculino	19 (61)
Raça branca	23 (74)
Idade (anos)	41 ± 11
Tempo em diálise (meses)	27 (14 – 49)
Tipo de diálise	
Hemodiálise	27 (87)
Diálise peritoneal	3 (10)
Sem diálise	1 (3)
Cauda de doença renal crônica	
Glomerulonefrite	18 (58)
Nefroesclerose hipertensiva	4 (13)
Nefropatia diabética	1 (3)
Doença renal policística	2 (6)
Outras	2 (6)
Indeterminada	3 (10)
Índice de massa corpórea (kg/m ²)	24,1 (20,5 – 26,2)
Cálcio sérico (mg/dl)	8,4 ± 0,6
Fósforo sérico (mg/dl)	3,4 ± 1,5
Fosfatase alcalina (UI/L)	93 (71 – 145)
PTH (pg/ml)	376 (224 – 530)
25-hidroxivitamina D (ng/ml)	25 (18 – 34)
Esclerostina (ng/ml)	1,03 (0,51 – 1,83)

Os dados estão expressos em forma de (n; %), ou média ± desvio-padrão, em caso de distribuição normal, ou mediana e intervalo 25-75%.

Na Tabela 2 estão discriminados os resultados basais dos hormônios sexuais, em homens e mulheres. A maioria dos homens apresentava níveis normais de testosterona total. Apenas um paciente apresentava níveis baixos de testosterona (< 271 ng/dl), compatíveis com hipogonadismo.

Tabela 2 - Hormônios sexuais. Resultados basais

	Homens	Mulheres	p	Valores de referência
FSH (UI/L)	5 (3 – 6)	8 (2 – 129)	0,56	Fase folicular: 3,5-12,5 UI/L Fase ovulatória: 4,7-21,5 UI/L Fase lútea: 1,7-7,7 IU/L Pós-menopausa: 25,8-134,8 UI/L Homens: 1,5-12,4 UI/L
LH (UI/L)	8 (6 – 13)	35 (5 – 122)	0,09	Fase ovulatória: 14,0-95,6 UI/L Fase lútea: 1,0-11,4 UI/L Pós-menopausa: 7,7-58,5 UI/L Homens: 1,7-8,6 UI/L
Testosterona (ng/dl)	614 ± 282	56 ± 45	<0,001	Mulheres: < 48 ng/dl Homens: 193-836 ng/dl

Os dados estão expressos em forma de média ± desvio-padrão, em caso de distribuição normal, ou mediana e intervalo 25-75%.

4.2 DENSIDADE MINERAL ÓSSEA (DMO)

A maioria dos pacientes tinha densidade mineral óssea avaliada por DXA dentro da faixa de normalidade ou de osteopenia. Osteoporose (escore $T \leq 2,5$) na coluna lombar ou fêmur total foi encontrada em 8 (26%) pacientes, sendo 6 na coluna lombar e 3 no fêmur total, conforme descrito na Tabela 3. Comparados a indivíduos da mesma raça e sexo, pareados pela idade, baixa DMO (escore $Z \leq 2,0$) foi encontrada em 9 (29%) pacientes, sendo 7 na coluna lombar e 3 no fêmur total.

A DMO da coluna lombar correlacionou-se com a idade ($r = -0,50$; $p < 0,05$), altura ($r = 0,47$; $p < 0,05$), testosterona em homens ($r = 0,63$; $p < 0,05$), FSH ($r = -0,70$; $p < 0,05$) e LH ($r = -0,58$; $p < 0,05$) em mulheres. A DMO do fêmur total correlacionou-se com a idade ($r = -0,40$; $p < 0,05$) e altura ($r = 0,37$; $p < 0,05$).

Tabela 3 - Densidade mineral óssea. Resultados basais do grupo inteiro ($n = 31$)

	DMO (g/cm ²)	Normal ($T > -1$ DP)	Osteopenia ($-2,5 < T < -1$ DP)	Osteoporose ($T < -2,5$ DP)
Homens				
Coluna lombar	$0,96 \pm 0,15$	8	7	4
Fêmur total	$0,89 \pm 0,11$	10	9	0
Mulheres				
Coluna lombar	$0,87 \pm 0,12$	5	5	2
Fêmur total	$0,76 \pm 0,15$	6	3	3

Os escores T basais estão expressos em desvios-padrão abaixo da média de um indivíduo saudável de 30 anos de idade, do mesmo sexo.

4.3 CORRELAÇÕES ENTRE HR-pQCT E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E PARÂMETROS LABORATORIAIS

Como ainda não temos um padrão de normalidade para a população brasileira, não podemos avaliar se os valores encontrados em nossos pacientes estão normais ou abaixo da média. Negri e colaboradores fizeram esta avaliação na cidade de Buenos Aires em um grupo de 50 pacientes em hemodiálise e 50 controles pareados por idade e sexo, e observaram que os pacientes em diálise apresentavam uma diminuição acentuada na densidade, espessura e área cortical, e uma redução significativa nos parâmetros trabeculares ²⁵. Nossos pacientes, predominantemente jovens, do sexo masculino e com pouco tempo em diálise, apresentavam densidades minerais ósseas semelhantes ou até superiores às da população normal do estudo de Negri e colaboradores.

Encontramos correlações negativas entre a Dcomp do rádio e a idade ($r = -0,36$; $p < 0,05$), tempo em diálise ($r = -0,44$; $p < 0,05$), PTH ($r = -0,58$; $p < 0,05$) e fosfatase alcalina ($r = -0,59$; $p < 0,05$). A Dtrab do rádio correlacionou-se com a idade ($r = -0,78$; $p < 0,05$), FSH em mulheres ($r = -0,79$; $p < 0,05$) e testosterona em homens ($r = 0,62$; $p < 0,05$), como demonstrado na Figura 5.

Correlação entre Dcomp do rádio e idade

5a

Correlação entre Dcomp do rádio e tempo em diálise

5b

Correlação entre Dcomp do rádio e PTH

5c

Correlação entre Dcomp do rádio e FA

5d

Figura 5 - Correlações entre HR-pQCT e características clínicas e parâmetros laboratoriais. **5a.** Dcomp do rádio vs. idade. **5b.** Dcomp do rádio vs. tempo em diálise. **5c.** Dcomp do rádio vs. PTH. **5d.** Dcomp do rádio vs. FA. (continua)

5e

5f

5g

Figura 5 (continuação) - Correlações entre HR-pQCT e características clínicas e parâmetros laboratoriais. **5e.** Dtrab do rádio vs. idade. **5f.** Dtrab do rádio vs. FSH em mulheres. **5g.** Dtrab do rádio vs. testosterona em homens.

4.4 BIÓPSIAS BASAIS E SUAS CORRELAÇÕES COM HR-pQCT e DXA

Baixo volume trabecular (2D BV/TV) foi encontrado em 4 (13%) pacientes. Em 20 (64%) pacientes o volume ósseo estava dentro da faixa de normalidade e em 7 (23%) acima das médias para indivíduos da mesma idade e sexo, como descrito anteriormente. Dos quatro pacientes com baixo 2D BV/TV, dois apresentavam osteoporose pela DXA, um na coluna lombar e fêmur total e um apenas na coluna lombar. Como o 2D BV/TV engloba o osso trabecular mineralizado e o volume de osteóide, também realizamos a análise do 2D BV/TV que considera apenas o osso mineralizado, ou seja, o 2D Md.V/TV.

Com relação à mineralização, 20 (64%) pacientes apresentavam um defeito na mineralização. Vinte pacientes (64%) apresentavam doença óssea de alta remodelação. Destes, 14 (45%) apresentavam defeito de mineralização, e podem ser classificados como portadores de doença mista, e 6 (19%) apresentavam mineralização normal, ou seja, osteíte fibrosa. Seis pacientes (19%) apresentavam defeito de mineralização e baixa remodelação, podendo receber o diagnóstico de osteomalácia, e 5 (16%) apresentavam baixa remodelação com mineralização normal, isto é, doença óssea adinâmica, como mostrado na Figura 6.

Figura 6 - Biópsias basais

Na Figura 7, observamos que o volume trabecular (2D BV/TV) correlacionou-se com DXA da coluna lombar ($r = 0,70$; $p < 0,05$), do fêmur total ($r = 0,59$; $p < 0,05$) e com o volume trabecular do rádio medido por HR-pQCT ($r = 0,52$; $p < 0,05$). O volume mineralizado (2D Md.V/TV) também correlacionou-se com DXA da coluna lombar ($r = 0,67$; $p < 0,001$), do fêmur total ($r = 0,63$; $p < 0,001$) e com o volume trabecular do rádio medido por HR-pQCT ($r = 0,50$; $p < 0,01$). Com relação ao compartimento cortical observamos uma boa correlação entre a porosidade cortical da biópsia transilíaca e a densidade cortical do rádio ($r = -0,68$; $p < 0,05$) e tíbia ($r = -0,61$; $p < 0,05$) medidas por HR-pQCT, como pode ser visto na Figura 7.

Correlação entre 2D BV/TV e DMO L1-L4

7a

Correlação entre 2D BV/TV e DMO fêmur total

7b

Correlação entre 2D BV/TV e HR-pQCT BV/TV rádio

7c

Correlação entre 2D Md.V/TV e DMO da coluna lombar

7d

Figura 7 - Correlações entre biópsia óssea, HR-pQCT e DXA. **7a.** 2D BV/TV vs. DXA da coluna lombar. **7b.** 2D BV/TV vs. DXA fêmur total. **7c.** 2D BV/TV vs. HR-pQCT BV/TV do rádio. **7d.** 2D Md.V/TV vs. DXA da coluna lombar. (continua)

Correlação entre 2D Md.V/TV e DMO do fêmur total

7e

Correlação entre 2D Md.V/TV e HR-pQTBV/TV do rádio

7f

Correlação entre Ct.Po e Dcomp do rádio

7g

Correlação entre Ct.Po e Dcomp da tíbia

7h

Figura 7 (continuação) - Correlações entre biópsia óssea, HR-pQCT e DXA. **7e.** 2D Md.V/TV vs. DXA do fêmur total. **7f.** 2D Md.V/TV vs. HR-pQCT BV/TV do rádio. **7g.** Correlação entre a porosidade cortical e Dcomp do rádio. **7h.** Correlação entre a porosidade cortical e Dcomp do rádio.

4.5 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS BASAIS E APÓS 1 ANO DE TRATAMENTO

Os dois grupos eram semelhantes com relação à idade, tempo em diálise, tipo de terapia renal substitutiva e causa da doença renal crônica. Não havia diferenças também em relação ao IMC, cálcio, fósforo, PTH e 25-hidroxivitamina D no início do estudo, como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Características clínicas e parâmetros laboratoriais basais (n=30)

Característica	Ácido zoledrônico (n = 16)	Controle (n = 14)	P
Sexo masculino	9 (56)	9 (64)	
Raça branca	10 (62)	11 (78)	
Idade (anos)	43 ± 11	39 ± 11	0,31
Tempo em diálise (meses)	25 (13 – 48)	27 (13 – 55)	0,90
Tipo de diálise			
Hemodiálise	14 (88)	12 (86)	
Diálise peritoneal	2 (12)	1 (7)	
Sem diálise	0	1 (7)	
Causa de doença renal crônica			
Glomerulonefrite	8	11	
Nefrosclerose hipertensiva	3	0	
Nefropatia diabética	0	1	
Doença renal policística	1	1	
Outras	2	0	
Indeterminada	2	1	
Índice de massa corpórea	22,7 ± 3,8	23,8 ± 3,7	0,42
Cálcio sérico	8,5 ± 0,5	8,2 ± 0,6	0,22
Fósforo sérico	3,4 ± 1,4	3,2 ± 1,7	0,72
Fosfatase alcalina	114 ± 85	125 ± 58	0,69
PTH	376 (211 – 490)	305 (181 – 565)	0,85
25-hidroxivitamina D	20 (15 – 28)	28 (22 – 34)	0,10
Esclerostina (ng/ml)	1,47 ± 1,0	1,12 ± 0,64	0,27
Fosfatase alcalina óssea (UI/L)	69 (35 – 103)	110 (30 – 128)	0,60
TRAP5b (UI/L)	9,6 ± 4,5	10,1 ± 4,6	0,72

Ao final de 12 meses de estudo, houve aumento do cálcio, diminuição do PTH e aumento da 25-hidroxivitamina D, de forma semelhante em ambos os grupos. Os valores de fósforo não sofreram alterações estatisticamente significativas, como pode ser visto nas Tabelas 5 e 6 e na Figura 8. Os marcadores de formação (fosfatase alcalina óssea) e reabsorção óssea (TRAP5b), e a esclerostina reduziram-se ao longo do estudo, sem diferença entre os grupos, como mostrado nas Tabelas 5 e 6 e na Figura 9.

Tabela 5 - Parâmetros laboratoriais, DXA e HR-pQCT do grupo inteiro (n = 30)

Parâmetro	Basal	12 meses	P
Cálcio (mg/dl)	8,3 ± 0,6	9,5 ± 0,5	< 0,0001
Fósforo (mg/dl)	3,3 ± 1,6	3,1 ± 0,7	0,62
FA (UI/L)	94 (70 – 145)	84 (61 – 101)	0,05
PTH (pg/ml)	364 (203 – 513)	74 (50 – 97)	< 0,0001
25-hidroxivitamina D (ng/ml)	24 (18 – 32)	29 ± 11	0,16
Esclerostina (ng/ml)	1,17 (0,61 – 1,87)	0,52 ± 0,15	< 0,0001
Fosfatase alcalina óssea (UI/L)	91 (34 – 125)	28 (18 – 36)	< 0,0001
TRAP5b (UI/L)	9,3 (6,5 – 12,4)	2,4 (1,7 – 5,2)	< 0,0001
DMO coluna lombar (g/cm ²)	0,92 ± 0,14	0,95 ± 0,13	0,003
DMO femur total (g/cm ²)	0,86 (0,75 – 0,96)	0,90 (0,84 – 1,0)	< 0,0001
HR-pQCT tíbia			
D100 (mg HA/cm ³)	286 ± 46	280 ± 43	0,20
Dcomp (mg HA/cm ³)	909 (869 – 960)	916 (861 – 979)	0,46
Dtrab (mg HA/cm ³)	149 ± 38	144 ± 33	0,15
BV/TV (%)	12,4 ± 3,2	12,0 ± 2,8	0,07
HR-pQCT rádio			
D100 (mg HA/cm ³)	317 ± 74	316 ± 69	0,95
Dcomp (mg HA/cm ³)	834 (797 – 931)	858 (841 – 908)	0,02
Dtrab (mg HA/cm ³)	179 ± 56	174 ± 50	0,003
BV/TV (%)	15,0 ± 4,6	14,5 ± 4,1	0,003

Tabela 6 - Parâmetros laboratoriais, DXA e HR-pQCT dos pacientes ao final de 12 meses

Parâmetro	Ácido zoledrônico (n=16)	Controle (n=14)	<i>P</i>
Creatinina (mg/dl)	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,4	0,21
Cálcio (mg/dl)	9,5 ± 0,6	9,5 ± 0,5	0,80
Fósforo (mg/dl)	3,2 ± 0,8	3,1 ± 0,7	0,67
FA (UI/L)	73 (48 – 89)	99 (77 – 133)	0,008
PTH (pg/ml)	74 (46 – 100)	70 (50 – 97)	0,69
25-hidroxivitamina D (ng/ml)	28 ± 8	30 ± 14	0,73
Esclerostina (ng/ml)	0,55 ± 0,14	0,50 ± 0,15	0,36
Fosfatase alcalina óssea (UI/L)	19 (17 – 29)	36 (24 – 58)	0,003
TRAP5b (UI/L)	1,8 (1,2 – 2,6)	4,5 (2,4 – 6,3)	0,001
DMO coluna lombar (g/cm ²)	0,95 ± 0,13	0,96 ± 0,14	0,79
DMO femur total (g/cm ²)	0,88 (0,81 – 0,97)	0,91 (0,87 – 1,05)	0,38
HR-pQCT tíbia			
D100 (mg HA/cm ³)	236 ± 64	280 ± 43	0,06
Dcomp (mg HA/cm ³)	896 (804 – 935)	916 (861 – 979)	0,29
Dtrab (mg HA/cm ³)	115 ± 33	144 ± 34	0,03
BV/TV (%)	9,5 ± 2,7	12,0 ± 2,7	0,03
HR-pQCT rádio			
D100 (mg HA/cm ³)	264 ± 91	316 ± 69	0,12
Dcomp (mg HA/cm ³)	834 (680 – 876)	858 (841 – 909)	0,23
Dtrab (mg HA/cm ³)	145 ± 48	174 ± 50	0,14
BV/TV (%)	12,0 ± 4,0	14,5 ± 4,1	0,14

Figura 8 - Bioquímica: ácido zoledrônico versus placebo

Figura 9 - Marcadores de formação e reabsorção: ácido zoledrônico versus placebo

A DMO do fêmur total, e D100 e Dtrab da tíbia eram significativamente menores no grupo ácido zoledrônico em comparação com o controle, no início do estudo. Houve um aumento da DMO medida por DXA no fêmur total em ambos os grupos, com uma tendência a um maior aumento no grupo que recebeu ácido zoledrônico ($p = 0,059$). Na DXA da coluna lombar houve um aumento na DMO do grupo ácido zoledrônico, enquanto no grupo controle os valores permaneceram estáveis. Observamos uma tendência a uma maior variação da DMO no grupo intervenção ($p = 0,08$), como mostrado na Figura 10 e Tabela 7. Por HR-pQCT não houve variação entre os dados basais e após um ano quando analisamos a densidade mineral total (D100). Entretanto, a Dtrab do rádio baixou nos dois grupos, de forma mais importante no grupo ácido zoledrônico, onde observamos um aumento significativo da densidade cortical, como mostrado na Tabela 7 e Figura 11.

Tabela 7 - DXA, HR-pQCT e biópsia óssea dos pacientes no início do estudo e ao final de 12 meses

Parâmetro	Ácido zoledrônico basal	Ácido zoledrônico 12 meses	<i>P</i>	Controle basal	Controle 12 meses	<i>P</i>	<i>P</i> Variações
DMO coluna lombar (g/cm ²)	0,90 ± 0,14	0,95 ± 0,13	0,006	0,96 ± 0,14	0,97 ± 0,14	ns	0,08
DMO femur total (g/cm ²)	0,82 (0,75 – 0,94)	0,89 (0,81 – 0,97)	< 0,001	0,92 ± 0,14	0,95 ± 0,13	0,003	0,059
HR-pQCT tíbia							
D100 (mg HA/cm ³)	239 ± 67	236 ± 64	ns	286 ± 47	280 ± 43	ns	ns
Dcomp (mg HA/cm ³)	870 ± 101	865 ± 95	ns	909 (869 – 960)	916 (861 – 979)	ns	ns
Dtrab (mg HA/cm ³)	117 ± 32	115 ± 33	ns	149 ± 38	144 ± 33	ns	ns
BV/TV (%)	9,8 ± 2,8	9,5 ± 2,7	ns	12,4 ± 3,2	12 ± 2,8	ns	ns
HR-pQCT rádio							
D100 (mg HA/cm ³)	261 ± 94	264 ± 91	ns	317 ± 74	316 ± 69	ns	ns
Dcomp (mg HA/cm ³)	761 ± 149	798 ± 107	0,01	834 (797 – 931)	858 (841 – 908)	ns	ns
Dtrab (mg HA/cm ³)	154 ± 47	145 ± 48	< 0,001	179 ± 56	174 ± 50	0,037	ns
BV/TV (%)	12,8 ± 3,8	12,1 ± 4	< 0,001	15 ± 4,6	14,5 ± 4,1	ns	ns
2D BV/TV (%)	23,4 ± 5,1	20,1 ± 5,9	0,08	25,3 ± 6,7	25,9 ± 8,9	ns	ns
2D Md.V/TV (%)	21,4 ± 6,1	19,4 ± 5,4	ns	24,5 ± 6,3	24,5 ± 9,1	ns	ns
Ct.Th (µm)	720 ± 176	1224 ± 398	< 0,001	756 (592 – 908)	1003 (791 – 1346)	< 0,001	ns
Ct.Po (%)	14 ± 5,5	11,7 ± 6	0,042	13,1 ± 5,4	10 ± 4,9	0,06	ns

Figura 10 - Densidade mineral óssea (g/cm²): ácido zoledrônico versus placebo

Figura 11 - HR-pQCT do rádio: ácido zoledrônico versus placebo

4.6 HISTOMORFOMETRIA: ÁCIDO ZOLEDRÔNICO *VERSUS* PLACEBO

Na análise das biópsias ósseas de crista ilíaca antes e depois do tratamento observamos em ambos os grupos que após um ano houve uma melhora na mineralização e espessamento das traves, entretanto com perda da conectividade, como pode ser visto na Figura 12 e Tabela 8.

O volume trabecular não variou de forma significativa; entretanto, houve um aumento da espessura e diminuição da porosidade cortical após um ano, notadamente no grupo que recebeu ácido zoledrônico, como mostrado na Figura 13. Com relação aos parâmetros de formação e reabsorção óssea, observamos uma diminuição do volume e superfície osteóide de forma significativa apenas no grupo ácido zoledrônico, assim como ocorreu com a superfície osteoblástica. A superfície osteoclástica reduziu nos dois grupos, com uma tendência a uma maior variação no grupo ácido zoledrônico ($p = 0,11$), como pode ser visto na Figura 14.

O uso do ácido zoledrônico nas doses aplicadas no estudo não levou ao desenvolvimento de doença óssea adinâmica, como pode ser visto na Figura 15.

Figura 12 - Biópsia pré e pós-tratamento em um paciente do grupo ácido zoledrônico

Tabela 8 - Histomorformetria. Parâmetros estáticos e dinâmicos do grupo inteiro (n=30)

Parâmetro	Basal	12 meses	P
BV/TV (%)	24,8 ± 6,4	22,9 ± 7,9	0,40
Md.V/TV (%)	23,4 ± 6,7	21,9 ± 7,7	0,52
Tb.Sp (µm)	391,3 ± 134,6	490,6 ± 168,2	0,006
Tb.N (/mm)	2,1 ± 0,5	1,7 ± 0,4	0,001
Tb.Th (µm)	124,5 (112,6 – 139,2)	130,9 (110,1 – 149,3)	0,45
OV/BV (%)	6,2 (2,2 – 10,7)	2,5 (1,3 – 4,6)	0,008
OS/BS (%)	38,9 (20,2 – 50,1)	19 (12,5 – 33,7)	0,003
O.Th (µm)	9,7 (6,2 – 12,8)	8,4 (5,3 – 12)	0,45
Ob.S/BS (%)	8 (4,3 – 14,1)	5,1 (2,2 – 6,7)	0,01
ES/BS (%)	12,1 ± 6,4	4,2 ± 2,3	<0,0001
Oc.S/BS (%)	1,5 (0,8 – 3)	0,4 (0,1 – 0,6)	<0,0001
Fb.V/TV (%)	0,26 (0,01 – 1,7)	0,0 (0,0 – 0,03)	0,0002
Ct.Po (%)	6,7 (5,5 – 8,6)	5,2 (2,4 – 7)	0,005
Ct.Th (µm)	708 (577 – 898)	1084 (836 – 1436)	<0,0001
MS/BS (%)	7,2 ± 4,6	3,3 ± 1,9	0,0002
MAR (µm/dia)	1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,5	0,92
BFR/BS (µm ³ /µm ² /dia)	0,04 (0 – 0,12)	0,02 (0,01 – 0,07)	0,21
Mlt (dias)	72 (36 – 477)	56 (27 – 235)	0,11

Figura 13 - Histomorfometria: ácido zoledrônico *versus* placebo. Parâmetros estruturais.

Figura 14 - Histomorfometria: ácido zoledrônico *versus* placebo. Parâmetros de formação e reabsorção óssea

Ácido zoledrônico

Grupo controle

Figura 15 - Histomorfometria: ácido zoledrônico *versus* placebo

5 Discussão

5 – DISCUSSÃO

Na primeira parte deste estudo fizemos uma comparação entre diferentes técnicas invasivas e não invasivas de avaliação da densidade mineral e microarquitetura óssea de pacientes com DRC estágio 5D. Em seguida, avaliamos o efeito do ácido zoledrônico na perda óssea que sabidamente ocorre durante o primeiro ano de transplante renal.

Este é o primeiro estudo a avaliar a associação entre as variáveis de microarquitetura do osso trabecular e cortical medidas por HR-pQCT no rádio distal e tibia, e as obtidas por biópsia óssea transilíaca em pacientes adultos com DRC. Em um grupo de 31 pacientes com DRC de diferentes etiologias, com grande variedade de idades, densidade mineral e achados de microarquitetura óssea, nós encontramos que as medidas de HR-pQCT apresentam uma boa concordância com os achados de biópsia óssea, especialmente com relação ao compartimento cortical.

A análise histomorfométrica de biópsias ósseas de crista ilíaca é uma ferramenta insubstituível para avaliação dos parâmetros dinâmicos de remodelação óssea, e, além disso, é considerada o padrão-ouro para avaliação da microarquitetura óssea. Nas últimas três décadas, informações fundamentais sobre achados de microarquitetura óssea em importantes doenças osteometabólicas, como osteoporose pós-menopáusica, hiperparatireoidismo primário e osteodistrofia renal foram obtidas a partir de análises histomorfométricas de biópsias ósseas ^{45,46}. Com a recente introdução de técnicas de imagem em alta resolução e três dimensões *in vivo*, como microressonância magnética e HR-pQCT, tornou-se possível avaliar a

microarquitetura trabecular de forma não invasiva em locais do esqueleto de grande importância clínica, sejam estes dependentes de carga ou não ²³. Nesta parte inicial do estudo, nosso objetivo foi determinar o grau com que os parâmetros microestruturais do osso periférico avaliados por HR-pQCT, por vezes chamada de “biópsia óssea virtual”, refletem as medidas de biópsias ósseas da crista ilíaca em pacientes com doença renal crônica.

Encontramos significativas correlações negativas entre a Dcomp, medida por HR-pQCT, e a idade, tempo em diálise, PTH e fosfatase alcalina, no rádio distal e tíbia. As correlações entre as duas técnicas foram boas no compartimento cortical. Provavelmente o hiperparatireoidismo secundário manifesta-se precocemente no osso destes pacientes afetando o compartimento cortical, e isso é detectado por técnicas invasivas e não invasivas. A Dtrab e o BV/TV, medidos por HR-pQCT, correlacionaram-se com a idade no rádio distal e tíbia, e com os hormônios sexuais, apenas no rádio. No osso trabecular, embora estatisticamente significantes e maiores do que as descritas na população geral, as correlações entre os dois métodos foram apenas de moderada intensidade.

Os estudos de microtomografia em pacientes com DRC têm demonstrado deterioração da microarquitetura cortical associada a uma redução importante dos parâmetros trabeculares ^{47,48}. Em um estudo longitudinal incluindo cinquenta e três pacientes com DRC estágios 2 a 5D e um tempo médio de seguimento de 1,5 anos, Nickolas e colaboradores encontraram que PTH, FAo, osteocalcina, P1NP, TRAP5b e CTX foram preditores de perda cortical, mais evidenciada no rádio. Níveis elevados de 25-hidroxivitamina D foram capazes de predizer um aumento na Dtrab e diminuição na heterogeneidade trabecular. Na regressão logística multivariada,

ajustada para parâmetros ósseos, bioquímicos e demográficos basais, o tratamento dialítico foi um preditor independente de aumento anual de seis a sete por cento na Ct.Po⁴⁹.

Negri e colaboradores encontraram uma redução importante na densidade, espessura e área cortical aliada a uma redução nos parâmetros trabeculares tanto em homens quanto em mulheres, embora estas mudanças tenham se correlacionado com a gravidade do hiperparatireoidismo secundário apenas em mulheres²⁵. Cejka e colaboradores obtiveram resultados semelhantes estudando HR-pQCT em pacientes submetidos a hemodiálise. As densidades volumétricas e a microarquitetura óssea foram medidas no rádio distal e tíbia e comparados com controles sadios pareados pela idade. As medidas de HR-pQCT revelaram uma microarquitetura óssea comprometida nos pacientes dialíticos em todos os parâmetros analisados, com exceção da Tb.Th. Neste estudo, a capacidade da HR-pQCT em discriminar pacientes com e sem fraturas em comparação com DXA também foi relatada. O comprometimento da microarquitetura óssea trabecular foi associado com fraturas. O parâmetro que foi o determinante mais forte de fratura foi a densidade trabecular da tíbia, que também apresentou a maior capacidade em discriminar pacientes com e sem história prévia de fratura. As diferenças entre os pacientes com e sem fraturas foram mais acentuadas nas mulheres do que nos homens, tanto no rádio distal quanto na tíbia. Já as diferenças na DMO medida por DXA entre pacientes com e sem fratura não foram estatisticamente significantes⁵⁰. Em nosso estudo não foram observadas novas fraturas durante o tempo de seguimento.

Não há estudos comparando os achados da HR-pQCT com biópsia óssea transilíaca em pacientes adultos com DRC. Cohen e colaboradores realizaram esta

comparação em cinquenta e quatro pacientes com função renal normal e encontraram que os parâmetros de HR-pQCT do rádio e tíbia geralmente não se correlacionam com aqueles obtidos pela análise histomorfométrica das biópsias de crista ilíaca ²⁴. Pereira e colaboradores analisaram biópsias transilíacas de sessenta e oito pacientes pediátricos com DRC e de quatorze controles através de histomorfometria e HR-pQCT e encontraram boas correlações entre as técnicas nas medidas do volume ósseo. Além disso, medidas da espessura osteoide correlacionaram-se com a densidade mineral óssea avaliada por HR-pQCT, sugerindo que a mineralização óssea possa também ser avaliada por HR-pQCT de biópsias ósseas ⁵¹. Nós encontramos boas correlações entre as medidas de volume e microarquitetura óssea entre o esqueleto periférico (HR-pQCT) e axial (biópsias transilíacas), especialmente no compartimento cortical ($r = -0,68$ para comparação entre Ct.Po e Dcomp do rádio; e $r = -0,61$ para comparação entre Ct.Po e Dcomp da tíbia). As técnicas não invasivas foram capazes de avaliar o volume ósseo com boa correlação com a biópsia transilíaca. No caso da microtomografia, os compartimentos trabecular e cortical podem ser avaliados de forma separada, uma vantagem em relação à DXA. No entanto, a biópsia é a única técnica capaz de avaliar a remodelação (*turnover*) e a mineralização óssea. Estudos prospectivos com maior número de pacientes serão necessários para avaliar a capacidade de cada técnica em prever fraturas nesta população de pacientes.

Na segunda parte da análise o objetivo foi avaliar o impacto da administração de ácido zoledrônico em dose única imediatamente após o transplante renal na histomorfometria de biópsias ósseas transilíacas e na densidade mineral óssea, avaliada por DXA e HR-pQCT.

Estudos anteriores demonstraram uma rápida perda de massa óssea, especialmente durante os primeiros seis a doze meses após o transplante, nas regiões ricas em osso trabecular ^{11,52,53}. Nós não observamos esta grande perda óssea durante o primeiro ano de transplante, possivelmente pelo menor uso de corticoides nos esquemas imunossupressores mais atuais e pela suplementação de vitamina D dada para todos os pacientes. De fato, os estudos mais recentes e os em que os corticoides foram retirados rapidamente após o transplante demonstraram estabilização ou aumento na DMO na coluna lombar ou quadril ^{54,55}. No estudo de Bonani e colaboradores, que avaliou a eficácia do denosumabe na prevenção da perda óssea no primeiro ano após transplante renal, a DMO da coluna lombar aumentou 4,6% no grupo intervenção e diminuiu apenas 0,5% no grupo controle ⁵⁵.

Iyer e colaboradores conduziram um estudo prospectivo e observacional utilizando HR-pQCT para investigar os efeitos do transplante renal sobre o esqueleto durante o primeiro ano de transplante ⁵⁶. Os autores observaram uma deterioração significativa tanto do osso cortical quanto do trabecular, com diminuição na área, espessura e densidade cortical (- 3,9%, - 3,1% e - 2,1%, respectivamente), e na densidade trabecular (- 4,4%). Essas mudanças foram relacionadas a reduções significativas da estimativa da força ou rigidez óssea e associadas com a gravidade do hiperparatireoidismo pós-transplante e elevação dos marcadores de remodelação óssea. Além disso, os autores observaram que níveis elevados de marcadores de formação e reabsorção óssea estiveram relacionados com maiores reduções na área, densidade e espessura cortical, tanto no rádio distal quanto na tíbia ⁵⁶. A porosidade cortical também aumenta significativamente após o transplante renal, e este aumento está relacionado com marcadores de formação e reabsorção óssea, principalmente no

rádio ⁵⁷. Nós observamos uma redução na densidade trabecular em ambos os grupos. No grupo que recebeu ácido zoledrônico houve um aumento na densidade cortical. Especulamos que a perda de osso trabecular foi associada principalmente aos corticoides, e a melhora cortical à resolução dos efeitos do hiperparatireoidismo, mais evidente nos pacientes que recebem bisfosfonatos. A redução nos marcadores de remodelação óssea foi semelhante em ambos os grupos. As alterações observadas foram mais evidentes no rádio do que na tíbia, podendo ser explicadas pelo efeito protetor da carga de peso sobre a tíbia ⁵⁸.

Bisfosfonatos são análogos estruturais do pirofosfato inorgânico, uma substância presente nos fluidos corporais que previne calcificação de tecidos moles e exerce uma atividade reguladora na mineralização óssea. Eles acumulam nos locais de reabsorção óssea, onde adentram os osteoclastos e inibem a enzima farnesil-pirofosfato sintase, o que resulta em apoptose dos osteoclastos, portanto inibindo a reabsorção óssea. Eles ligam-se forma potente ao osso mineralizado, com uma meia-vida de até dez anos, e a fração não captada pelo osso (40 – 60%) é excretada por uma combinação de filtração glomerular e secreção tubular ⁵⁹. Portanto, o comprometimento da função do enxerto pode ter efeitos importantes na farmacocinética e meia-vida dos bisfosfonatos. Entretanto, o seu uso é bem tolerado em transplantados renais com TFG > 30 ml/min/1,73m² ⁴¹.

A maioria dos estudos mostra que os bisfosfonatos preservam ou aumentam a DMO na coluna lombar ou colo do fêmur no período pós-transplante precoce ^{31-33,35,40,42,60-62}. O risco de DOA em decorrência do tratamento com bisfosfonatos não tem sido observado de forma consistente. Como exemplo, Coco e colaboradores estudaram o efeito do pamidronato com baixas doses de cálcio e calcitriol na

preservação da massa óssea em seis e doze meses em comparação com placebo. Pamidronato preservou a DMO, mas com um risco elevado de desenvolvimento de DOA. Diferentemente, dados mais recentes do mesmo grupo mostraram que o risedronato não teve o mesmo efeito sobre a DMO e nem foi associado com desenvolvimento de DOA em transplantados renais ^{31,40}. Esta diferença entre os efeitos dos bisfosfonatos pode estar relacionada com diferentes potências nos seus mecanismos de ação ou na atividade supressora enzimática de bisfosfonatos de segunda (pamidronato) e terceira (risedronato) gerações. Nós utilizamos um bisfosfonato de terceira geração e não observamos maior risco de desenvolvimento de DOA.

Em um estudo mais recente, Smerud e colaboradores não mostraram benefícios do ibandronato comparado com suplementação de cálcio e calcitriol na DMO da coluna lombar, mas os pacientes que receberam ibandronato tiveram um aumento modesto da DMO do quadril e antebraço. O ibandronato suprimiu os marcadores de formação óssea, incluindo P1NP, osteocalcina e FAo ⁶³. Este achado contradiz os resultados anteriores, em que os bisfosfonatos pareciam mostrar um benefício na DMO da coluna lombar. Isto provavelmente é pela menor dose de corticoides utilizada neste estudo, além do grupo controle ter recebido suplementação de cálcio e análogos da vitamina D. De fato, em vários estudos em que a suplementação com vitamina D e análogos foi parte do tratamento padrão no grupo controle, não foram observados benefícios com o uso de bisfosfonatos na DMO de transplantados renais. Isto pode explicar em parte os nossos achados, já que nossos pacientes não recebiam uma dose cumulativa tão alta de corticoides e a reposição de vitamina D foi feita para ambos os grupos. Entretanto os bisfosfonatos exerceram um

efeito benéfico sobre o osso cortical. Observamos um aumento da espessura e diminuição da porosidade cortical após um ano, notadamente no grupo que recebeu ácido zoledrônico. Isto pode ser de fundamental importância, pois a superioridade do osso cortical em relação ao trabecular na determinação da resistência óssea já foi demonstrada em diversos estudos anteriormente^{64,65}.

Na era contemporânea de menores taxas de rejeição aguda, menor uso de corticoides e uso difundido de vitamina D e análogos, a perda de osso trabecular já não é tão grande como evidenciada em estudos anteriores, e o uso dos bisfosfonatos para prevenir a perda de massa óssea pode ser questionado. Entretanto, seu perfil de segurança favorável, os benefícios sobre osso cortical e a possibilidade de prevenir fraturas fazem com que ainda haja espaço para esta classe de drogas. Mais estudos são necessários até que o uso profilático de bisfosfonatos seja recomendado para prevenir a perda óssea em receptores de transplante de rim.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

Encontramos significativas correlações negativas entre a Dcomp, medida por HR-pQCT, e a idade, tempo em diálise, PTH e fosfatase alcalina, no rádio distal e tíbia. Houve uma boa concordância entre a tomografia computadorizada periférica quantitativa de alta resolução e a biópsia óssea transilíaca com relação ao compartimento cortical. A Dtrab e o BV/TV, medidos por HR-pQCT, correlacionaram-se com a idade no rádio distal e tíbia, e com os hormônios sexuais, apenas no rádio. No osso trabecular, embora estatisticamente significantes e maiores do que as descritas na população geral, as correlações entre os dois métodos foram apenas de moderada intensidade.

O uso da medicação mostrou-se seguro. Os pacientes não perderam tanta massa óssea quanto era esperado. Houve um aumento da DMO medida por DXA no fêmur total em ambos os grupos. Na coluna lombar apenas nos pacientes que receberam ácido zoledrônico. Por HR-pQCT do rádio, observou-se que esta diferença de DMO em favor do grupo ácido zoledrônico foi evidenciada na região cortical.

A análise histomorfométrica das biópsias ósseas demonstrou uma diminuição na porosidade e aumento da espessura cortical, mais evidente nos pacientes que receberam ácido zoledrônico. Os pacientes do grupo ácido zoledrônico apresentaram supressão dos parâmetros de formação e reabsorção óssea; entretanto, não houve um risco aumentado de desenvolvimento de DOA ou defeito de mineralização, quando comparados com o grupo controle.

Os benefícios observados sobre osso cortical, aliados a um perfil de segurança favorável e à possibilidade de prevenir fraturas, fazem com que ainda haja espaço para o uso dos bisfosfonatos após o transplante renal. Mais estudos são necessários até que o uso profilático de bisfosfonatos seja recomendado para prevenir a perda óssea em receptores de transplante de rim.

7 Anexos

7 ANEXOS**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL****1. NOME:**DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA**1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:** Ácido Zoledrônico para Prevenir a Perda Óssea no Primeiro Ano após o Transplante Renal: Um Estudo Prospectivo e Randomizado.**PESQUISADOR:** Igor Denizarde Bacelar Marques**CARGO/FUNÇÃO:** Médico **INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL** Nº 130.734**UNIDADE DO HCFMUSP:** Serviço de Transplante Renal**3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:**RISCO MÍNIMO ☐RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO x

RISCO MAIOR ☐**4. DURAÇÃO DA PESQUISA :** 4 anos

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

1 – O (A) Sr. (a) ou seu familiar está sendo convidado (a) a participar de um estudo que tem por objetivo analisar o efeito de um medicamento sobre a perda óssea que ocorre após o transplante, um tipo diferente de osteoporose. No primeiro ano após o transplante renal há uma grande perda de massa óssea por efeito dos medicamentos imunossupressores utilizados e da doença óssea adquirida durante o período de diálise. Esta perda de massa óssea é responsável por uma elevada taxa de fraturas, que podem levar a internações, cirurgias e até ao óbito. Pacientes transplantados renais apresentam mais fraturas do que pessoas saudáveis e do que pacientes em diálise. Até o momento não se sabe a melhor maneira de tratar esta forma de osteoporose que ocorre após o transplante, e diferentes medicações têm sido utilizadas com este propósito. Deste modo, o (a) Sr. (a) está sendo convidado a participar de um estudo em que os pacientes receberão vitamina D₃ mais uma medicação chamada ácido zoledrônico, em um grupo, ou apenas vitamina D₃, em outro grupo. O ácido zoledrônico é uma medicação aplicada na veia em dose única na internação do transplante. Esta medicação já é amplamente usada para o tratamento da osteoporose em mulheres após a menopausa. Pacientes do sexo feminino que entrarem no estudo não poderão engravidar, e, assim como para as demais transplantadas no primeiro ano após a cirurgia, serão oferecidos métodos anticoncepcionais e as devidas orientações a respeito. Coletaremos 10 a 20 ml de sangue de uma veia do antebraço e cerca de 10 ml de urina, além das coletas habituais já realizadas, 1 vez por mês durante 1 ano. Iremos também realizar biópsia óssea, ou seja, a retirada de um pequeno fragmento ósseo para melhor entendimento e determinação do seu quadro metabólico ósseo, no momento do transplante e após 1 ano. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo.

2 – O procedimento não rotineiro a ser realizado será a medicação comentada acima, infundida em uma veia periférica em dose única, durante a internação do transplante. Coletas adicionais de sangue e urina serão realizadas conforme descritas acima. Serão realizados exames de densitometria óssea e tomografia. Estes exames não são invasivos. Não haverá malefício para o (a) Sr. (a). A realização de biópsia óssea é um procedimento recomendado para pacientes que irão receber tratamento para prevenir a osteoporose após o transplante.

3 – Coletas adicionais de sangue e urina serão realizadas (além das que já são realizadas rotineiramente no transplante) conforme descritas acima, uma quantidade pequena, em uma veia periférica. Não haverá prejuízos para o (a) Sr. (a).

- 4 – O único procedimento considerado de risco para o (a) Sr. (a) é a biópsia óssea, sendo de risco baixo para complicações, podendo raramente ocorrer sangramento ou dor no local da retirada do fragmento ósseo. No entanto, este exame é necessário para avaliarmos a situação do seu tecido ósseo antes e após o tratamento.
- 5 – Este medicamento pode ajudar a prevenir a perda óssea que sabidamente ocorre após o transplante renal, evitando o surgimento de fraturas e todas as suas consequências ruins.
- 6 – Não há procedimentos alternativos para o(a) Sr. (a).
- 7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Igor Denizarde Bacelar Marques, que pode ser encontrado no 7º andar do Instituto Central do HCFMUSP, Departamento de Pesquisa Clínica do Serviço de Transplante Renal ou pelos telefones (11) 2661 8089 ou (11) 8775 8406. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br
- 8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.
- 09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.
- 10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.
- 11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Caso sejam necessárias consultas ou realização de exames fora dos dias de seguimento rotineiro, as despesas com transporte e alimentação serão reembolsadas.
- 12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Este material coletado será utilizado apenas para a realização desta pesquisa.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Ácido Zoledrônico para Prevenir a Perda Óssea no Primeiro Ano após o Transplante Renal: Um Estudo Prospectivo e Randomizado”.

Eu discuti com o Dr. Igor Denizarde Bacelar Marques sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

8 Referências

8 REFERÊNCIAS

1. Malluche HH, Monier-Faugere MC, Herberth J. Bone disease after renal transplantation. *Nat Rev Nephrol.* 2010;6(1):32-40.
2. Huang M, Sprague SM. Bone disease in kidney transplant patients. *Semin Nephrol.* 2009;29(2):166-73.
3. Kulak CA, Borba VZ, Kulak Júnior J, Custódio MR. Bone disease after transplantation: osteoporosis and fractures risk. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014;58(5):484-92.
4. Kulak CA, Borba VZ, Kulak J, Custódio MR. Osteoporosis after transplantation. *Curr Osteoporos Rep.* 2012;10(1):48-55.
5. Mitterbauer C, Oberbauer R. Bone disease after kidney transplantation. *Transpl Int.* 2008;21(7):615-24.
6. Sprague SM, Josephson MA. Bone disease after kidney transplantation. *Semin Nephrol.* 2004;24(1):82-90.
7. Kawarazaki H, Shibagaki Y, Fukumoto S, Kido R, Ando K, Nakajima I, Fuchinoue S, Fujita T, Fukahawa M, Teraoka S. Natural history of mineral and bone disorders after living-donor kidney transplantation: a one-year prospective observational study. *Ther Apher Dial.* 2011;15(5):481-7.
8. Bouqueneau A, Salam S, Delanaye P, Eastell R, Khwaja A. Bone disease after kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016 Feb 15.

9. Rojas E, Carlini RG, Clesca P, Arminio A, Suniaga O, De Elguezabal K, Weisinger JR, Hruska KA, Bellorin-Font E. The pathogenesis of osteodystrophy after renal transplantation as detected by early alterations in bone remodeling. *Kidney Int.* 2003;63(5):1915-23.
10. Monier-Faugere MC, Mawad H, Qi Q, Friedler RM, Malluche HH. High prevalence of low bone turnover and occurrence of osteomalacia after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(6):1093-9.
11. Julian BA, Laskow DA, Dubovsky J, Dubovsky EV, Curtis JJ, Quarles LD. Rapid loss of vertebral mineral density after renal transplantation. *N Engl J Med.* 1991;325(8):544-50.
12. Brandenburg VM, Politt D, Ketteler M, Fassbender WJ, Heussen N, Westenfeld R, Freuding T, Floege J, Ittel TH. Early rapid loss followed by long-term consolidation characterizes the development of lumbar bone mineral density after kidney transplantation. *Transplantation.* 2004;77(10):1566-71.
13. Grotz WH, Mundinger FA, Gugel B, Exner V, Kirste G, Schollmeyer PJ. Bone fracture and osteodensitometry with dual energy X-ray absorptiometry in kidney transplant recipients. *Transplantation.* 1994;58(8):912-5.
14. Abbott KC, Oglesby RJ, Hypolite IO, Kirk AD, Ko CW, Welch PG, Agodoa LY, Duncan WE. Hospitalizations for fractures after renal transplantation in the United States. *Ann Epidemiol.* 2001;11(7): 450-7.
15. Vautour LM, Melton LJ, Clarke BL, Achenbach SJ, Oberg AL, McCarthy JT. Long-term fracture risk following renal transplantation: a population-based study. *Osteoporos Int.* 2004;15(2):160-7.

16. Chiu MY, Sprague SM, Bruce DS, Woodle ES, Thistlethwaite JR, Josephson MA. Analysis of fracture prevalence in kidney-pancreas allograft recipients. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9(4):677-83.
17. Nisbeth U, Lindh E, Ljunghall S, Backman U, Fellström B. Increased fracture rate in diabetes mellitus and females after renal transplantation. *Transplantation*. 1999;67(9):1218-22.
18. Naylor KL, Jamal SA, Zou G, McArthur E, Lam NN, Leslie WD, Hodsman AB, Kim SJ, Knoll GA, Fraser LA, Adachi JD, Garg AX. Fracture incidence in adult kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2016;100(1):167-75.
19. Nitsch D, Mylne A, Roderick PJ, Smeeth L, Hubbard R, Fletcher A. Chronic kidney disease and hip fracture-related mortality in older people in the UK. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(5):1539-44.
20. Coco M, Rush H. Increased incidence of hip fractures in dialysis patients with low serum parathyroid hormone. *Am J Kidney Dis*. 2000;36(6):1115-21.
21. Weisinger JR, Carlini RG, Rojas E, Bellorin-Font E. Bone disease after renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006;1(6):1300-13.
22. Ladd AJ, Kinney JH, Haupt DL, Goldstein SA. Finite-element modeling of trabecular bone: comparison with mechanical testing and determination of tissue modulus. *J Orthop Res*. 1998;16(5):622-8.
23. Dalzell N, Kaptoge S, Morris N, Berthier A, Koller B, Braak L, van Rietberger B, Reeve J. Bone micro-architecture and determinants of strength in the radius and tibia: age-related changes in a population-based study of normal adults measured with high-resolution pQCT. *Osteoporos Int*. 2009;20(10):1683-94.

24. Cohen A, Dempster DW, Müller R, Guo XE, Nicholas TL, Liu XS, Zhang XH, Wirth AJ, van Lenthe GH, Kohler T, McMahon DJ, Zhou H, Rubin MR, Bilezikian JP, Lappe JM, Recker RR, Shane E. Assessment of trabecular and cortical architecture and mechanical competence of bone by high-resolution peripheral computed tomography: comparison with transiliac bone biopsy. *Osteoporos Int.* 2010;21(2):263-73.
25. Negri AL, Del Valle EE, Zanchetta MB, Nobaru M, Silveira F, Puddu M, Barone R, Bogado CE, Zanchetta JR. Evaluation of bone microarchitecture by high-resolution peripheral quantitative computed tomography (HR-pQCT) in hemodialysis patients. *Osteoporos Int.* 2012; 23(10):2543-50.
26. Nickolas TL, Stein E, Cohen A, Thomas V, Staron RB, McMahon DJ, Leonard MB, Shane E. Bone mass and microarchitecture in CKD patients with fracture. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(8):1371-80.
27. Lyles KW, Colón-Emeric CS, Magaziner JS, Adachi JD, Pieper CF, Mautalen C, Hyldstrup L, Recknor C, Nordsletten L, Moore KA, Lavecchia C, Zhang J, Mesenbrink P, Hodgson PK, Abrams K, Orloff JJ, Horowitz Z, Eriksen EF, Boonen S; HORIZON Recurrent Fracture Trial. Zoledronic acid and clinical fractures and mortality after hip fracture. *N Engl J Med.* 2007;357(18):1799-809.
28. Grey A, Bolland MJ, Wattie D, Horne A, Gamble G, Reid IR. The antiresorptive effects of a single dose of zoledronate persist for two years: a randomized, placebo-controlled trial in osteopenic postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(2):538-44.

29. Black DM, Delmas PD, Eastell R, Reid IR, Boonen S, Cauley JA, Cosman F, Lakatos P, Leung PC, Man Z, Mautalen C, Mesenbrink P, Hu H, Caminis J, Tong K, Rosario-Jansen T, Krasnow J, Hue TF, Sellmeyer D, Eriksen EF, Cummings SR; HORIZON Pivotal Fracture Trial. Once-yearly zoledronic acid for treatment of postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med.* 2007; 356(18): 1809-22.
30. El-Agroudy AE, El-Husseini AA, El-Sayed M, Mohsen T, Ghoneim MA. A prospective randomized study for prevention of postrenal transplantation bone loss. *Kidney Int.* 2005;67(5):2039-2045.
31. Coco M, Glicklich D, Faugere MC, Burris L, Bognar I, Durkin P, Tellis V, Greenstein S, Schechner R, Figueroa K, McDonough P, Wang G, Malluche H. Prevention of bone loss in renal transplant recipients: a prospective, randomized trial of intravenous pamidronate. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(10):2669-76.
32. Haas M, Leko-Mohr Z, Roschger P, Kletzmayer J, Schwarz C, Mitterbauer C, Steininger R, Grampp S, Klaushofer K, Delling G, Oberbauer R. Zoledronic acid to prevent bone loss in the first 6 months after renal transplantation. *Kidney Int.* 2003; 63(3):1130-6.
33. Schwarz C, Mitterbauer C, Heinze G, Woloszczuk W, Haas M, Oberbauer R. Nonsustained effect of short-term bisphosphonate therapy on bone turnover three years after renal transplantation. *Kidney Int.* 2004;65(1):304-9.
34. Mainra R, Elder GJ. Individualized therapy to prevent bone mineral density loss after kidney and kidney-pancreas transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5(1):117-124.

35. Walsh SB, Altmann P, Pattison J, Wilkie M, Yaqoob MM, Dudley C, Cockwell P, Sweny P, Banks LM, Hall-Craggs M, Noonan K, Andrews C, Cunningham J. Effect of pamidronate on bone loss after kidney transplantation: a randomized trial. *Am J Kidney Dis*. 2009; 53(5):856-65.
36. Wang Z, Han Z, Tao J, et al. Clinical efficacy and safety of pamidronate therapy on bone mass density in early post-renal transplant period: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One*. 2014;9(9):e108106.
37. Ebeling PR. Approach to the patient with transplantation-related bone loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(5):1483-90.
38. Conley E, Muth B, Samaniego M, Lotfi M, Voss B, Armbrust M, Pirsch J, Djamalo A. Bisphosphonates and bone fractures in long-term kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2008;86(2):231-7.
39. Copley JB, Wüthrich RP. Therapeutic management of post-kidney transplant hyperparathyroidism. *Clin Transplant*. 2011;25(1):24-39.
40. Coco M, Pullman J, Cohen HW, Lee S, Shapiro C, Solorzano C, Greenstein S, Glicklich D. Effect of risedronate on bone in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(8):1426-37.
41. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl*. 2009(113):S1-130.
42. Grotz W, Nagel C, Poeschel D, Cybulla M, Petersen KG, Uhl M, Strey C, Kirste G, Olschewski M, Reichelt A, Rump LC. Effect of ibandronate on bone loss and renal function after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(7): 1530-7.

-
43. Dos Reis LM, Batalha JR, Muñoz DR, Borelli A, Correa PH, Carvalho AB, Jorgetti V. Brazilian normal static bone histomorphometry: effects of age, sex, and race. *J Bone Miner Metab.* 2007; 25(6):400-6.
 44. Ott SM. Bone histomorphometry in renal osteodystrophy. *Semin Nephrol.* 2009;29(2):122-32.
 45. Malluche HH, Mawad HW, Monier-Faugere MC. Renal osteodystrophy in the first decade of the new millennium: analysis of 630 bone biopsies in black and white patients. *J Bone Miner Res.* 2011;26(6):1368-76.
 46. Goldenstein PT, Jamal SA, Moysés RM. Fractures in chronic kidney disease: pursuing the best screening and management. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2015;24(4):317-23.
 47. Trombetti A, Stoermann C, Chevalley T, Van Rietbergen B, Herrmann FR, Martin PY, Rizzoli R. Alterations of bone microstructure and strength in end-stage renal failure. *Osteoporos Int.* 2013;24(5):1721-32.
 48. Bacchetta J, Boutroy S, Vilayphiou N, Juillard L, Guebre-Egziabher F, Rognant N, Sornay-Rendu E, Szulc P, Laville M, Delmas PD, Fouque D, Chapurlat R. Early impairment of trabecular microarchitecture assessed with HR-pQCT in patients with stage II-IV chronic kidney disease. *J Bone Miner Res.* 2010;25(4):849-57.
 49. Nickolas TL, Stein EM, Dworakowski E, Nishiyama KK, Komandah-Kosseh M, Zhang CA, McMahon DJ, Liu XS, Boutroy S, Cremers S, Shane E. Rapid cortical bone loss in patients with chronic kidney disease. *J Bone Miner Res.* 2013;28(8):1811-20.

-
50. Cejka D, Patsch JM, Weber M, Diarra D, Riegersperger M, Kikic Z, Krestan C, Schueller-Weidekamm C, Kainberger F, Haas M. Bone microarchitecture in hemodialysis patients assessed by HR-pQCT. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(9):2264-71.
 51. Pereira RC, Bischoff DS, Yamaguchi D, Salusky IB, Wesseling-Perry K. Micro-CT in the assessment of pediatric renal osteodystrophy by bone histomorphometry. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015 Dec 28. pii.
 52. Horber FF, Casez JP, Steiger U, Czerniak A, Montandon A, Jaeger P. Changes in bone mass early after kidney transplantation. *J Bone Miner Res*. 1994;9(1):1-9.
 53. Masse M, Girardin C, Ouimet D, Dandavino R, Boucher A, Nadore F, Hébert MJ, Leblanc M, Pichette V. Initial bone loss in kidney transplant recipients: a prospective study. *Transplant Proc*. 2001;33(1-2):1211.
 54. ter Meulen CG, van Riemsdijk I, Hené RJ, Christiaans MH, Borm GF, Corstens FH, van Gelder T, Hilbrands LB, Weimar W, Hoitsma AJ. No important influence of limited steroid exposure on bone mass during the first year after renal transplantation: a prospective, randomized, multicenter study. *Transplantation*. 2004;78(1):101-6.
 55. Bonani M, Frey D, Brockmann J, Fehr T, Mueller TF, Saleh L, von Eckardstein A, Graf N, Wüthrich RP. Effect of twice-yearly denosumab on prevention of bone mineral density loss in de novo kidney transplant recipients: a randomized controlled trial. *Am J Transplant*. 2015 Dec 29.
 56. Iyer SP, Nikkel LE, Nishiyama KK, Dworakowski E, Cremers S, Zhang C, McMahon DJ, Boutroy S, Liu XS, Ratner LE, Cohen DJ, Guo XE, Shane E, Nickolas TL. Kidney transplantation with early corticosteroid withdrawal: paradoxical effects at the central and peripheral skeleton. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(6):1331-41.

-
57. Nishiyama KK, Pauchard Y, Nikkel LE, Iyer S, Zhang C, McMahon DJ, Cohen D, Boyd SK, Shane E, Nickolas TL. Longitudinal HR-pQCT and image registration detects endocortical bone loss in kidney transplantation patients. *J Bone Miner Res.* 2015;30(3):554-61.
58. Meadows TH, Bronk JT, Chao YS, Kelly PJ. Effect of weight-bearing on healing of cortical defects in the canine tibia. *J Bone Joint Surg Am.* 1990;72(7):1074-80.
59. Russell RG, Watts NB, Ebetino FH, Rogers MJ. Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int.* 2008;19(6):733-59.
60. Jeffery JR, Leslie WD, Karpinski ME, Nickerson PW, Rush DN. Prevalence and treatment of decreased bone density in renal transplant recipients: a randomized prospective trial of calcitriol versus alendronate. *Transplantation.* 2003;76(10):1498-502.
61. Torregrosa JV, Fuster D, Gentil MA, Marcen R, Guirado L, Zarraga S, Bravo J, Burgos D, Monegal A, Muxí A, García S. Open-label trial: effect of weekly risedronate immediately after transplantation in kidney recipients. *Transplantation.* 2010;89(12):1476-81.
62. Torregrosa JV, Fuster D, Monegal A, Gentil MA, Bravo J, Guirado L, Muxí A, Cubero J. Efficacy of low doses of pamidronate in osteopenic patients administered in the early post-renal transplant. *Osteoporos Int.* 2011;22(1):281-7.
63. Smerud KT, Dolgos S, Olsen IC, Åsberg A, Sagedal S, Reisæter AV, Midtvedt K, Pfeffer P, Ueland T, Godang K, Bollerslev J, Hartmann A. A 1-year randomized, double-blind, placebo-controlled study of intravenous ibandronate on bone loss following renal transplantation. *Am J Transplant.* 2012;12(12):3316-25.

64. Augat P, Reeb H, Claes LE. Prediction of fracture load at different skeletal sites by geometric properties of the cortical shell. *J Bone Miner Res.* 1996;11(9):1356-63.
65. Pistoia W, van Rietbergen B, Regsegger P. Mechanical consequences of different scenarios for simulated bone atrophy and recovery in the distal radius. *Bone.* 2003;33(6):937-45.

9 Apêndice

Artigo submetido ao Clinical Journal of the American Society of Nephrology

**Biopsy vs. peripheral computed tomography to assess bone disease in CKD
patients: differences and similarities**

Igor Denizarde Bacelar Marques¹, Maria Júlia Correia Lima Nepomuceno Araújo^{1,2},
Fabiana Giorgetti Gracioli², Luciene Machado dos Reis², Sophie A Jamal, Rosa
Maria Pereira³, Melani Ribeiro Custódio^{1,2}, Vanda Jorgetti², Rosilene Motta Elias²,
Elias David-Neto¹, Rosa Maria Affonso Moysés^{2,4}

¹Renal Transplant Service, Hospital das Clínicas, University of São Paulo School of
Medicine, São Paulo, Brazil ²Nephrology Division, Hospital das Clínicas,
University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil, ³Rheumatology
Division, Hospital das Clínicas, University of São Paulo School of Medicine, São
Paulo, Brazil and ⁴Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, Brazil.

Corresponding author:

Igor Denizarde Bacelar Marques, MD
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 255
Hospital das Clínicas – Instituto Central – sala 7036
São Paulo – SP – Brazil ZIP code 05403-000
Phone: +55 11 26618089 FAX: + 55 1126617238

igordenizarde@usp.br

Running Title: Biopsy vs. peripheral computed tomography to assess bone disease
in CKD

Key words: HR-pQCT, DXA, Bone biopsy, chronic kidney disease

Abstract

Background and objectives: High-resolution peripheral quantitative computed tomography (HR-pQCT) is a noninvasive imaging technique that assesses trabecular and cortical bone microarchitecture at the distal radius and tibia. The *in vivo* comparison between parameters obtained from HR-pQCT and from the gold standard bone histomorphometry in dialysis patients has never been tested.

Design, setting, participants, & measurements: HR-pQCT and dual energy x-ray absorptiometry (DXA) were performed in 31 CKD patients. Biopsies were analyzed by quantitative histomorphometry, and classified according to TMV.

Results: We found an inverse correlation between cortical density measured by HR-pQCT at both radius and tibia, with age, time on dialysis, PTH and bone alkaline phosphatase. When comparing HR-pQCT and transiliac bone biopsy we found a relevant agreement in cortical, but not in trabecular compartment. In respect to TMV, there was no correlation on the mineralization status while comparing methods. Trabecular volume correlated with bone mineral density by DXA, whereas cortical porosity correlated with HR-pQCT parameters.

Conclusions: HR-pQCT did not provide exact information of bone biopsy on the TMV status. Therefore, reliable information on TMV status to guide therapy should still be obtained from bone biopsy. Nevertheless, the agreement between HR-pQCT and bone biopsy in cortical compartment assessment, which deterioration can predict fracture, may point to a new perspective on the fracture risk assessment in CKD patients.

Introduction

Bone disease is a major complication of chronic kidney disease (CKD) [1]. Among all bone disorders in patients with CKD, fracture is the most important clinical outcome, as can lead to higher morbidity and mortality [2-4]. However, there is no current consensus on the best method to assess fracture risk in CKD [5, 6]. Although it has never been tested to predict fracture, bone histomorphometry gives information on bone volume, turnover and mineralization, and it is considered a gold standard method to evaluate bone disease. Since acquisition of iliac crest biopsies is invasive, time-consuming and expensive, there is great interest in noninvasive imaging techniques that permits assessment of bone microstructure *in vivo*.

Areal bone mineral density (BMD) measured by dual energy X-ray absorptiometry (DXA) is the presently accepted method for bone mass determination and for fracture risk prediction in the general [7] as well as in the CKD population [8-12]. Because bone strength is also determined by decreased bone quality due to microarchitectural deterioration, it has been suggested that *in vivo* bone microarchitecture assessment may improve fracture risk prediction and the ability to monitor the response to therapeutic interventions. A new noninvasive technique, high-resolution peripheral quantitative computed tomography of the radius and tibia (HR-pQCT), yields 3D images of sufficiently high resolution (~82 microns) to visualize trabecular microstructure that previously could be assessed only on bone biopsy samples.

However, technical aspects of acquiring the measurements differ among the bone biopsy, DXA and HR-pQCT. Of note, the resolution of HR-pQCT is in the range of trabecular dimensions, which in particular, is limited in visualizing

individual trabeculae. So far, few studies have evaluated bone microarchitecture of CKD patients using HR-pQCT [13, 14]. In addition, studies that have compared HR-pQCT and bone histomorphometry were done applying these methods in the same bone biopsy in the general population [15] and in the CKD population [16, 17]. Nonetheless, an in vivo comparison among these techniques is still pending. Such a study would provide precious information more closely to that expected in the real life, where a non-invasive method would be capable of replacing the bone biopsy. Here, we evaluated, for the first time, the correlation between the microarchitectural variables obtained by HR-pQCT and transiliac bone biopsy in CKD patients.

Methods

Study subjects

We studied 31 CKD patients who had a percutaneous transiliac bone biopsy, BMD by DXA and HR-pQCT scans of the radius and tibia, during the course of their participation in one research protocol (ClinicalTrials.gov identifier NCT01675089). To be selected for this study, in addition to give their informed consent to participate, patients should be adults (>18 years of age), without previous kidney transplant or parathyroidectomy.

Biochemical determinations

Blood samples were collected in a fasting state and immediately before bone biopsy. The samples were centrifuged, aliquotted in cryovials, and stored at -80°C. Serum levels of calcium (reference range (RR): 8.6-10.2 mg/dl) and phosphate (RR: 2.7–4.5

mg/dl) were determined using routine laboratory techniques. Serum iPTH (RR: 10–65 pg/ml) was measured using a chemiluminescence assay (DPC; Medlab, San Antonio, TX, USA). Serum 25(OH) vitamin D (RR: 30–100 ng/dl; insufficiency < 30 ng/dl and deficiency < 15 ng/dl) was measured using a radioimmunoassay (DiaSorin, Stillwater, MN, USA). Bone alkaline phosphatase (BAP; RR: 11.6–42.7 U/L) and tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b (TRAP5b; RR: 1.5–5.8 U/L) were measured using an enzyme immunoassay (Metra Biosystem, Mountain View, CA, USA). Serum sclerostin (RR: 0.42–0.80 ng/ml) was measured using an enzyme immunoassay (Quidel Corporation-TECO medical Group).

Transiliac bone biopsy and histomorphometry

All patients were submitted to a transiliac bone biopsy using a 7-mm Bordier trephine after a course of double-labeling tetracycline (20 mg/kg/day) for 3 days, separated by an interval of 10 days. The biopsy was performed 2–5 days after the last dose of antibiotics. Undercalcified bone fragments were submitted to standard processing for histological studies. Bone histomorphometry was analyzed using a semiautomatic technique in the Osteomeasure software (Osteometrics, Atlanta, GA, USA). The static and dynamic parameters were examined according to the standards established by the American Society of Bone and Mineral Research [18]. The RRs used for static parameters, including trabecular bone volume (2D BV/TV) and mineralized bone volume (MdV/TV) were obtained from our normal laboratory controls [19], whereas the ranges for the dynamic parameters were the same as those described elsewhere [20]. Renal osteodystrophy (ROD) was classified into one of the classical types according to the following criteria: (1) osteitis fibrosa (OF), defined as

bone formation rate, as well as either osteoblast surface (Ob.S/BS) or osteoclast surface (Oc.S/BS) > s.d. above the normal range, osteoid volume (OV/BV) within or above the normal range, and marrow fibrosis (Fb.V) > 0.5%; (2) Adynamic bone disease (ABD), defined as bone formation rate (BFR/BS) and OV/BV > 1 s.d. below the normal range and Fb.V < 0.5%; (3) osteomalacia, defined as BFR/BS > 1 s.d. below the normal range and OV/BV > 1 s.d. above the normal range; and (4) mixed uremic osteodystrophy, defined as BFR/BS and OV/BV > 1 s.d. above the normal range and Fb.V > 0.5%, and mineralization lag time (Mlt) > 50 days. Thereafter, bone histology was categorized according to the TMV classification [21]. OF and mixed uremic osteodystrophy was considered high-turnover diseases, whereas osteomalacia and ABD were considered low turnover diseases. Cortical thickness (Ct.Th) was considered as low, normal or high when values were below 0.52 mm, between 0.52 and 1.75 mm, and above 1.65 mm, respectively. A low, normal and high cortical porosity (Ct.Po) was considered when values were below 1.9%, between 1.9% and 10%, and above 10%, respectively [22].

Measurement of BMD by DXA

BMD by DXA was measured at the lumbar spine and total femur femoral using a lunar prodigy densitometer using the standard densitometry protocols and analysis software provided by the manufacturer. Bone density was expressed in terms of T-score for comparisons of subjects with young-normal population; osteoporosis was defined as a T-score ≤ -2.5 . In our laboratory, short-term *in vivo* precision is 2.3% for the lumbar spine and 2.6% for the total femur.

HR-pQCT imaging of the radius and tibia

Volumetric BMD and microarchitecture were measured at the distal radius of the non-dominant forearm and distal tibia of non-dominant leg using a three-dimensional HR-pQCT system (XtremeCT; Scanco Medical AG, Bassersdorf, Switzerland) by a specialized densitometry technologist in our laboratory. HR-pQCT of the dominant limb was performed when there was a previous fracture or an arteriovenous fistula or graft in the non-dominant limb. The forearm or leg of the subject was positioned in the scanner and was immobilized during the examination in an anatomically formed carbon fiber shell. The outcome variables used in our analyses included volumetric bone density [mg hydroxyapatite (HA)]/cm³ for entire (Dt_{tot}), trabecular (Dt_{trab}), and cortical (Dt_{comp}) regions; cortical thickness (millimeter); and trabecular bone volume fraction (BV/TV, percentage), thickness (TbTh, millimeter), number (TbN, per millimeter) and separation (TbSp, millimeter). As a reference range for HR-pQCT has not been established for normal Brazilian population, we have applied as a normal range, data obtained by Negri et al [13].

Statistical analysis

Continuous variables are expressed as means and standard deviations (for variables with a normal distribution) or as medians and interquartile ranges (for variables with a skewed distribution). Discrete variables are expressed as percentages. We used the unpaired Student's t-test to compare continuous variables, the Mann-Whitney U test to compare continuous variables with a non-normal distribution, and the chi-square or Fisher's exact test to compare proportions. Spearman correlation analyses were

conducted to investigate relationships between variables. All statistical tests were two-tailed, and the threshold of statistical significance was established at $P < .05$. We performed statistical analyses with the Statistical Package for the Social Sciences, version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Clinical and Biochemical Characteristics

As shown in Table 1, our patients were young, most likely to be men and Caucasian. Their dialysis vintage was relatively short, and almost half of them (48%) were in dialysis for less than 2 years. Serum PTH was lower than recommended by KDIGO guidelines in 2 patients (6.5%) and above accepted range in 16 (52%). Bone remodeling markers, BAP and TRAP5b were elevated. Vitamin D insufficiency and deficiency were found in 16 (51.6%) and 5 patients (16.1%), respectively. Serum sclerostin was above normal range in 17 patients (54.8%).

Bone Histomorphometry

Trabecular and cortical structural and dynamic remodeling parameters assessed at the iliac crest by 2D quantitative histomorphometry are shown in Table 2. Low 2D BV/TV was detected in 4 patients (13%) while was elevated in 7 patients (23%). Twenty patients (64%) presented a mineralization defect. High turnover bone disease was observed in 20 patients (64.5%), of whom 14 (45.2%) had mixed uremic osteodystrophy and 6 (19.3%) had OF. Six patients (19.3%) had osteomalacia, and 5 (16.2%) had ABD.

DXA

Mean values of lumbar spine and total femur areal BMD by DXA are presented in Table 2. Osteoporosis was found in 8 patients (26%), with 6 in lumbar spine and 3 in total femur. Out of these 8 patients, only 2 presented low 2D BV/TV.

HR-pQCT

Trabecular and cortical microstructural parameters (assessed at the tibia and radius) are shown in Table 2. In comparison with normal controls, we found no significant difference in tibia parameters. However, our patients presented lower cortical density in radius ($p = 0.023$).

We found an inverse correlation between cortical density measured by HR-pQCT in both radius and tibia, with age, PTH, bone alkaline phosphatase and TRAP5b, as shown in Figure 1. The trabecular density at tibia and radius correlated with age and BMD at lumbar spine and total femur (Figure 2).

As shown in Figure 3, trabecular density at the radius also correlated significantly with BV/TV, Md.V/TV and OS/BS. Curiously, we found significant correlations between histomorphometric parameters of bone remodeling with cortical, but not with trabecular density at the radius (Table 3). Similar, but less significant correlations were found for Dcomp at the tibia. Trabecular density at the tibia did not correlate with any histomorphometric parameter from bone biopsy. We further analyzed the correlations between TMV parameters obtained from bone biopsy (BFR, Mlt, BV/TV and Ct.Po, respectively) with biochemical variables and also with DXA- and HR-pQCT-corresponding covariates. Results of Spearman's coefficients for the significant correlations are described in Table 4. We found no correlation between parameters of mineralization obtained from these methods.

Discussion

To our Knowledge, this is the first study that has evaluated the extent to which trabecular and cortical microarchitectural variables measured by HR-pQCT of the distal radius and tibia reflect those assessed by 2D histomorphometry of the iliac crest bone biopsy, in CKD patients. In a group of 31 patients with assorted CKD etiologies, and with a broad range of ages, bone density measurements, and microarchitectural features, we found that HR-pQCT measures are correlated with 2D BV/TV parameters on anterior iliac crest biopsy. While these correlations are statistically significant and superior than that described for the general population, they were modest, indicating that HRpQCT cannot be used to predict trabecular bone volume assessed by bone biopsy.

Quantitative histomorphometry of transiliac crest bone biopsies is an invaluable tool for the study of dynamic indices of bone remodeling. Additionally, it has long been considered the “gold standard” for evaluating bone microarchitecture. Over the past three decades, it has provided fundamental information about bone microarchitecture in a number of important metabolic bone diseases, including postmenopausal osteoporosis, primary hyperparathyroidism and renal osteodystrophy. With the recent introduction of high-resolution 3D in vivo imaging techniques such as micro-magnetic-resonance imaging and HR-pQCT, it is now possible to assess trabecular microarchitecture noninvasively, at clinically relevant weight-bearing and non-weight-bearing skeletal sites. In this study, we aimed to determine the degree to which microstructural parameters of peripheral sites assessed by HR-pQCT, would refer to as a “virtual bone biopsy,” and reflect those measured on biopsy specimens from the iliac crest in CKD patients. The fact that our patients

are younger and they were on dialysis for a shorter time than the described by Negri et al. [13] may explain why the current HR-pQCT findings showed less expressive alterations on bone architecture. HR-pQCT studies in hemodialysis patients have shown significant cortical microarchitecture deterioration associated with a reduction in trabecular parameters. In fact, the association between cortical thickness (by HR-pQCT) and fractures in patients with CKD has already been described [14]. In the mentioned study, both cortical area and thickness at tibia and radius correlated with fractures. Negri et al [13] found a marked decrease in cortical density, thickness, and area, accompanied by reductions in trabecular parameters in both men and women. However, these changes correlated with the severity of secondary hyperparathyroidism only in women. A slightly different finding was observed by Cejka et al [23], showing that trabecular instead of cortical thickness was associated with fracture risk, using HR-pQCT in hemodialysis patients.

Importantly, Nickolas et al showed, in a longitudinal study, that CKD patients present a progressive and rapid cortical bone loss, which is associated with PTH and bone turnover markers [24]. In agreement with this result, we found an inverse correlation between cortical density measured by HR-pQCT with age, time on dialysis, PTH, BAP and TRAP5b at the distal radius and tibia. From cortical compartment, we also found significant correlations between parameters obtained from HR-pQCT and from transiliac bone biopsy. It is possible that hyperparathyroidism affects initially the cortical compartment, and this is detected by either noninvasive or invasive techniques. In this respect, the correlations found between cortical density by HR-pQCT and structural parameters obtained from iliac crest biopsies, probably is reflecting the effects of hyperparathyroidism in both

cortical and trabecular bone. Trabecular density at radius and tibia correlated with BMD by DXA in lumbar spine and even in total femur. This finding is somehow unexpected as femur is a predominantly cortical bone and we found no correlation between cortical density and DXA at the femur. However, similar results were described by Amstrup et al. in post-menopausal women [25]

As TMV classification helps guide the therapy for the underlying bone pathology, this is the main focus while comparing different techniques. In an attempt to compare the capability to predict TMV based on one or another method, our results were not encouraging. The correlations observed between bone formation rate with classical bone remodeling markers, such as PTH and BAP were stronger than the observed with HR-pQCT parameters. We did not find any significant correlation between mineralization lag time with either cortical or trabecular density. This finding differed from Pereira et al [16], that showed that bone mineralization may be accurately assessed by microcomputed tomography. Differences in the studied population (children), renal replacement therapy (peritoneal dialysis) and also in the design (not an *in vivo* study) should be considered, however, on an interpretation of these discrepant results. Finally, for trabecular bone volume, our correlations were less impressive, with “r” coefficients as low as 0.4, which is considered weak. The only exception was for the cortical compartment, and particularly the cortical density.

Our study has some limitations. This is a single-center study with a relatively small sample size, and absence of a normal control group. The generalizability of our findings to other centers is limited. Therefore, future studies should be carried out in multiple medical centers with larger number of individuals. Despite this, the present

study has also some strength, as it was the first to compare DXA, bone histomorphometry and HR-pQCT from CKD patients, obtained at real time.

In summary, we showed there is an agreement between HR-pQCT and bone biopsy only for cortical compartment assessment. Knowing that this compartment can predict fractures in patients on CKD, this result is promising. However, in order to establish broader evidence regarding the role of HR-pQCT, a non-invasive technique, as a substitute of the classical bone biopsy, to predict fracture, further studies in a prospective registry will be needed. In addition, HR-pQCT did not provide exact information of bone biopsy on the TMV status. Therefore, reliable information on TMV status, and mainly to guide therapy, should still be obtained from bone biopsy.

Acknowledgments

Operating grant 2011/22962-3 provided by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, supported this work. This work was presented in part at ASN meeting, 2014, Philadelphia, USA. R. Moysés and V. Jorgetti were supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Brazil. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Disclosures

Drs. Moysés and Jorgetti have received honoraria for lectures and are on the speaker's bureau for Amgen. For the remaining authors none was declared.

References

1. Kidney Disease: Improving Global Outcomes CKD-MBDWG (2009) KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl*:S1-130
2. Fusaro M, Gallieni M, Jamal SA (2014) Fractures in chronic kidney disease: neglected, common, and associated with sickness and death. *Kidney Int* 85:20-22
3. Tentori F, McCullough K, Kilpatrick RD, Bradbury BD, Robinson BM, Kerr PG, Pisoni RL (2014) High rates of death and hospitalization follow bone fracture among hemodialysis patients. *Kidney Int* 85:166-173
4. Wakasugi M, Kazama JJ, Narita I (2014) High rates of death and hospitalization follow bone fracture among hemodialysis patients. *Kidney Int* 86:649
5. Goldenstein PT, Jamal SA, Moyses RM (2015) Fractures in chronic kidney disease: pursuing the best screening and management. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 24:317-323
6. Jamal SA, West SL, Miller PD (2012) Fracture risk assessment in patients with chronic kidney disease. *Osteoporos Int* 23:1191-1198
7. Kanis JA, Johnell O, Oden A, Jonsson B, De Laet C, Dawson A (2000) Risk of hip fracture according to the World Health Organization criteria for osteopenia and osteoporosis. *Bone* 27:585-590
8. Iimori S, Mori Y, Akita W, Kuyama T, Takada S, Asai T, Kuwahara M, Sasaki S, Tsukamoto Y (2012) Diagnostic usefulness of bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in predicting fracture in CKD stage 5D patients--a single-center cohort study. *Nephrol Dial Transplant* 27:345-351
9. Jamal S, Cheung AM, West S, Lok C (2012) Bone mineral density by DXA and HR pQCT can discriminate fracture status in men and women with stages 3 to 5 chronic kidney disease. *Osteoporos Int* 23:2805-2813

10. Jamal SA, Nickolas TL (2015) Bone imaging and fracture risk assessment in kidney disease. *Curr Osteoporos Rep* 13:166-172
11. West SL, Lok CE, Langsetmo L, Cheung AM, Szabo E, Pearce D, Fusaro M, Wald R, Weinstein J, Jamal SA (2015) Bone mineral density predicts fractures in chronic kidney disease. *J Bone Miner Res* 30:913-919
12. Yencheek RH, Ix JH, Shlipak MG, Bauer DC, Rianon NJ, Kritchevsky SB, Harris TB, Newman AB, Cauley JA, Fried LF, Health A, Body Composition S (2012) Bone mineral density and fracture risk in older individuals with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 7:1130-1136
13. Negri AL, Del Valle EE, Zanchetta MB, Nobaru M, Silveira F, Puddu M, Barone R, Bogado CE, Zanchetta JR (2012) Evaluation of bone microarchitecture by high-resolution peripheral quantitative computed tomography (HR-pQCT) in hemodialysis patients. *Osteoporos Int* 23:2543-2550
14. Nickolas TL, Stein E, Cohen A, Thomas V, Staron RB, McMahon DJ, Leonard MB, Shane E (2010) Bone mass and microarchitecture in CKD patients with fracture. *J Am Soc Nephrol* 21:1371-1380
15. Cohen A, Dempster DW, Muller R, Guo XE, Nickolas TL, Liu XS, Zhang XH, Wirth AJ, van Lenthe GH, Kohler T, McMahon DJ, Zhou H, Rubin MR, Bilezikian JP, Lappe JM, Recker RR, Shane E (2010) Assessment of trabecular and cortical architecture and mechanical competence of bone by high-resolution peripheral computed tomography: comparison with transiliac bone biopsy. *Osteoporos Int* 21:263-273
16. Pereira RC, Bischoff DS, Yamaguchi D, Salusky IB, Wesseling-Perry K (2015) Micro-CT in the Assessment of Pediatric Renal Osteodystrophy by Bone Histomorphometry. *Clin J Am Soc Nephrol*
17. Tamminen IS, Isaksson H, Aula AS, Honkanen E, Jurvelin JS, Kroger H (2011) Reproducibility and agreement of micro-CT and histomorphometry in human trabecular bone with different metabolic status. *J Bone Miner Metab* 29:442-448
18. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987) Bone histomorphometry: standardization of

- nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2:595-610
19. Dos Reis LM, Batalha JR, Munoz DR, Borelli A, Correa PH, Carvalho AB, Jorgetti V (2007) Brazilian normal static bone histomorphometry: effects of age, sex, and race. *J Bone Miner Metab* 25:400-406
 20. Vedi S, Compston JE, Webb A, Tighe JR (1983) Histomorphometric analysis of dynamic parameters of trabecular bone formation in the iliac crest of normal British subjects. *Metab Bone Dis Relat Res* 5:69-74
 21. Moe S, Drueke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, Ott S, Sprague S, Lameire N, Eknoyan G, Kidney Disease: Improving Global O (2006) Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 69:1945-1953
 22. Malluche HH, Mawad HW, Monier-Faugere MC (2011) Renal osteodystrophy in the first decade of the new millennium: analysis of 630 bone biopsies in black and white patients. *J Bone Miner Res* 26:1368-1376
 23. Cejka D, Weber M, Diarra D, Reiter T, Kainberger F, Haas M (2014) Inverse association between bone microarchitecture assessed by HR-pQCT and coronary artery calcification in patients with end-stage renal disease. *Bone* 64:33-38
 24. Nickolas TL, Stein EM, Dworakowski E, Nishiyama KK, Komandah-Kosse M, Zhang CA, McMahon DJ, Liu XS, Boutroy S, Cremers S, Shane E (2013) Rapid cortical bone loss in patients with chronic kidney disease. *J Bone Miner Res* 28:1811-1820
 25. Amstrup AK, Jakobsen NF, Moser E, Sikjaer T, Mosekilde L, Rejnmark L (2015) Association between bone indices assessed by DXA, HR-pQCT and QCT scans in post-menopausal women. *J Bone Miner Metab*

Table 1. Baseline demographics and biochemical parameters (n=31)

Variable	Values
Age (years)	41 ± 11
Male sex, n (%)	19 (61)
White, n (%)	23 (74)
Dialysis vintage (months)	27 (14, 49)
Renal replacement therapy, n (%)	
Hemodialysis	27 (87)
Peritoneal dialysis	3 (10)
No dialysis	1 (3)
Cause of ESRD, n (%)	
Chronic glomerulonephritis	18 (58)
Nephroangiosclerosis	4 (13)
Diabetic nephropathy	1 (3)
Polycystic kidney disease	2 (6)
Other	2 (6)
Undetermined	3 (10)
BMI (kg/m ²)	24.1 (20.5 - 26.2)
Calcium (mg/dl)	8.4 ± 0.6
Phosphate (mg/dl)	3.4 ± 1.5
PTH (pg/ml)	593 (272 - 1022)
Bone alkaline phosphatase (U/L)	90.4 (37.7-124.8)
TRAP5b (U/L)	9.9 ± 4.4
25 (OH) D (ng/ml)	22 (15 - 34)
Sclerostin (ng/ml)	1.08 (0.51 - 1.79)

Continuous variables are expressed as mean ± SD, or median (interquartile range) as appropriate. ESRD, end-stage renal disease; BMI, body mass index; ESRD, end-stage renal disease; PTH, parathyroid hormone; TRAP5b, tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b.

Table 2. 2D quantitative histomorphometry of transiliac bone biopsies, areal bone mineral density from dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) and high-resolution peripheral quantitative computed tomography (HR-pQCT) parameters

Variable	Values	Normal range	
<i>Bone Histomorphometry</i>		W	M
BV/TV (%)	24.7 ± 6.7	21.8 ± 7.2	24.0 ± 6.1
Md.V/TV (%)	23.3 ± 7	-	
Tb.Sp (µm)	389.8 ± 133.5	498.3 ± 195.9	420.6 ± 124.1
Tb.N (/mm)	2.1 ± 0.5	1.76 ± 0.52	1.89 ± 0.42
Tb.Th (µm)	123.7 ± 26.5	126.0 ± 28.8	127.9 ± 29.7
OV/BV (%)	5.7 (2.2 – 11.3)	1.5 ± 1.9	2.9 ± 2.7
OS/BS (%)	36.4 ± 20.2	9.2 ± 8.4	16.1 ± 12.6
O.Th (µm)	9.6 (6.3 – 12.6)	10.8 ± 3.2	11.7 ± 3.5
Ob.S/BS (%)	7.2 (5.0 – 13.6)	1.2 ± 3.2	1.2 ± 1.4
ES/BS (%)	11.7 ± 6.2	2.3 ± 2.4	1.75 ± 1.21
Oc.S/BS (%)	1.3 (0.6 – 2.9)	0.03 ± 0.06	0.03 ± 0.11
Fb.V/TV (%)	0.22 (0.01 – 1.61)	0	
Ct.Po (%)	6.7 (5.7 – 8.7)	1.9-10	
Ct.Th (µm)	763 (585 – 907)	520-1,650	
MS/BS (%)	6.4 (3.9 – 9.9)	12.0 ± 5.0	18.0 ± 8.0
MAR (µm/day)	1.1 ± 0.4	0.065 ± 0.12	
BFR/BS (µm ³ /µm ² /day)	0.04 (0.01 – 0.1)	0.07 ± 0.03	0.13 ± 0.07
Mlt (days)	71.4 (37.9 – 354.4)	23.7 ± 2.7	21.3 ± 2.3
<i>DXA</i>			
BMD lumbar spine (g/cm ²)	0.93 ± 0.14		
BMD total femur (g/cm ²)	0.84 (0.78 – 0.91)		
<i>HR-pQCT</i>			
Dtot (mg HA/cm ³) Tibia	258.1 ± 61.8	256.8 ± 49.9	
Dcomp (mg HA/cm ³) Tibia	879.1 ± 93.9	859.5 ± 68.1	
Dtrab (mg HA/cm ³) Tibia	132.1 ± 39.1	145.7 ± 37.2	
BV/TV (%)Tibia	11.0 ± 3.2	12.1 ± 3.1	
Dtot (mg HA/cm ³) Radius	273.8 ± 96.9	298.1 ± 64.6	
Dcomp (mg HA/cm ³) Radius	815.1 ± 112.2*	860.1 ± 62.3	
Dtrab (mg HA/cm ³) Radius	166.1 ± 51.4	152.3 ± 37.8	
BV/TV (%) Radius	13.8 ± 4.2	12.7 ± 3.1	

BFR/BS, bone formation rate; BV/TV: trabecular bone volume; ES/BS, eroded surface; Mlt, mineralization lag time; Ob.S/BS, osteoblast surface; Oc.S/BS, osteoclast surface; O.Th, osteoid thickness; OV/BV, osteoid volume; Tb.N, trabecular number; Tb.Sp, trabecular separation; Dcomp, cortical density; Dtrab, trabecular density. * p< 0.05 vs. normal.

Table 3. Spearman's correlation coefficients between cortical density at radius and tibia obtained by high-resolution peripheral quantitative computed tomography (HR-pQCT) with static bone histomorphometric parameters

Variable	Dcomp Radius	Dcomp Tibia
OV/BV	-0.35	-0.36
OS/BS	-0.74	-0.41
O.Th	-0.52	-0.34
Ob.S/BS	-0.78	-0.49
Oc.S/BS	-0.67	-0.36
ES/BS	-0.48	-0.33
Fb.V	-0.66	-0.42
BFR/BS	-0.38	-0.38
Ct.Po	-0.68	-0.62

Dcomp, cortical density; BFR/BS, bone formation rate; ES/BS, eroded surface; Ob.S/BS, osteoblast surface; Oc.S/BS, osteoclast surface; O.Th, osteoid thickness; OV/BV, osteoid volume; Fb.V, marrow fibrosis; Ct.Po, cortical porosity.

Table 4. Spearman's correlation coefficients between turnover and volume parameters with serum biomarkers, dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) and high-resolution peripheral quantitative computed tomography (HR-pQCT) parameters

Variable	Turnover	Volume	
	BFR/BS	Trabecular	Cortical Porosity
Parathyroid hormone	0.60	-	0.78
Bone Alkaline phosphatase	0.61	-	0.53
Serum Sclerostin	-0.40	-	-
BMD spine	-	0.70	-
BMD femur	-	0.59	-
Dtot tibia	-0.41	-	-0.51
Dcomp tibia	-0.39	-	-0.67
Dtrab tibia	-	-	
BV/TV Tibia	-	-	
Dtot radius	-	-	-0.67
Dcomp radius	-0.47	-	-0.74
Dtrab radius	-	0.42	
BV/TV radius	-	0.41	

BMD, bone mineral density; BFR/BS, bone formation rate; BV/TV: bone volume; Dcomp, cortical density; Dtrab, trabecular thickness; BV/TV, trabecular bone volume

Figure Legends

Figure 1. Correlations between cortical density measured by HR-pQCT at both radius and tibia, with age, PTH, bone alkaline phosphatase and TRAP5b.

Figure 2. Correlations between trabecular density, at tibia and radius, with age and BMD, at lumbar spine and total femur.

Figure 3. Correlations between trabecular density with BV/TV and Md.V/TV, and between histomorphometric parameters of bone remodeling with cortical density, at the radius.

Figure 1. Correlations between cortical density measured by HR-pQCT at both radius and tibia, with age, PTH, bone alkaline phosphatase and TRAP5b.

Figure 2. Correlations between trabecular density, at tibia and radius, with age and BMD, at lumbar spine and total femur.

Figure 3. Correlations between trabecular density with BV/TV and Md.V/TV, and between histomorphometric parameters of bone remodeling with cortical density, at the radius.