MELISSA FERNANDA PINHEIRO SANTOS

**Comparação das características clínicas, bioquímicas e
da análise histomorfométrica de biópsias ósseas de
pacientes com doença renal crônica em diálise com e
sem fratura**

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

Programa de Nefrologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Vanda Jorgetti

SÃO PAULO

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Santos, Melissa Fernanda Pinheiro

Comparação das características clínicas, bioquímicas e da análise
histomorfométrica de biópsias ósseas de pacientes com doença renal crônica em diálise
com e sem fratura / Melissa Fernanda Pinheiro Santos. -- São Paulo, 2017.

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

Orientadora: Vanda Jorgetti.

Descritores: 1.Fraturas ósseas 2.Distúrbio do metabolismo mineral 3.Insuficiência
renal crônica 4.Remodelação óssea 5.Histomorfometria 6.Imuno-histoquímica
7.Diálise renal

USP/FM/DBD-214/17

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Médica 16 (LIM-16) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), auxílio regular 2015/13126-8.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Carlos e Dione, que sempre me incentivaram a estudar, sonhar com horizontes muito além do que conseguiram alcançar e aceitaram as minhas escolhas, mesmo quando isso significou a nossa distância física.

Ao meu irmão Erik, por toda a sua ajuda no percorrer desta jornada, desde o início do projeto, até a sua finalização. E ao meu irmão Danilo, que esse trabalho lhe sirva de inspiração para lutar por seus sonhos.

Ao meu esposo, Victor, por todo o apoio, incentivo, companhia nas noites de trabalho e paciência nos meus momentos de crise.

Ao meu amado filho Pedro, **por sempre me receber com o olhar cheio de amor, sorrisos de felicidade pela** minha chegada em casa e renovar a minha força para seguir em frente.

Às amigas Luiza, Adriana, Daiane, Mariana e Maria Tatiana sempre dispostas a me ajudar nas escalas e horários de trabalho.

Ao Dr. Daniel Rinaldi, que me incentivou, ajudou a conhecer a Dra. Vanda Jorgetti e iniciar toda essa jornada.

Agradecimentos

A Deus por acalmar meu coração e me mostrar o caminho nos momentos em que me senti perdida.

Aos colegas e amigos do ambulatório de Doença Mineral Óssea por todo o conhecimento dividido e por tornar as tardes de terça-feira leves e prazerosas.

A Meire, Ivone, Luciene e Wagner por toda a atenção e ajuda essenciais para o desenvolvimento dessa dissertação.

À Dra. Rosa, pelo conhecimento compartilhado a cada caso e artigo discutido.

À Dra. Melani, por toda a sua alegria e incentivo.

E à Dra. Vanda, por ser uma pesquisadora, médica e ser humano inspirador e por compreender todas as minhas limitações pessoais no decorrer desses 6 anos de convivência.

“Felicidade é fertilidade, e para ter fertilidade é preciso ser capaz de
transbordar.

Quando a água é colocada no copo ele se conforma ao copo.

Nós precisamos transbordar, ir além da borda, sermos inconformados com as
amarras que nos contêm, nos aprisionam e nos infelicitam.”

(Mario Sergio Cortella)

Normalização adotada

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

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

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

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

SUMÁRIO

LISTAS DE FIGURAS

LISTAS DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Fratura e doença renal crônica	2
1.1.2 Epidemiologia	2
1.2. Remodelação óssea	5
1.3. Mineralização Óssea	9
1.4. Proteínas Ósseas	11
1.4.1 FGF-23	11
1.4.2 MEPE	11
1.4.3 DMP1.....	13
1.4.4 PHEX.....	13
1.4.5 Esclerostina (SOST)	14
1.5. Classificação da Doença óssea	15
1.6. Osteoporose	16
1.7. Avaliação de massa óssea	16
2. OBJETIVO GERAL	19
2.1. Objetivo secundário	19
3. METODOLOGIA	20
3.1. Pacientes e Métodos	20

3.2. Parâmetros avaliados	20
3.2.1. Clínicos	20
3.2.2. Laboratoriais	20
3.2.3. Histomorfometria Óssea	21
3.2.4. Imunohistoquímica	22
3.3. Análise estatística	24
4. RESULTADOS.....	25
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÕES	42
7. ANEXOS.....	44
8. REFERÊNCIAS.....	50

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma das biopsias ósseas	25
---	----

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos e diluições utilizadas para reação de imunohistoquímica	23
--	----

Tabela 2 – Características clínicas dos pacientes estudados	27
--	----

Tabela 3 – Comparação entre as características laboratoriais dos pacientes com e sem fratura	28
---	----

Tabela 4 – Comparação entre os resultados da análise histomorfométrica no osso trabecular dos pacientes com e sem fratura	29
--	----

Tabela 5 – Comparação entre os resultados da análise histomorfométrica no osso cortical dos pacientes com e sem fratura	30
--	----

Tabela 6 – Comparação entre a expressão das proteínas DMP1, MEPE e SOST no osso cortical e trabecular dos pacientes com e sem fratura.....	31
---	----

Tabela 7 – Correlações dos parâmetros bioquímicos com parâmetros de histomorfometria óssea	32
---	----

Tabela 8 – Correlações da expressão das proteínas MEPE e SOST no osso trabecular e cortical e os parâmetros bioquímicos e de histomorfometria óssea	34
--	----

LISTAS DE ABREVIATURAS

ANK	Proteína anquilose progressiva
ASARM	<i>Acid serine aspartate-rich MEPE-associated motif</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BFR	Taxa de formação óssea
BFR/BS	Taxa de formação óssea/ superfície óssea
BMP	Proteínas morfogenéticas
BMU	<i>Basic Multicellular Unit</i>
BSP	Sialoproteína óssea
BV/TV	Volume ósseo/volume tissular
CaT	Cálcio total
CKD-MBD	<i>Chronic Kidney Disease- Mineral Bone Disease</i>
Ct. Ar	Área cortical
Ct.Po%	Taxa de porosidade cortical
Ct.Po.Ar	Área de porosidade cortical
Ct.Th	Espessura Cortical
Dlx-5	<i>Distal-less homebox 5</i>
DMP1	<i>Dentin Matrix Protein 1</i>
DOPPS	<i>Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study</i>
DRC	Doença renal crônica
ES/BS	Superfície de erosão/superfície óssea
et al.	e outros
FA	Fosfatase alcalina
FAO	Fosfatase alcalina óssea

FbV/TV	Volume de fibrose/volume tissular
FGF-23	Fator de crescimento de fibroblastos
Fz	<i>Frizzled</i>
GRP78	<i>Glucose-regulated protein 78</i>
HD	Hemodiálise
HR-pQCT	Tomografia Computadorizada de alta resolução
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
Lrp5/6	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6</i>
MAR	Taxa de aposição mineral
MEPE	Fosfoglicoproteína de matriz extracelular
Mlt	Tempo de aposição mineral
MMA	Metilmetacrilato
MS/BS	Superfície mineralizante
MV	Vesícula de mineralização
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
O	Osteóide
OCN	Osteocalcina
O.Th	Espessura osteóide
ObS/BS	Superfície osteoblástica/superfície óssea
OcS/BS	Superfície osteoclástica/superfície óssea
OPG	Osteoprotegerina
OPN	Osteopontina
OV/BV	Volume osteóide/volume ósseo
OS/BS	Superfície osteoblástica/ Superfície óssea

Osx	Osterix
PHEX	Endopeptidase Neutra reguladora de fosfato ligada ao cromossomo X
PPI	Pirofosfato
PTH	Paratormônio
RANK	Fator nuclear Kappa β
RANK-L	Fator nuclear Kappa β ligante
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
Runx-2	<i>Runt related transcription factor 2</i>
SIBLING	<i>Short Integrin Binding Ligand Interacting Glicoprotein</i>
SOST	Esclerostina proteína
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação das trabéculas
Tb.Th	Espessura trabecular
TGF- β	Fator de crescimento tissular β
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TMV	<i>Turnover</i> , Mineralização e Volume
TNAP	Fosfatase alcalina não específica do osso
USP	Universidade de São Paulo
VEGF	Fator de crescimento derivado do endotélio
Wnt	<i>wingless-int</i>

LISTAS DE SIMBOLOS

%	percentagem
±	mais ou menos
> e <	maior e menor
ANOVA	análise de variância
°C	grau Celsius
dL	decilitro
EUA	Estados Unidos da América
g	grama
h	hora
kDa	quilo dalton
kg	quilograma
L	litro
min	minuto
mg	miligrama
P	Fósforo
p	coeficiente de significância estatística
pg	picograma
pH	potencial hidrogeniônico
sem	semana
x	vezes
µg	micrograma
µL	microlitro

RESUMO

Santos MFP. *Comparação das características clínicas, bioquímicas e da análise histomorfométrica de biópsias ósseas de pacientes com doença renal crônica em diálise com e sem fratura* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

INTRODUÇÃO: Os distúrbios minerais e ósseos (DMO) da doença renal crônica (DRC) estão associados ao aumento do risco de fratura, estudos relatam cerca de 3% de fraturas neste grupo de pacientes, e as mesmas ocorrem mais precocemente quando comparadas à população geral, ou seja, 16 e 13 anos antes para homens e mulheres, respectivamente. A melhora no tratamento do DMO ainda não impactou na diminuição das fraturas, assim a melhor compreensão da fisiopatologia das mesmas provavelmente contribuiria para novas abordagens terapêuticas. **OBJETIVOS:** avaliar informes de fraturas, de ossos longos, de um banco de biópsias ósseas de pacientes com DRC em hemodiálise, e comparar, as características clínicas, bioquímicas e os resultados da análise histomorfométrica do osso trabecular e cortical desses pacientes com o de outros sem fraturas, pareados para idade, sexo e tempo de hemodiálise. Avaliamos também, por imunohistoquímica, a expressão de proteínas envolvidas na formação (SOST) e na mineralização óssea (DMP1, MEPE) de ambos os grupos. **MÉTODOS:** dezessete pacientes com fratura e igual número de controles foram estudados. **RESULTADOS:** A prevalência de fraturas foi de 5,5 fraturas/1000 pacientes ano a maioria deles tinha menos de 60 anos e tempo em hemodiálise inferior a 10 anos. Quanto a análise dos dados bioquímicos somente os níveis de fósforo sérico foram significativamente mais baixos nos pacientes com fratura comparada aos controles. Os resultados da análise histomorfométrica revelaram que a totalidade dos pacientes com e sem fratura apresentava doença de alta remodelação e nos fraturados detectamos menor volume e espessura trabecular, maior superfície osteóide, menor superfície de reabsorção além de menor superfície mineralizante, taxa de formação e maior tempo de intervalo para mineralização óssea quando comparados aos controles. Não encontramos diferenças na análise da espessura e porosidade cortical entre os dois grupos e a expressão da DMP1 no osso cortical foi menor e da SOST no osso trabecular foi maior nos pacientes fraturados comparados aos controles além de se associarem com parâmetros estruturais, de formação, de reabsorção e de mineralização. **CONCLUSÕES:** No banco de informes de biópsias ósseas analisado, encontramos alta prevalência de pacientes com fratura. Os pacientes com e sem fratura apresentavam doença de alta remodelação, porém os fraturados apresentavam maior comprometimento da microarquitetura óssea assim como menor formação e maior defeito de mineralização quando comparados aos pacientes sem fratura. A expressão de proteínas ósseas envolvidas na formação e mineralização óssea se correlacionaram com parâmetros envolvidos na remodelação óssea.

Descritores: Fraturas ósseas; Distúrbio do metabolismo mineral; Insuficiência renal crônica; Remodelação óssea; Histomorfometria; Imuno-histoquímica; Diálise renal.

SUMMARY

Santos MFP. *Comparison of clinical, biochemical and histomorphometric analysis of bone biopsies in dialysis patients with and without fractures* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

INTRODUCTION: Mineral and bone disorders (BMD) of chronic kidney disease (CKD) are associated with increased risk of fracture. Studies report about 3% of fractures in this group of patients, and these occur earlier than in the general population, namely 16 and 13 years earlier for men and women, respectively. Improvement in BMD treatment has not yet impacted reduction of fractures, therefore a better understanding of the pathophysiology of fractures would probably contribute to new therapeutic approaches. **OBJECTIVES:** evaluate report of long bone fractures from a bank of bone biopsies from patients with CKD on hemodialysis, and compare clinical and biochemical characteristics as well as the results of the histomorphometric analysis of trabecular and cortical bone of these patients with that of others without fractures, paired for age, gender, and time on hemodialysis. We also evaluated the expression of proteins involved in formation (SOST) and bone mineralization (DMP1, MEPE) of both groups by immunohistochemistry. **METHODS:** seventeen patients with fracture and an equal number of controls were studied. **RESULTS:** The prevalence of fractures was 6%, the majority of the patients were less than 60 years old, and the time on hemodialysis was less than 10 years. Regarding the analysis of the biochemical data, only serum phosphorus levels were significantly lower in patients with fracture compared to controls. Results of the histomorphometric analysis revealed that all the patients with and without fracture had high turnover disease, and in the fractured ones we detected a smaller trabecular volume and thickness, greater osteoid surface, and smaller surface of resorption in addition to smaller mineralizing surface, formation rate and longer time interval for bone mineralization when compared to controls. We did not find differences in the analysis of thickness and cortical porosity between the two groups; the DMP1 expression in the cortical bone was smaller and the SOST in the trabecular bone was higher in the fractured patients compared to that of controls, besides being associated with structural parameters, formation, reabsorption and mineralization. **CONCLUSIONS:** In the database of analyzed bone biopsies, we found low prevalence of patients with fracture. Patients with and without fracture had high turnover disease, but the fractured ones presented more impaired bone microarchitecture as well as lower formation and greater mineralization defect when compared to the patients without fracture. The expression of bone proteins involved in bone formation and mineralization correlated with parameters involved in bone remodeling.

Keywords: Fracture, bone; Mineral metabolism disorder; Renal insufficiency; Bone remodeling; Histomorphometry; Immunohistochemistry, Renal dialysis

1. INTRODUÇÃO

A estrutura óssea, que distingue os vertebrados dos demais animais, desenvolveu-se ao longo de milhares de anos até tornar-se o que conhecemos como esqueleto, uma forma especializada de tecido conjuntivo. O esqueleto desempenha diversas funções, como: proteção dos órgãos, locomoção, reserva mineral de cálcio e fósforo, defesa contra acidose, entre outras (Clarke, 2008).

Os ossos têm resistência semelhante à do ferro, capaz de suportar cargas e impactos muito acima de seu peso, mas mantém a leveza que permite realizar inúmeros movimentos, inclusive o voo das aves. Cerca de 99% do cálcio e 85% do fósforo corporal estão localizados nos ossos que contêm também matriz colágena (representando aproximadamente 10% da massa óssea), hidroxiapatita (65%), água (25%) e outros minerais como o magnésio, sódio e o bicarbonato (Boskey&Robey, 2013).

Os ossos são constituídos por uma estrutura contínua que predomina nos ossos longos, denominada cortical; e outras semelhantes a placas finas interligadas, reticuladas que predominam nos corpos vertebrais, e região distal dos ossos longos, denominada de osso trabecular ou esponjoso (Clarke, 2008).

Mesmo com uma complexa e resistente estrutura, certos impactos são capazes de exceder a resistência óssea causando fraturas, neste momento, como tecido vivo que é o osso inicia um processo de reparação, ativando citocinas, fatores de crescimento (prostaglandinas, óxido nítrico, IGF-1, TGF-B,

etc.), atraindo para o local células ósseas que iniciam o processo de reconstrução do tecido (Clarke, 2008).

Os osteoclastos ativados pelo fator ativador nuclear kappa beta ligante (RANK-L), são os responsáveis pela reabsorção do tecido que se tornou inviável após o dano e por liberar citocinas capazes de atrair e ativar os osteoblastos, células que formam e reconstroem o osso danificado (Zuscik, 2013).

Algumas doenças são capazes de danificar o tão bem orquestrado funcionamento do tecido ósseo, tornando-o menos resistente e responsivo às agressões externas, uma delas é a insuficiência renal (Jamal, 2010). Patologia essa que vem tornando-se cada vez mais frequente na população decorrente do envelhecimento e da alta prevalência de pessoas hipertensas e/ou diabéticas.

1.1. Fratura e doença renal crônica

1.1.2 Epidemiologia

A incidência de fratura não traumática, seja ela em pacientes com doença renal crônica (DRC) ou não, vem aumentando significativamente no mundo. Cooper et al., fizeram uma projeção, na qual em 2050, teremos uma incidência de fratura de quadril que atingirá cerca de 6,26 milhões de indivíduos em todo o mundo (Cooper et al., 1992).

Em 2011, Dhanwal et al. publicaram uma revisão de dados demográficos na qual estimam que 71% das fraturas de quadril nas próximas décadas ocorrerão na Ásia, América latina, Oriente médio e África, regiões onde a longevidade aumentou nos últimos anos.

Burge et al. (2007) estimam que a incidência de fraturas secundárias à osteoporose aumentará em 50% até 2025. Com custo aproximado de US\$ 25,3 bilhões. Quando se calcula o impacto da fratura na qualidade de vida e dias de doença, se estima uma perda de 1,75 milhões de anos de vida no mundo, sendo um quarto destes na China e Índia e 50% nos países do ocidente (Levey et al., 2007). Os custos anuais para o tratamento das fraturas são elevados. No Reino Unido estima-se que sejam de 2,1 bilhões de euros ao ano (Cooper et al., 1992).

Observa-se também uma redução da qualidade de vida desses pacientes pela limitação de deambulação, longos períodos acamados, bem como elevada taxa de mortalidade. Alguns estudos evidenciaram uma taxa de mortalidade de até 24,9% em dois anos (Levey et al., 2007).

Após uma fratura de quadril, o tempo médio de internação é de cerca de três semanas e aproximadamente 25% dos pacientes permanecerão sob cuidados médicos por um ano. Um terço necessitará da ajuda de terceiros devido à redução de mobilidade (Cummings et al., 1985).

A DRC afeta cerca de 5 a 10% da população mundial e se acompanha de várias comorbidades, entre elas a doença óssea decorrente dos distúrbios do metabolismo mineral e aumento do risco de fraturas (Eknoyan et al., 2004; Jamal et al., 2006).

Alterações no metabolismo mineral, na microarquitetura e a redução de massa óssea surgem precoce e gradativamente durante a perda de função renal de maneira que, quando os pacientes iniciam o tratamento dialítico, cerca de 50% deles referem antecedentes de fratura (Jamal et al., 2006; Lindberg & Moe, 1999).

Dados do *Third National Health Examination Survey* (NHANES) indicam que o risco de fratura de quadril é duas vezes maior nos pacientes com taxa de filtração glomerular (TFG) menor que 60 mL/min quando comparados aos com TFG > 60 mL/min (Jamal, 2010). Estudos do *Osteoporotic Fractures* mostram que comparado a mulheres com TFG superior a 60 mL/min, as que apresentavam TFG entre 45 mL/min e 50 mL/min tinham 1,5 maior risco de fratura de quadril e que esse risco dobrava se a TFG fosse inferior a 45 mL/min (Ensrud et al, 2007).

Nos pacientes em diálise, a incidência de fratura de quadril é 17,4 vezes maior que na população geral (Coco & Rush, 2000). Vale ressaltar que nestes pacientes a taxa de mortalidade é de 64% em um ano, comparado à taxa de 15-20% na população geral. Além disso, a fratura ocorre em idade mais precoce que a da população geral, 16 e 13 anos para homens e mulheres, respectivamente (Jamal et al, 2010).

O estudo *Osteoporotic Fractures* também evidenciou um risco de fratura transtrocanterica maior entre os pacientes com DRC. Sendo 3,5 vezes nos pacientes com TFG entre 45 e 60 mL/min e cinco vezes maior naqueles com TFG inferior a 45 mL/min (Ensrud et al, 2007).

Maravic et al. publicou em 2014 um levantamento da incidência de fraturas de quadril na França e evidenciou um risco quatro vezes maior entre os pacientes dialíticos (1,23 *versus* 0,30%), sendo que para o sexo masculino esse risco chega a ser sete vezes maior (1,1 *versus* 0,16%).

Ainda em 2014, estudo de Wagner et al., avaliou a incidência de fraturas de quadril e vértebras em pacientes dialíticos, e observou que entre os anos de 1992 e 2004 houve um aumento na incidência de 12,5 para 25,3 fraturas para

cada 1000 pacientes/ano. Porém, entre os anos de 2006 a 2009, encontrou uma discreta redução de 25,1 para 21,4 fraturas para cada 1000 pacientes/ano.

Em 2016, estudo realizado na Dinamarca, comparou pacientes dialíticos com a população geral detectando um risco relativo de fratura de quadril 3,14 vezes maior nos dialíticos e 1,85 vezes nos transplantados renais quando comparados aos indivíduos normais (Hansen et al., 2016).

Alem et al. em 2000 comparou adultos jovens dialíticos com indivíduos normais, e demonstrou que a incidência de fratura de quadril é 100 vezes maior nos pacientes (Alem et al., 2000).

1.2. Remodelação óssea

Durante o crescimento, as células ósseas moldam o tamanho, formato e arquitetura óssea através do depósito e da reabsorção de material da parte mais externa (periósteo) para as regiões mais internas do osso (endocortical, intracortical e trabecular).

Ao completarmos o crescimento a deposição no periósteo se reduz e a remodelação nos três compartimentos mantém a integridade do esqueleto, através da reposição do osso envelhecido, mantendo constante o volume ósseo.

As unidades de remodelação, denominadas *Basic Multicellular Unit* (BMU), contêm osteoclastos, osteoblastos, osteócitos e a cavidade de reabsorção (Frost, 1969). Nas trabéculas ósseas, a remodelação acontece na superfície, processo que, no indivíduo normal, dura cerca de 200 dias. Em pacientes com hiperparatireoidismo secundário dura em torno de 100 dias e

nos com hipoparatiroidismo ou durante tratamento com bisfosfonatos pode durar até 1000 dias (Eriksen, 1986).

A remodelação inicia-se com a reabsorção feita pelos osteoclastos, que dura em torno de 30 a 40 dias, seguida pelo processo de formação desenvolvido pelos osteoblastos, o que tem duração média de 150 dias. Ao final de cada ciclo de remodelação ocorre o total preenchimento da lacuna de reabsorção. Quando os osteoblastos são incapazes de preencher toda a lacuna (o que pode ocorrer, por exemplo, na osteoporose) se observa uma perda óssea progressiva em cada ciclo de remodelação (Eriksen, 1986).

Na região cortical, o ciclo de remodelação se faz em túneis onde os osteoclastos reabsorvem uma das extremidades e os osteoblastos preenchem o túnel logo após. Esse processo tende a durar, ao redor, de 120 dias (Eriksen, 1986).

No osso trabecular a remodelação se faz em contato com a medula óssea, que contém células progenitoras que migram diretamente da medula para a superfície trabecular. No osso cortical as células chegam através dos vasos sanguíneos (Eriksen, 1986).

Os osteoblastos, que correspondem de 4 a 6% das células ósseas, se originam de células mesenquimais. Durante o processo de diferenciação, os pré-osteoblastos, células caracterizadas pela expressão de *Runt-related transcription factor 2* (Runx-2), *Distal-less homeobox 5* (Dlx5) e *osterix* (Osx), proliferam e tornam-se capazes de expressar fosfatase alcalina; a partir deste momento estas células sofrem modificações morfológicas tornando-se cubóides e secretam as proteínas da matriz óssea. No último estágio de diferenciação, os osteoblastos apresentam alta expressão de osteocalcina

(OCN), *Bone sialoprotein* (BSP) I e II e colágeno tipo I. Neste momento, esses osteoblastos podem seguir por 3 caminhos: sofrer apoptose, tornar-se osteócito ou uma *lining cell*, células achatadas que recobrem a superfície óssea (Capulli et al., 2014).

São vários os fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos que estimulam esta diferenciação, entre eles as proteínas morfogenéticas (BMP), fatores de crescimento (FGF e IGF), fatores angiogênicos, como a endotelina e hormonais como o paratormônio (PTH) e prostaglandinas (Lian et al., 2006; Parfitt et al., 2000).

As ações do PTH e das BMPs estão associadas com a ativação da via de sinalização conhecida como via Wnt (relacionada à renovação de diversos tecidos, entre eles o osso). Quando ativada, esta via induz uma série de eventos intracelulares que estabilizam a B-catenina, a qual modula a expressão de genes que promovem a diferenciação, ativação e recrutamento dos osteoblastos (Qin et al., 2003; Westendorf et al., 2004).

Os osteócitos, representam cerca de 95% das células ósseas e emitem processos dendríticos (cerca de 40 a 100 por célula) que conectam estas células entre si, com os osteoblastos, as *lining cells* e aos vasos sanguíneos (Beno et al., 2006). Estudos recentes mostram que os osteócitos são os principais gerenciadores da remodelação óssea.

Durante a diferenciação dos osteoblastos em osteócitos, ocorrem uma menor expressão do colágeno tipo I e de fosfatase alcalina e uma maior expressão da DMP1 (Dentin Matrix Protein 1), FGF-23 (Fator de crescimento de fibroblasto 23), MEPE (Fosfoglicoproteína de matriz extracelular), PHEX (Endopeptidase Neutra Reguladora de Fosfato ligada ao cromossomo X), além

da SOST, que codifica a esclerostina, expressa nos osteócitos maduros (Winkler et al., 2003).

Estes grupos de genes expressos na diferenciação do osteócitos atuam na mineralização (DMP1 e SOST) e na regulação da homeostase do fósforo (PHEX, MEPE, FGF-23).

A diferenciação dos osteoclastos depende do sistema OPG (osteoprotegerina) /RANK/ RANKL. Os osteoblastos produzem e expressam em suas membranas o RANKL, que se liga ao receptor do fator nuclear kappa B (RANK) presente nos precursores dos osteoclastos. Os osteoblastos, por sua vez, também produzem OPG, a qual impede a ligação RANK-RANKL. Assim, essas células são responsáveis tanto pelo estímulo quanto pela inibição da diferenciação dos osteoclastos (Capulli et al., 2014).

O paratormônio também apresenta papel determinante nesse mecanismo de reparação óssea. Quando administrado diariamente, possui efeito anabolizante, por inibir o RANKL e estimular a liberação de OPG. Quando cronicamente elevado, como no hiperparatireoidismo, possui efeito inverso aumentando a reabsorção óssea (Khosla, 2001).

Sabe-se também que a angiogênese está bastante relacionada com a reabsorção óssea e com fatores como VEGF, fator de crescimento endotelial, e endotelina (Eghbali-Fatourehchi et al., 2005; Brandi & Collin-Osdoby, 2006). Os mecanismos pelos quais esses fatores regulam a angiogênese e atividade de osteoblastos e osteoclastos ainda são desconhecidos (Taubram-Tink & Barnstable, 2004). A apoptose de osteócitos libera fatores de crescimento e citocinas que atraem vasos sanguíneos.

1.3. Mineralização Óssea

Mineralização consiste no depósito de hidroxiapatita ao longo das fibras colágenas, este processo depende não apenas da disponibilidade do cálcio e do fósforo, mas também da atividade dos osteoblastos (MacWay et al., 2012).

Barragan-Adjemian et al. (2006), em estudos *in vitro* observou que pequenas estruturas minerais, denominadas calcosferulitos, são depositadas ao redor de osteócitos jovens ao longo das fibras colágenas. Essas estruturas vêm de uma matriz vesicular e após serem depositadas aumentam de tamanho, coalescem e cercam a frente de mineralização (Atkins et al., 2012).

Os osteoblastos, na frente de mineralização, mantém a composição iônica do espaço extracelular através de bombas de cálcio e fosfato. A composição destes íons é modulada por uma matriz não colágena e pela presença do pirofosfato, acredita-se que o estímulo e bloqueio da mineralização seja dependente da relação fosfato/ pirofosfato (PPi) (Hessle et al., 2002).

O cálcio intracelular é mantido em torno de $0,1 \mu\text{M}$, já o fosfato (PO_4^{3-}) fica em torno de 5 mM uma vez que participa de diversas atividades metabólicas. O PPi é formado em várias reações, que necessitam de ATP e alguns destes PPi são hidrolisados a fosfato pela pirofosfatase. Os demais serão levados à matriz colágena pela ANK (proteína anquilose progressiva) (Gurley et al., 2006; Kim et al., 2010), a qual é responsável pela inibição da mineralização (Gurley et al., 2006; Terkeltaub et al., 2001).

A matriz vesicular tem papel chave na manutenção da relação $\text{PO}_4^{3-}/\text{PPi}$, pois possui duas enzimas mantenedoras dessa relação NPP_1 , que hidrolisa o nucleosídeo trifosfato extracelular aumentando PPi e a TNAP, que reduz o PPi e eleva o PO_4^{3-} (Gurley et al., 2006; Harmey et al., 2004). O objetivo final da

matriz de mineralização é a deposição de cristais de apatita na matriz colágena, no início os cristais se depositam de maneira que seu eixo C-terminal esteja paralelo ao eixo da fibra colágena e a deposição se segue até que todos os espaços estejam preenchidos (Golub, 2011).

O mecanismo de formação dos cristais de hidroxiapatita ainda é alvo de diversas teorias. A mais aceita propõe que o interior das vesículas é o local inicial da nucleação que se finalizará no meio extracelular (Golub, 2011). Acredita-se que o cálcio e fosfato sejam internalizados na MV por anexinas para o cálcio e Pit-1,2 para o fosfato (Kirsch et al., 1997; Anderson et al., 2005), estes íons interagem com fosfolípidos e formam um complexo nuclear iniciando a formação dos nanocristais (Wu et al., 1993, 1997). A saída destes cristais da vesícula é ainda motivo de discussão. A propagação da mineralização ocorre por mecanismos fisioquímicos, baseado na natureza metastática no fluido extracelular (Neuman et al., 1982).

Sabe-se ainda que a DMP1, glicoproteína da família SIBLING, expressa por osteócitos, condrócitos e pré-osteoblastos, é depositada no espaço extracelular e participa do processo de mineralização na formação dos cristais de apatita, ao que parece funcionando como núcleo de mineralização (Suzuki et al., 2012).

A mineralização em outros tecidos é inibida pela presença do pirofosfato (Murshed et al., 2005). O tecido ósseo é o único que contém colágeno tipo I e fosfatase alcalina (TNAP) a qual hidrolisa o PPi e forma fosfato inorgânico e hidroxiapatita (Orimo, 2010).

Outros fatores liberados pelos osteócitos e osteoblastos também participam da inibição da mineralização, entre eles, a osteopontina (OPN) e a

MEPE (Addison et al., 2010). Quando liberadas na forma de peptídeo fosforilado ligam-se aos cristais e inibem a propagação do processo (Atkins et al., 2011; Rowe, 2004).

1.4. Proteínas Ósseas

Os osteócitos expressam vários fatores, entre eles FGF-23, MEPE, DMP1, PHEX e esclerostina (SOST) são os mais estudados até o momento.

1.4.1 FGF-23

É uma proteína de 32 kDa da família dos fatores de crescimento de fibroblastos (Dallas et al., 2013). Seu alvo mais importante é o rim onde atua na manutenção dos níveis séricos de fósforo através da inibição da expressão do cotransportador Na/Pi (NaPi IIa e NaPi IIc) e conseqüentemente aumentando a fosfatúria (Gattineni et al., 2009; Larsson et al., 2004). Adicionalmente, atua na redução da expressão da 1α -hidroxilase e concomitantemente na produção de calcitriol que por sua vez reduz a absorção de fósforo corroborando a hipofosfatemia (Myamoto et al., 2005).

1.4.2 MEPE

A proteína MEPE foi clonada de um tumor indutor de osteomalácia em 2000 (Rowe, 2012). É substrato e ligante para PHEX (Zn metaloendopeptidase) que quando mutada resulta em raquitismo hipofosfatêmico ligado ao X (Rowe, 2012).

A MEPE C-terminal *ASARM motif* (MEPE rico em ácido serina aspartato) faz parte de uma família de proteínas chamada SIBLING (*Short Integrin Binding*

Ligand Interacting Glycoprotein) (Rowe, 2012; Rowe et al., 2000). Estas proteínas incluem DMP1, osteopontina, BSP e MEPE. MEPE, DMP1 e o *ASARM motif* controlam o fósforo através da regulação do FGF-23 (Rowe, 2012; David et al., 2011). Uma interação trimérica entre PHEX, DMP1, $\alpha 5\beta 3$ integrina ocorre na membrana plasmática do osteócito e media a regulação do FGF-23 (Rowe, 2012). ASARM peptídeos competem com o complexo trimérico e aumentam a expressão do FGF-23 (Rowe, 2012; David et al., 2011).

Evidências sugerem que a razão ASARM/SIBLING regula a matriz mineral e a produção de FGF-23 que então regula o fósforo e o calcitriol (David et al., 2009).

Camundongos MEPE *knockout* apresentam aumento do volume trabecular e da taxa de aposição mineral (Gowen et al., 2003).

A administração de MEPE em ratos leva a fosfatúria, pois diminui a reabsorção de fosfato no túbulo proximal. (Dobbie et al., 2008).

A expressão da MEPE no tecido ósseo de renais crônicos (imunohistoquímica) foi descrita pela primeira vez em doentes renais crônicos por Pereira et al. (2009). Seu padrão de expressão foi detectado nos corpos celulares dos osteócitos, de maneira difusa e não nos processos dendríticos ou em lacunas vazias. Também não se observou sua expressão em osteoblastos e osteoclastos. Além disso, apresenta relação inversa com volume ósseo e espessura trabecular.

1.4.3 DMP1

A DMP1 foi inicialmente identificada em odontoblastos durante a embriogênese e desenvolvimento pós-natal; observa-se ainda alta expressão em osteócitos, condrócitos e pré-osteoblastos (Suzuki et al., 2012).

Uma das principais funções da DMP1 é regular a mineralização, animais *knockout* para essa proteína, têm hipofosfatemia, níveis elevados de FGF-23, defeitos de mineralização gerando um fenótipo com osteomalácia (Feng et al., 2006).

É também um inibidor da FGF-23, uma vez que camundongos *knockout* para DMP1 apresentam níveis elevados de FGF-23 RNAm e proteína (Feng et al., 2006).

Observa-se ainda, um aumento do tamanho do cristal de apatita, sugerindo que atue como fator de nucleação da mineralização (Suzuki et al., 2012). Nos pré-osteoblastos a DMP1 sofre endocitose, e se liga ao receptor de membrana 78 kDa proteína ligada a glicose (GRP78), presente no retículo endoplasmático (Suzuki et al., 2012). A expressão da GRP78 aumenta durante a diferenciação dos osteoblastos e ainda é capaz de ligar-se ao colágeno tipo I facilitando a deposição de cálcio e fósforo na matriz óssea (Suzuki et al., 2012).

Assim como a expressão do MEPE, a expressão da DMP1 no tecido ósseo de renais crônicos, foi descrita por Pereira et al. (2009). O padrão é difuso, detectado nos processos dendríticos e nas lacunas dos osteócitos.

1.4.4 PHEX

O papel da PHEX no tecido ósseo não está totalmente esclarecido. Mutações do gene determinam raquitismo hipofosfatêmico ligado ao

cromossomo X, sugerindo que participe da mineralização óssea. Ela é conhecida por inibir o FGF-23 a nível transcripcional (Liu et al., 2003).

1.4.5 Esclerostina (SOST)

A esclerostina, produto do gene SOST, expressa por osteócitos maduros, é um inibidor da formação óssea através do antagonismo aos sinalizadores da via Wnt/B-catenina (Winkler et al., 2003).

A via Wnt/B-catenina é identificada em todos os vertebrados e em algumas outras espécies como a Planária e a *Drosóphila* 19 (Yavropoulou & Yovos, 2007). O nome Wnt deriva dos dois primeiros membros identificados, proteína “*wingless*” (*Drosóphila*) e “*int-1*” (camundongo) (Dierick & Bejsovec, 1999).

A família Wnt possui 19 glicoproteínas e é a principal reguladora da massa óssea, atuando como estimuladora da formação óssea.

Elas são secretadas por osteoblastos e atuam através de receptores Frizzled (Fz), sob influência de dois correceptores denominados Lrp5 e Lrp6 (Atkins & Findlay, 2012). Estes receptores apresentam um curto domínio intracelular e um grande domínio extracelular, nos quais se ligam moléculas como o PTH e o Klotho (Kuro-o et al., 1997; Williams & Insogna, 2009).

As ações da via Wnt classificadas como canônicas são exercidas através do receptor Fz e correceptores Lrp5 e 6 e efetivadas pela B-catenina (Dierick & Bejsovec, 1999). A translocação da B-catenina ao núcleo celular estimula a diferenciação, maturação e diferenciação dos osteoblastos (Glass et al., 2005).

A SOST atua inibindo a via Wnt através de sua ligação inibitória nos receptores Lrp5 e Lrp6 (Atkins & Findlay, 2012).

1.5. Classificação da Doença óssea

Na DRC, a remodelação óssea geralmente está comprometida e pode ser classificada em alta ou baixa remodelação. A doença de alta remodelação é representada pela osteíte fibrosa, o conjunto de lesões ósseas decorrentes do hiperparatireoidismo secundário. A baixa remodelação compreende a osteomalácia e a doença óssea adinâmica. Um estado intermediário entre alta e baixa remodelação é representado pela chamada doença mista. A biópsia óssea com análise histomorfométrica ajuda no diagnóstico e classificação do tipo de remodelação encontrado nesses pacientes.

Para uniformizar as alterações encontradas na biópsia, o KDIGO recomenda o uso da classificação TMV; onde “T” descreve o *turnover* (remodelação) ósseo, “M” a mineralização e “V” volume (ou massa) óssea.

A taxa de remodelação é calculada a partir da extensão da superfície óssea marcada pela tetraciclina, multiplicada pela distância entre as duas marcações. Para isso, antes da realização da biópsia, o paciente recebe a tetraciclina em dois períodos distintos, separados por um período sem fazer uso da medicação.

Mineralização é avaliada através do quanto da matriz osteóide está sendo mineralizada, para tanto, utiliza-se o índice conhecido por intervalo de tempo de mineralização (MLT), que é calculado a partir da espessura osteóide (O.Th) e da taxa de formação óssea (BFR).

O volume compreende a quantidade de osso mineralizado ou não entre as duas corticais.

Nos últimos anos passou-se a analisar a espessura e porosidade das duas corticais como índices que avaliam a qualidade do tecido ósseo.

1.6. Osteoporose

Osteoporose é definida pela redução da resistência óssea, aumentando o risco de fraturas. A resistência óssea é resultante da densidade mineral e da qualidade do osso. A prevalência de osteoporose na DRC é variável, de maneira que nos estágios iniciais observa-se redução de massa óssea e em estágios mais avançados notam-se alterações na qualidade do osso devido às alterações na remodelação com, ou sem redução de densidade mineral (Jamal, 2010). Nos pacientes com DRC, não só a osteoporose aumenta o risco de fratura como também as alterações musculares, desnutrição, inatividade, e neuropatia periférica (Jamal, 2010).

1.7. Avaliação de massa óssea

O padrão ouro para diagnóstico e classificação da doença óssea de pacientes com DRC é a biópsia óssea, porém é um exame invasivo, e não pode ser repetido com frequência.

Métodos não invasivos para avaliação do risco de fratura consistem basicamente na medida da densidade mineral óssea através da densitometria e mais recentemente na tomografia computadorizada de alta resolução. Outras técnicas como: espectroscopia de Raman, espectroscopia infravermelha de Fourier começam a ser empregadas e parecem promissoras (Pothuaud et al., 2000).

Na população em geral a densitometria é usada na avaliação de risco de fratura com bons resultados. No entanto, nos pacientes com DRC os resultados são conflitantes. Em 2009, Jamal et al., publicaram um estudo prospectivo com 5 anos de acompanhamento envolvendo 191 homens e 444 mulheres. Os

resultados mostraram que a perda de função renal levava a redução de massa óssea no quadril, porém a redução não era proporcional ao grau de insuficiência renal.

Diante destes fatos o KDIGO CKD-MBD em 2009, recomendava que a densitometria óssea fosse utilizada para avaliação do risco de fraturas em pacientes DRC em estágios 1 a 3.

Em 2012, os resultados de uma meta-análise sugeriram que havia uma redução de massa óssea analisada pela densitometria e maior risco de fraturas em pacientes com *clearance* de creatinina entre 30 e 60 mL/min sem associações com alterações bioquímicas do metabolismo mineral. Nos pacientes com DRC estágio 4 e 5 a associação não foi comprovada (Jamal, 2012).

Ainda em 2012, Limori publicou um estudo com 485 pacientes dialíticos no qual a densitometria de quadril foi eficaz em prever risco de fratura e em 2015, West et al. avaliou 315 pacientes entre os estágios 3 a 5 e também encontrou resultados semelhantes.

Em 2015, Goldenstein et al., publicou um artigo de revisão onde descreve estudos recentes nos quais evidenciou-se possível relação entre baixa densidade mineral óssea em quadril e colo de fêmur e aumento do risco de fraturas em pacientes com DRC estágio 5 em hemodiálise.

A tomografia computadorizada de alta resolução (HR-pQCT) apresenta resolução de aproximadamente 300 µm e pode ser realizada no esqueleto central e periférico. Tem a capacidade de discriminar o osso cortical do trabecular e fazer medidas de densidade mineral, espessura e área de cada compartimento (Adams, 2009).

Três estudos transversais foram realizados em pacientes em hemodiálise (Jamal, 2006; Russo et al., 1998; Hasegawa et al., 2004) e 1 em pacientes em diálise peritoneal (Negri et al., 2006). Todos mostraram uma redução predominantemente das corticais. Apenas o estudo de Jamal (2006) avaliou risco de fratura, a qual foi associada à redução de densidade do osso cortical (*odds ratio* de 16,7). As fraturas não mostraram associação com a redução de osso trabecular, o que, se confirmado em outros estudos, poderá sugerir a importância do estudo do osso cortical na avaliação do risco de fraturas em pacientes nos estágios avançados de doença renal. Ainda permanece a dúvida sobre qual a melhor técnica de avaliar o risco de fratura de pacientes DRC.

Até o presente momento poucos estudos avaliaram as características de biopsias ósseas de pacientes com DRC e fratura.

2. OBJETIVO GERAL

Comparar as características clínicas, bioquímicas e os resultados da análise histomorfométrica do osso trabecular e cortical de pacientes com doença renal crônica e fratura com o de pacientes sem fraturas, pareados para idade, sexo e tempo de diálise.

2.1. Objetivo secundário

Comparar, a expressão de proteínas envolvidas na formação (SOST) e na mineralização óssea (DMP1, MEPE) dos pacientes com e sem fratura.

3. METODOLOGIA

3.1. Pacientes e Métodos

Estudo retrospectivo utilizando o banco de biópsias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP).

Foram incluídas biópsias de pacientes com histórico de fratura de colo de fêmur e úmero, bem como controles, ou seja, pacientes sem fratura pareados para idade, sexo e tempo de diálise.

Os critérios de exclusão foram biópsias que apresentassem sinais de intoxicação por alumínio (mais de 20% das trabéculas recobertas), qualidade da biópsia impedindo a análise histomorfométrica, dados clínicos incompletos, transplante renal prévio e paratireoidectomia.

O Estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (Protocolo de Pesquisa nº 13445).

3.2. Parâmetros avaliados

3.2.1. Clínicos

Foram avaliados idade, sexo, tempo de diálise e etiologia da doença renal através de dados obtidos nos formulários de encaminhamentos das biópsias ósseas.

3.2.2. Laboratoriais

Valores de cálcio total, fósforo, fosfatase alcalina e paratormônio foram avaliados a partir dos dados descritos nos mesmos formulários.

3.2.3. Histomorfometria Óssea

A biópsia óssea foi realizada na crista ilíaca com trefina, com diâmetro interno de 7 mm, sob anestesia local com lidocaína 2% e sedação com Midazolan (7,5 mg intramuscular). Os pacientes receberam previamente 2 cursos de tetraciclina, na dose de 500 mg a cada 12h/12h por 3 dias, separados por 10 dias livres de medicamento - a biópsia foi realizada de 2 a 5 dias após o término do antibiótico. A biópsia óssea foi processada com técnica padronizada que permite analisar o tecido sem descalcificação prévia (Hernandez et al., 2008). A análise histomorfométrica foi realizada empregando-se método semiautomatizado, com o software *Osteomeasure* (Osteometrics Inc., Atlanta, GA, USA).

Os parâmetros estáticos e dinâmicos foram descritos usando a padronização proposta pela *American Society of Bone and Mineral Research* (Parfitt, 1987). Os parâmetros estruturais e estáticos foram comparados com controles normais que pertencem a um banco de dados do nosso laboratório (dos Reis et al., 2007). Para os parâmetros dinâmicos utilizaram-se os valores de Rehman et al.,(1994) ajustados para as respectivas faixas etárias.

Foram avaliados também a espessura e a porosidade das corticais. Sendo utilizada a seguinte fórmula para cálculo do percentual de porosidade cortical (Ct Po %):

$$\left(\frac{100 \times \text{Ct PoAr}}{\text{Ct.Ar}} \right)$$

Ct Po Ar: área de porosidade cortical

Ct Ar: área total de cortical

Nos resultados da análise histomorfométrica aplicamos a classificação TMV para obter as características da remodelação ($T = \text{turnover}$), da mineralização (M) e do volume ósseo (V) nos dois grupos de pacientes.

A remodelação foi avaliada e classificada como alta ou baixa através dos valores de BFR/BS para faixa etária e sexo, utilizando-se como parâmetro o estudo de Rehman et al. (1994).

A mineralização foi avaliada e classificada com normal ou alterada através dos valores de Mlt para faixa etária e sexo, também se utilizando como parâmetro o estudo de Rehman et al. (1994).

O diagnóstico de baixo volume trabecular foi definido quando o BV/TV fosse menor que 17,4% para homens e para mulheres 14,7% (Barreto et al., 2006).

3.2.4. Imunohistoquímica

A expressão das proteínas SOST, MEPE e DMP1 foi analisada por imunohistoquímica.

Utilizamos um método adaptado para detecção de proteínas no tecido ósseo calcificado (Gomes et al., 2008). Cortes histológicos de 5 μm foram submetidos a desplastificação (remoção do metacrilato) com uma mistura de 50% de xilol e 50% de clorofórmio por 30 minutos. Em seguida as amostras foram reidratadas com álcool em concentrações decrescentes (100%, 96%, 70% e 50%) por 20 segundos cada, e a uma rápida descalcificação com ácido acético a 1% por 10 minutos sob agitação. Posteriormente, o tecido foi tratado

com *Tween* a 0,1% em PBS por 30 minutos, seguido de peróxido de hidrogênio a 3% em álcool metílico para bloqueio da peroxidase endógena.

Para a realização da imunohistoquímica utilizamos o método de imunoperoxidase com o kit Vectastain ABC-HRP - complexo Avidina/Biotina *horseradish-peroxidase* (Vector, Burlingame, CA, EUA). Após o bloqueio da peroxidase endógena, ligantes não específicos foram bloqueados com o kit de bloqueio avidina/biotina (Vector, Burlingame, CA) e, em seguida, utilizamos o *Protein Block* (Dako Cytomation). Terminada esta etapa, os cortes foram submetidos à incubação (*overnight*, 4°C) com os anticorpos primários e secundários descritos na tabela 1.

Tabela 1 – Anticorpos e diluições utilizadas para reação de imunohistoquímica

Anticorpo primário (diluição)	Anticorpo secundário (diluição)
Anti DMP1 humana produzida em coelho (1:200) (Takara, Otsu, Japão)	Anti-coelho biotinilado (1:1000)
Anti Sost humana produzida em camundongo (1:100) (R&D systems)	Anti-camundongo biotinilado (1:200)
Anti MEPE humana produzida em cabra (1:200) (R&D systems)	Anti-cabra biotinilado (1:1000)

Após a incubação com os anticorpos e complexo ABC, o substrato cromogênico utilizado para revelação foi o AEC (*3-amino-9 ethyl-carbazol*) por aproximadamente 15-20 minutos. Os cortes foram contracolorados com solução do hemalumbre de Mayer. Controles negativos simultâneos foram realizados em cada experimento, omitindo-se o anticorpo primário.

A expressão da SOST foi analisada em microscópio Nikon Eclipse 50i, aumento de 400x no tecido trabecular e nas corticais das biópsias. O número de células positivas foi calculado em relação à área de tecido analisado. Os valores foram expressos como número de osteócitos positivos em relação à área óssea analisada ($n^{\circ}\text{ost}/\text{mm}^2$). Já a expressão da MEPE e DMP1 foi quantificada utilizando-se o programa Image-Pro Plus 7.0 no tecido ósseo trabecular, onde avaliamos 25 campos, já na cortical a análise foi realizada na área cortical completa. Os valores da MEPE e DMP1 foram expressos em porcentagem (área positiva / área total x 100).

3.3. Análise estatística

A análise estatística foi realizada no *software Statistica* versão 8.0 para Windows. Foi utilizado teste de *Levene* para avaliação de homogeneidade das amostras classificando-as em variáveis homogêneas e não homogêneas e o teste de *Kolmogorov-Smirnov* para avaliação da normalidade dos resultados.

Para as variáveis homogêneas e paramétricas aplicamos o teste t de *Student* e os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão.

As variáveis com distribuição não paramétrica foram expressas em mediana (percentil 25 - 75).

Para as comparações das variáveis classificadas como não homogêneas e não paramétricas aplicamos o Teste U de *Mann-Whitney* e para as correlações o teste de *Spearman*.

Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

Foram avaliados 1888 resultados de biopsias ósseas do banco de dados do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo entre 2004 e 2015. Nestes foram relatados 115 fraturas, ou seja, 5,5 fraturas/1000 pacientes ano.

Foram excluídos 59 casos por intoxicação alumínica; 3 biópsias eram de pacientes transplantados, em 9 casos os dados clínicos e/ou laboratoriais estavam incompletos, 31 fraturas em outros ossos que não os de interesse do estudo, 15 casos foram descartados pela má qualidade do fragmento.

O tipo histológico das biopsias dos pacientes com intoxicação alumínica revelou que 37,3% tinham osteíte fibrosa, 44% doença mista, 6,8% doença óssea adinâmica e 11,9% osteomalácia.

Figura 1. Fluxograma das biopsias ósseas

Assim selecionamos 17 pacientes que apresentavam: fraturas de fêmur (N=14), de úmero (N=3).

Quanto às características demográficas dos pacientes (Tabela 2), encontramos o predomínio de mulheres (9/52,94%), menores de 60 anos (12/70,59%), com tempo de hemodiálise inferior a 10 anos (10/58,83%).

Dentre os com fratura (grupo 1), a hipertensão arterial sistêmica (8/47,05%) foi a principal causa de doença renal, seguida pelas glomerulonefrites (4/23,52%). No grupo sem fratura (grupo 2), as glomerulonefrites (5/29,41%) e etiologia indeterminada (5/29,41%) predominaram.

No grupo 1 encontramos 7 (41,2%) pacientes com diagnóstico de baixa massa óssea ($BV/TV < 17,4\%$ para homens e $BV/TV < 14,7\%$ para mulheres) e no grupo 2 apenas 1 paciente (5,88%). Retardo na mineralização foi encontrado em 16 (94%) pacientes do grupo 1 e em 14 (82,4%) pacientes do grupo 2. Todos os pacientes apresentavam alta remodelação óssea.

Em relação aos dados laboratoriais (Tabela 3), encontramos diferença quanto aos valores de fósforo; sendo mais elevados no grupo 2 ($6,8 \pm 1,34$ mg/dL x $5,5 \pm 1,85$ mg/dL; $p=0,02$). Os demais resultados laboratoriais (cálcio total, fosfatase alcalina e paratormônio) foram semelhantes entre os grupos.

Tabela 2 – Características clínicas dos pacientes estudados

	Total (n=34)	Fratura (n=17)	Não Fratura (n=17)
Sexo –número absoluto (%)			
Feminino	18	9 (52,94%)	9 (52,94%)
Masculino	16	8 (45,05%)	8 (45,05%)
Idade			
35-40 anos	12	6 (35,29%)	6 (35,29%)
46-50 anos	2	1 (5,88%)	1 (5,88%)
51-55 anos	4	2 (11,76%)	2 (11,76%)
56-60 anos	6	3 (17,64%)	3 (17,64%)
61-65 anos	10	5 (29,41%)	5 (29,41%)
Tempo de hemodiálise (HD)			
1-5 anos	10	5 (29,41%)	5 (29,41%)
6-10 anos	10	5 (29,41%)	5 (29,41%)
11-15 anos	12	6 (35,29%)	6 (35,29%)
16-20 anos	2	1 (5,88%)	1 (5,88%)
Etiologia da doença renal			
Hipertensão arterial	10	8 (47,05%)	2 (11,76%)
Diabetes mellitus	3	1 (5,88%)	2 (11,76%)
Glomerulonefrites	9	4 (23,52%)	5 (29,41%)
Indeterminada	7	2 (11,76%)	5 (29,41%)
	5	2 (11,76%)	3 (17,64%)
Baixa massa óssea			
Sim	8	7 (41,17%)	1 (5,88%)
Não	26	10 (58,82%)	16 (94,11%)

Os valores são expressos como número absoluto e porcentagem (%).

Tabela 3 – Comparação entre as características laboratoriais dos pacientes com e sem fratura

	Fratura (N=17)	Não Fratura (N=17)	p
Cálcio (Ca), mg/dL (VN: 8,5-10,2)	9,2±1,0	9,4±1,5	0,72
Fósforo (P), mg/dL (VN: 2,7-4,5)	5,5±1,8	6,8±1,3	0,02#
Fosfatase alcalina (FA), UI/L (VN: <125)	326±297,7	366,5±346,6	0,72
Paratormônio (Pth), pg/mL (VN: 16-87)	1441,8±1182,8	1284,3±737,8	0,64

Os valores são expressos como média ± desvio padrão. VN: valor normal. A análise estatística foi realizada através do teste t de *Student*. # p<0,05.

Quanto aos resultados da análise histomorfométrica realizada no osso trabecular (Tabela 4), o grupo 1 apresentou menor volume (20,8±9,5% x 27,3±8,3%; p=0,04) e espessura trabecular (105,9±29,31 µm x 125,3±25,4 µm; p=0,04), maior superfície de osteóide (60,3±17,6% x 44,6±19,9%; p=0,02), e intervalo de tempo para mineralização (229; 102,2-1381d x 57,3; 33,2-97d; p=0,0002), menor superfície de mineralização (4,8±2,7% x 9,4±5,3%; p=0,01), de taxa de formação óssea (0,04±0,04 µm³ µm² /d x 0,1±0,09 µm³ µm² /d; p=0,005), e da superfície de reabsorção (8,6±4,5% x 15±5,3%; p=0,0005).

Tabela 4 – Comparação entre os resultados da análise histomorfométrica no osso trabecular dos pacientes com e sem fratura

	Fratura (N=17)	Não Fratura (N=17)	p
Parametros Estruturais			
BV/TV (%)	20,8 ±9,5	27,3±8,3	0,04#
Tb.N (mm)	2,0±0,9	2,3±0,98	0,42
Tb.sp (µm)	378,2* (255,9-680,6)	386,1* (260,7-520,3)	0,33
Tb.Th (µm)	105,9±29,3	125,3±25,4	0,04#
Parametros de Formação			
OV/BV (%)	13,4* (3,7-28,0)	8,6* (4,0-16,3)	0,31
OS/BS (%)	60,3±17,6	44,6±19,9	0,02#
O.Th (mm)	12,8±6,2	12,7±5,3	0,95
BFR/BS (µm ³ µm ² /d)	0,04±0,04	0,1±0,09	0,005#
MLT (d)	229,0* (102,2-1381,0)	57,3* (33,2-97,0)	0,0002#
MAR (µm)	1,0±0,3	1,1±0,4	0,32
MS/BS (%)	4,8 ±2,7	9,4 ± 5.3	0,01#
Parametros de Reabsorção			
ES/BS (%)	8,6±4,5	15,0±5,3	0,0005#
Oc.s/BS (%)	2,5±2,1	3,8±2,7	0,13

Os valores são expressos como média ± desvio padrão ou (*) mediana (intervalo interquartil - Q25-Q75). A análise estatística foi realizada através do teste t de *Student* ou teste de *Mann-Whitney*. # p<0,05. BV/TV: volume trabecular; Tb.N: número de trabéculas; Tb.sp: separação das trabéculas; Tb.Th: espessura trabecular; OV/BV: volume osteóide; OS/BS: superfície osteóide; O.Th: espessura osteóide; ; BFR/BS: taxa de formação óssea MLT: intervalo de mineralização;; MAR: taxa de aposição mineral; MS/BS: superfície de mineralização; ES/BS: superfície de reabsorção; Oc.S/BS: superfície osteoclástica.

Não encontramos diferenças entre os dois grupos quanto à análise histomorfométrica do osso cortical (Tabela 5).

Tabela 5 – Comparação entre os resultados da análise histomorfométrica no osso cortical dos pacientes com e sem fratura

	Fratura (N=13)	Não Fratura (N=16)	p
Ct.Ar	4,0±2,3	5,1±2,3	0,19
Ct.Th	381,4±183	486,8±211,7	0,16
Ct.Po.Ar	0,4±0,3	0,5±0,21	0,54
Ct.Po%	10,5±4,8	9,5±3,9	0,53

Os valores são expressos como média ± desvio padrão. Ct.Ar: área cortical; Ct.Th: espessura cortical; Ct.Po.Ar: área de porosidade cortical; Ct. Po: porosidade cortical.

Sobre a expressão das proteínas ósseas (Tabela 6) encontramos menor expressão da DMP1 no tecido ósseo cortical do grupo 1 (1,3; 0,7-2,0% x 2,9; 1,5-7,8%; p=0,02), além de maior expressão de SOST no tecido ósseo trabecular (5,2; 1,6-8,9n/mm³ x 1,0; 0,5-3,9n/mm³). A expressão das demais proteínas analisadas não apresentou diferença entre os grupos.

Tabela 6 – Comparação entre a expressão das proteínas DMP1, MEPE e SOST no osso cortical e trabecular dos pacientes com e sem fratura

	Fratura (N=17)	Não Fratura (N=17)	p
DMP1 cortical (%)	1,3 0,7-2,0	2,9 1,5-7,8	0,02#
DMP1 trabecular (%)	1,8* (1,3-5,9)	3,5* (2,3-7,2)	0,09
MEPE cortical (%)	3,4* (2,4-3,6)	2,5* (1,8-5,2)	0,66
MEPE trabecular (%)	3,4±2,2	4,6±3,7	0,28
SOST cortical (n/mm ²)	8,9* (3,0-45,3)	12,6* (5,0-19,0)	1,0
SOST trabecular (n/mm ²)	5,2* (1,6-8,9)	1,0* (0,5-3,9)	0,035#

Os valores são expressos como média ± desvio padrão ou (*) mediana (intervalo interquartil - Q25-Q75). # p<0,05.

Avaliamos as correlações entre os resultados da análise bioquímica (Ca, P, FA e PTH) e os parâmetros histomorfométricos (Tabela 7). Observamos que o fósforo apresentou correlação direta com a superfície de reabsorção e indireta com o intervalo de mineralização. A FA correlacionou-se positivamente com o volume trabecular, taxa de formação óssea, superfície de reabsorção, superfície de osteoclastos, superfície de osteoblastos, volume de fibrose e nível de PTH. O PTH apresentou correlação direta com o volume trabecular, espessura osteóide, taxa de aposição mineral, taxa de formação óssea, superfície osteoclástica, superfície osteoblástica e com o volume de fibrose. E apresentou correlação inversa com a espessura da cortical.

Tabela 7 – Correlações dos parâmetros bioquímicos com parâmetros de histomorfometria óssea

	Ca		P		FA		PTH	
	r	p	r	p	r	p	r	p
OV/BV					0,38	0,028	0,61	0,0001
OS/BS							0,36	0,034
Ob.S/BS					0,47	0,005	0,66	0,0002
O.Th					0,34	0,048	0,47	0,005
BFR/BS	0,33	0,06	0,33	0,06	0,36	0,039	0,42	0,013
MAR							0,42	0,022
Mlt			-0,35	0,04				
ES/BS			0,52	0,001	0,56	0,0007	0,36	0,035
Oc.S/BS			0,33	0,05	0,59	0,0003	0,64	0,0001
Fb.V/TV					0,45	0,012	0,58	0,0001
Ct.Th			0,52	0,004			- 0,48	0,0078
PTH					0,62	0,0001		

OV/BV: volume osteóide; OS/BS: superfície osteóide; Ob.S/BS: superfície osteoblástica; O.Th: espessura osteóide; BFR/BS: taxa de formação óssea; MAR: taxa de aposição mineral; MLT: intervalo de mineralização; ES/BS: superfície de reabsorção; Oc.S/BS: superfície osteoclástica; Fb.V/TV: volume de fibrose; Ct.Th: espessura cortical; Ca: cálcio sérico, P: fósforo sérico; FA: fosfatase alcalina total; PTH: paratormônio.

Avaliamos ainda as correlações entre a expressão das proteínas ósseas (MEPE e SOST) e os resultados da análise histomorfométrica (Tabela 8). Observamos que a SOST expressa no osso trabecular correlacionou-se inversamente com a espessura trabecular e a superfície de reabsorção. A expressão da SOST no osso cortical correlacionou-se inversamente com a espessura trabecular, superfície de mineralização e taxa de formação óssea. A expressão da MEPE no osso trabecular se correlacionou positivamente com o volume e espessura do osteóide, com a superfície de osteoclastos e com níveis de fosfatase alcalina; enquanto a sua expressão no osso cortical se correlacionou positivamente apenas com a espessura osteóide.

Tabela 8 – Correlações da expressão das proteínas DMP1, MEPE e SOST no osso trabecular e cortical e os parâmetros bioquímicos e de histomorfometria óssea

	SOST trabecular		SOST cortical		MEPE trabecular		MEPE cortical	
	r	p	r	p	r	p	r	p
BFR/BS			-0,48	0,01				
OV/BV					0,42	0,016	0,42	0,034
Tb.Sp								
Tb.Th	-0,38	0,008	-0,46	0,015				
O.Th					0,35	0,047	0,46	0,018
MS/BS			-0,41	0,047				
ES/BS	-0,48	0,006						
Oc.S/BS					0,44	0,01		
PTH					0,34	0,051		
FA					0,40	0,027		
SOST cort	0,49	0,0086						
MEPE cort					0,43	0,03		

BV/TV: volume trabecular; BFR/BS: taxa de formação óssea; OV/BV: volume osteóide; Tb.sp: separação das trabéculas; Tb.Th: espessura trabecular; O.Th: espessura osteóide; MS/BS: superfície de mineralização; ES/BS: superfície de reabsorção; Oc.S/BS: superfície osteoclástica; PTH: paratormônio; FA: fosfatase alcalina total; SOST cort: esclerostina no osso cortical; MEPE cort: fosfoglicoproteína de matriz extracelular no osso cortical.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, onde revisamos 1888 informes de biópsias ósseas de pacientes com DRC em hemodiálise ao longo de 11 anos, encontramos um percentual de pacientes com fraturas de 6%, superior ao descrito no estudo DOPPS. Optamos por analisar somente os pacientes com fratura de ossos longos (fêmur e úmero) e ao excluirmos aqueles com fraturas em outros locais, com intoxicação alumínica, transplante renal e paratireodectomia prévios, além de problemas técnicos com o informe e o fragmento, o percentual se reduziu a 0,9%. Os pacientes incluídos eram predominantemente jovens (menos de 60 anos), com tempo de diálise menor que 10 anos e a análise histomorfométrica das biópsias revelou que apresentavam doença óssea de alta remodelação com importante comprometimento da microarquitetura e da mineralização.

O estudo DOPPS (2014), que nas suas três etapas, estudou 36337 pacientes em hemodiálise em 12 países, demonstrou, que 3% deles apresentaram fraturas durante o seguimento de 1,6 ano, sendo 491 de fêmur e 643 de outros locais. Nesse estudo a incidência de qualquer tipo de fratura variou de 12/1000 pacientes ano no Japão a 45/1000 pacientes ano na Bélgica. Especificamente a fratura de fêmur variou de 3/1000 pacientes ano no Japão a 20/1000 na Suécia. Nossos resultados, 0,82/1000 pacientes ano, para esse tipo de fratura, diferem dos descritos no DOPPS, porém avaliamos um numero menor de pacientes em um tempo maior de seguimento.

Nossos resultados não refletem a prevalência de fraturas nos pacientes em hemodiálise no Brasil. Realizamos um estudo retrospectivo, com

informações obtidas de relatórios de encaminhamento de biópsias, não analisamos fraturas vertebrais, que apesar de serem as mais frequentes, muitas vezes não são diagnosticadas por apresentarem poucos sintomas.

A prevalência de DRC está aumentando em todo o mundo, assim como a da osteoporose. Esses aumentos se devem, em parte, a maior envelhecimento da população. As fraturas que ocorrem nos diferentes estágios da doença renal se devem tanto às diferentes formas de osteodistrofia renal quanto à presença de osteoporose, uma coabitação difícil de ser diagnosticada.

Em revisão recente, Miller (2016) relata que, na população em geral, a osteoporose é cada vez mais subdiagnosticada e subtratada o que se deve a diminuição, por razões econômicas, da realização de densitometria óssea de rotina, a não valorização e tratamento de fraturas vertebrais assintomáticas evitando com isso novas fraturas, e ao receio de complicações relacionadas ao tratamento da osteoporose especialmente com os bisfosfonatos que podem levar a fraturas atípicas e necrose de mandíbula. Se esses fatos ocorrem na população em geral o que dizer dos pacientes com DRC e osteoporose? Só recentemente o KDIGO sugeriu que a densitometria óssea fosse usada para avaliar risco de fratura (KDIGO 2015). Segundo Miller (2014), nos pacientes com DRC estágio 1 a 3 o diagnóstico e tratamento da osteoporose podem seguir as mesmas orientações dadas aos pacientes com osteoporose sem DRC. Já nos pacientes com DRC estágio 4 e 5 a biópsia óssea seria necessária. Vale ressaltar que, praticamente não existem estudos sobre o efeito de drogas no tratamento da osteoporose dos pacientes estágios 4, 5 e 5 em diálise.

Dentre os pacientes com fratura encontramos 51% de intoxicação por alumínio (59/115). Classicamente a intoxicação alumínica cursava com osteomalácia. Porém nossos resultados mostraram que o alumínio foi detectado em todos os tipos histológicos e predominantemente nas doenças de alta remodelação (osteíte fibrosa e doença mista) sugerindo que o metal não obrigatoriamente interferiu na mineralização óssea. Vale ressaltar que, na maioria dos casos, a presença do metal na frente de mineralização não era maciça como observados nas biópsias de pacientes com osteomalácia. As principais fontes de intoxicação continuam sendo a concentração excessiva do metal no dialisato e o uso de quelantes a base de alumínio. Nos informes das biópsias, todos os centros de diálise dispunham de osmose reversa para tratamento da água e o quelante mais usado era o sevelamer, seguido de sais de cálcio, pelo menos no momento da biópsia óssea. Como grande parte dos doentes dialisava há bastante tempo não foi possível identificar corretamente a fonte de contaminação. Revisão recente de Chappard et al. (2016), sugere outras fontes de alumínio, como por exemplo: os biomateriais usados em válvulas cardíacas, implantes ósseos e próteses ortopédicas, cimentos ósseos com fluorossilicato de alumínio, nutrição parenteral e aditivos alimentares. Não dispomos de dados para avaliar essas outras fontes de contaminação nos pacientes estudados.

O resultado da análise histomorfométrica revelou que tanto os pacientes com fratura como os controles apresentavam doença óssea de alta remodelação. O que distinguiu os dois grupos foi que aqueles com fratura apresentavam maior comprometimento da microarquitetura e da mineralização óssea. Mas nos dois grupos as lesões ósseas são muito graves.

A doença de alta remodelação se caracteriza por um aumento da atividade osteoclástica e consequentemente da reabsorção óssea que acaba desequilibrando a remodelação e a microarquitetura óssea com diminuição da conectividade e aumento da separação entre as trabéculas. O grau de mineralização também fica comprometido, pois o osso recém-formado é removido rapidamente sem dar tempo para que a mineralização se complete adequadamente. O aumento da matriz osteóide, as trabéculas ósseas menos rígidas diminuem a dureza do tecido ósseo facilitando a fratura (Zheng et al., 2016, McNerny et al., 2017).

A elevação crônica do PTH diminui a espessura das corticais e aumenta a das trabéculas ósseas, porém, como já comentamos, esse aumento se dá à custa de matriz osteóide. Não encontramos diferenças na espessura e na porosidade das corticais quando comparamos os pacientes com e sem fratura, porém em 4 pacientes com fratura não analisamos as corticais pela dificuldade em separar adequadamente as mesmas do osso trabecular. No entanto, encontramos uma correlação inversa entre os níveis de PTH e a espessura da cortical quando os pacientes foram analisados em conjunto o que sugere que o excesso de PTH contribuiu para diminuir a espessura das mesmas. Sendo o osso cortical o responsável por cerca de 80% da massa óssea, a diminuição da sua espessura pode fazer com que ocorra redução da resistência nesta região, aumentando o risco de fratura (Barger-Lux & Recker, 2002).

Ao analisar as correlações entre os resultados da análise bioquímica e os parâmetros histomorfométricos incluindo todos os pacientes, observamos que os mesmos refletem a remodelação óssea aumentada o que seria esperado, pois não tínhamos pacientes com baixa remodelação. A associação inversa

entre os níveis de fósforo sérico e o intervalo de tempo para mineralização, mesmo fraca, é interessante, pois sugere que diante de uma remodelação óssea aumentada, uma menor concentração de fósforo provavelmente contribui para que a mineralização não se faça corretamente.

Estudos têm avaliado os resultados da análise histomorfométrica com a expressão de proteínas expressas pelos osteócitos no sentido de melhor elucidar a biologia do tecido ósseo, suas participações na remodelação óssea e tipos de osteodistrofia renal (Pereira et al., 2009; Graciolli et al., 2017).

Pereira et al. (2015), estudando biopsias ósseas de crianças e adolescentes com DRC, mostrou aumento da expressão do FGF-23 e do DMP1 já nos estágios iniciais da doença além de uma associação inversa entre elas e a mineralização óssea, enquanto a expressão de MEPE se associou inversamente com o volume ósseo. Já Graciolli et al., (2017) analisando um maior número de pacientes, também em diferentes estágios da DRC, comparou os resultados da análise histomorfométrica com marcadores bioquímicos dos distúrbios do metabolismo mineral, marcadores de proteínas específicas do tecido ósseo, além da expressão das mesmas nesse tecido. Os resultados mostraram que com o progredir da doença ocorre aumento da reabsorção, diminuição da formação e piora da mineralização óssea, além da já conhecida sequencia de eventos dos distúrbios do metabolismo mineral, os níveis séricos de FGF-23 se correlacionaram com a expressão do mesmo no tecido ósseo, o aumento da expressão da SOST e do receptor 1 do paratormônio acontecem nos estágios iniciais, enquanto do FGF-23 e da B catenina fosforilada nos estágios mais tardios. Esse importante estudo mostrou que a disfunção do osteócito é precoce na DRC e o entendimento da mesma

contribuirá para esclarecer a fisiopatologia, melhorar o diagnóstico e provavelmente o tratamento das complicações ósseas desses pacientes.

Nossos resultados também mostraram associações interessantes entre a expressão das proteínas produzidas pelos osteócitos e a remodelação óssea. Quando comparamos a expressão da DMP1 nos pacientes com e sem fraturas, detectamos menor expressão no osso cortical e também no osso trabecular, ficando próximo da significância nesse compartimento. Essa proteína, entre outras funções, atua na mineralização regulando a formação do colágeno tipo I e dos cristais de hidroxiapatita (Suzuki et al., 2012) sugerindo que sua diminuição pode ter contribuído para fragilizar os dois compartimentos facilitando a fratura. Observamos ainda maior expressão da SOST no osso trabecular dos pacientes com fratura. Essa proteína atua inibindo a formação óssea ao inibir a via Wnt (Winkler et al., 2003); o que é corroborado pela menor taxa de formação óssea, menor volume e espessura trabecular observados nesses pacientes.

Quanto à expressão da MEPE nossos resultados mostraram associação positiva com a matriz osteóide (volume e espessura) o que favoreceria retardo na mineralização o que já foi demonstrado em estudo realizado *in vivo* e *in vitro* por Addisson et al. (2010).

Esses resultados contrastam com o observado por Pereira et al. (2009) onde a MEPE se associou inversamente aos parâmetros estruturais (volume ósseo e espessura trabecular). Vale ressaltar que esses autores estudaram crianças e não mostraram os resultados isolados dos pacientes com alta e baixa remodelação óssea. Nossos pacientes além de adultos todos tinham alta remodelação o que pode modificar a expressão das proteínas estudadas.

Nosso estudo apresenta varias limitações entre elas ser um estudo retrospectivo, portanto com informações limitadas. Os critérios de exclusão somente permitiram a análise de um pequeno numero de biópsias e todas com doença óssea de alta remodelação o que impede que esses achados sejam generalizados para pacientes com fratura e baixa remodelação óssea.

No entanto, nosso estudo provavelmente é o primeiro que descreveu as alterações histomorfométricas de biopsias ósseas de pacientes com DRC e fratura, além de, ao "entrar" no tecido ósseo, analisar as proteínas expressas pelos osteócitos e suas associações com a remodelação óssea.

As funções dos osteócitos começam a ser melhor compreendidas, as proteínas expressas por essas células constituem um grande quebra-cabeça que começa a ser decifrado.

6. CONCLUSÕES

1. A análise de 1888 informes de biopsias ósseas de um banco de dados do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo ao longo de 11 anos, revelou uma incidência de fraturas em pacientes tratados com hemodiálise, de 5,5 fraturas/1000 pacientes ano e 51% deles apresentavam intoxicação alumínica.
2. Avaliamos somente os pacientes com fraturas de ossos longos (fêmur/úmero), comparados a pacientes sem fratura, do mesmo sexo, faixa etária e tempo de hemodiálise. A incidência de fraturas foi de 0,82/1000 pacientes ano, com predomínio de jovens (menos de 60 anos), há menos de 10 anos em hemodiálise sendo que 41,2% apresentavam baixa massa óssea, 94% retardo na mineralização e 100% doença óssea de alta remodelação.
3. A análise dos parâmetros bioquímicos revelou que nos pacientes com fratura a concentração de fósforo foi menor que naqueles sem fratura. Incluindo todos os pacientes (com e sem fratura) verificamos que os parâmetros bioquímicos refletiram a remodelação óssea aumentada.
4. A análise histomorfométrica dos pacientes com fratura revelou maior comprometimento da microarquitetura, maior retardo na mineralização óssea sem alteração da espessura e porosidade das corticais quando comparados aos pacientes sem fratura.

5. A análise da expressão de proteínas ósseas nos osteócitos do osso trabecular e cortical demonstrou aumento da expressão da DMP1 nas corticais e da SOST no osso trabecular dos pacientes com fratura comparados aos sem fratura sugerindo a participação das mesmas no retardo de mineralização (DMP1) e na baixa massa óssea (SOST) dos pacientes fraturados.

7. ANEXOS

Figura 1. Expressão da proteína SOST em tecido cortical de paciente com fratura. Aumento 400x.

Figura 2. Expressão de proteína SOST em tecido trabecular de paciente com fratura. Aparente marcação mais concentrada em osteócitos centrais. Aumento 400x.

Figura 3. Expressão de proteína SOST em tecido trabecular de paciente sem fratura. Aumento 200x.

Figura 4. Expressão de proteína SOST em tecido cortical de paciente sem fratura. Marcação difusa ao longo do tecido. Aumento 200x.

Figura 5. Expressão de proteína MEPE em tecido trabecular de paciente com fratura. Observar a não expressão da proteína em osteóide, osteoblastos e tecido fibrótico. Aumento 400x.

Figura 6. Expressão proteína MEPE em tecido cortical de paciente com fratura. Padrão de marcação difuso, porém também sem marcação de outras células, exceto osteócitos. Aumento 200x.

Figura 7. Expressão de proteína MEPE em tecido trabecular de paciente sem fratura. Padrão de marcação em osteócitos mais centrais. Aumento 200x.

Figura 8. Expressão de proteína MEPE em tecido cortical de paciente sem fratura. Padrão de marcação mais difuso pelo tecido. Aumento de 400x.

Figura 9. Expressão de proteína DMP1 em tecido cortical de paciente com fratura. Padrão de marcação em osteócitos e processos dendríticos, bem como lacunas. Aumento de 200x.

Figura 10. Expressão de proteína DMP1 em tecido trabecular de paciente com fratura. Padrão de marcação em osteócitos e processos dendríticos, bem como lacunas. Aumento de 200x.

Figura 11. Expressão de proteína DMP1 em tecido cortical de paciente sem fratura. Padrão de marcação em osteócitos e processos dendríticos, bem como lacunas. Aumento de 200x.

Figura 12. Expressão de proteína DMP1 em tecido trabecular de paciente sem fratura. Padrão de marcação em osteócitos e processos dendríticos, bem como lacunas. Aumento de 200x.

8. REFERÊNCIAS

Adams JE. Quantitative computed tomography. *Eur.J.Radiol.* 2009; 71 (3): 415-24.

Addison WN, Masica DL, Gray JJ, McKee MD. Phosphorylation-dependent inhibition of mineralization by osteopontin ASARM peptides is regulated by PHEX cleavage. *J Bone Miner Res.* 2010; 25: 695-705.

Alem AM, Sherrard DJ, Gillen DL, Weiss NS, Beresford SA, Heckbert SR, et al. Increased risk of hip fracture among patients with end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2000; 58 (1): 396-9.

Anderson HC, Garimella R, Tague SE. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front Biosci.* 2005; 10: 822–837.

Atkins GJ, Rowe PS, Lim HP, Welldon KJ, Ormsby R, Wijenayka AR, Zelenchuk L, Evdokiou A, Findlay DM. Sclerostin is a locally acting regulator of late osteoblast/preosteocyte differentiation and regulates mineralization through a MEPE-ASARM-dependent mechanism. *J Bone Miner Res.* 2011; 26: 1425-1436.

Atkins GJ, Findlay DM. Osteocyte regulation of bone mineral: a little give and take. *Osteoporos Int.* 2012; 23: 2067-79.

Barger-Lux MJ, Recker RR. Bone microstructure in Osteoporosis: Transilial Biopsy and Histomorphometry. *Topics in Magnetic Resonance Imaging.* 2002; 13 (5): 297-306.

Barragan-Adjemian C, Nicolella D, Dusevich V, Dallas MR, Eick JD, Bonewald LF. Mechanism by which MLO-A5 late osteoblast/early osteocytes mineralize in culture: similarities with mineralization of lamellar bone. *Calcif Tissue Int.* 2006; (79): 340-353.

Barreto FC, Barreto DV, Moyses RM, Neves CL, Jorgetti V, Draibe AS, et al. Osteoporosis in hemodialysis patients revisited by bone histomorphometry: A new insight into na old problem. *Kidney Int.* 2006; 69(10): 1852-57.

Beno T, Yoon YJ, Cowin SC, Fritton SP. Estimation of bone permeability using accurate microstructural measurements. *J Biomech.* 2006; 39 (13): 2378-87.

Boskey AL, Robey PG. *The Composition of Bone. Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.* 2013. 8ed. Cap 6:49-56.

Brandi ML, Collin-Osdoby P. Vascular biology and the skeleton. *J Bone Miner Res.* 2006; 21: 183-92.

Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Wong JB, King A, Tosteson A. Incidence and economic burden of osteoporosis related fractures in United States, 2005-2025. *J Bone Miner Res.* 2007; 22: 465-75.

Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and Osteocyte: Games without frontiers. *Arch Biochem Biophys.* 2014; 561: 3-12.

Chappard D, Bizot D, Mobbileau G, Hubert L. Aluminum and bone: Review of new circumstances associated with Al^{3+} deposition in the calcified matrix of bone. *Morphology.* 2016; 100:95-105.

Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3 (3): S131-9.

Cooper C, Campion G, Melton LJ. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporos Int.* 1992; 2 (6): 285-9.

Coco M, Rush H. Increased incidence of hip fracture in dialysis patients with low serum parathyroid hormone. *Am J Kidney Dis* 2000; 36 (6): 1115-21.

Cummings SR, Kelsey JL, Nevitt MC, O'Dowd KJ. Epidemiology of osteoporosis and osteoporotic fractures. *Epidemiol Rev.* 1985; 7: 178-208.

Dallas S, Prideaux M, Bonewald L. The Osteocyte: An Endocrine cell and more. *Endocrine Reviews.* 2013

David V, Martin AC, Hedge AM, Drezner MK, Rowe PS: Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is a new bone renal hormone and vascularization modulator. *Endocrinology.* 2009; 150: 4012-4023.

David V, Martin AC, Hedge AM, Drezner MK, Rowe PS: ASARM peptides: PHEX-dependent and independent regulation of serum phosphate. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011; 300: F783-F791.

Dhanwal DK, Dennison EM, Harvey NC, Cooper C. Epidemiology of hip fracture: Worldwide geographic variation. *Indian J Orthop*. 2011; 45 (1): 15-22.

Dierick H, Bejsovec A. Cellular mechanisms of wingless/Wnt signal transduction. *Current topics in developmental biology*. 1999; 43: 153-90.

Dobbie H, Unwin RJ, Faria NJ, Shirley DG. Matrix extracellular phosphoglycoprotein causes Phosphaturia in rats by inhibiting tubular phosphate reabsorption. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23 (2): 730-733.

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

Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D. Circulating osteoblast-lineage cells in humans. *N Engl J Med*. 2005; 352: 1959-66.

Eknoyan G, Lameire N, Barsoum R, Eckardt KU, Levin A, Levin N, et al. The burden of kidney disease: improving global outcomes. *Kidney Int*. 2004; 66 (4): 1310-4.

Eriksen EF. Normal and pathological remodeling of human trabecular bone: three dimensional reconstruction of remodeling sequence in normals and in metabolic bone disease. *Endocr Rev*. 1986; 7: 379-408.

Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, et al. Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet*. 2006; 38 (11): 1310-1315.

Frost HM. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcif Tissue Res*. 1969; 3 (3): 211-37.

Gattineni J, Bates C, Twombly K, Dwarakanath V, Robinson ML, Goetz R, Mohammadi M, Baum M. FGF-23 decreases renal NaPi-2a e NaPi 2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009; 297 (2):F282-291.

Glass DA, Bialek P, Ahn JD, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Developmental cell* 2005; 8(5): 751-64.

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.

Golub, EE. Biomineralization and matrix vesicles in biology and pathology. *Semin Immunopathol*. 2011; 33: 409-417.

Gomes SA, dos Reis LM, de Oliveira IB, Noronha IL, Jorgetti V, Heilberg IP. Usefulness of a quick decalcification of bone sections embedded in methyl methacrylate [corrected]: an improved method for immunohistochemistry. *J Bone Miner Metab*. 2008; 26 (1): 110-3.

Gowen LC, Petersen DN, Mansolf AL, Qi H, Stock JL,TKalcevic GT, Simmons HA, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, Ke HZ, McNeish JD, Brown TA. Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bone mass. *J Biol Chem*. 2003; 278(3): 1998-2007.

Gracioli FG, Neves KR, Barreto F, Barreto DV, Dos Reis LM, Canziani ME, Sabbagh Y, Carvalho AB, Jorgetti V, Elias RM, Schiavi S, Moysés RMA. The complexity of chronic kidney disease-mineral and bone disorder across stages of chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2017; 91(6): 1436-1446.

Gurley KA,Reimer RJ,Kingsley DM. Biochemical and genetic analysis of ANK in arthritis and bone disease. *Am J Hum Genet*. 2006; 79: 1017-1029.

Hansen D, Olesen JB, Gislason GH, Abrahamsen B, Hommel K. Risk of fractures in adults on renal replacement therapy: a Danish national cohort study. *Nephrol Dial Transplant*. 2016; 31: 1654-1662.

Harmey D, Hessle L, Narisawa S, Johnson KA, Terkeltaub R, Millan JL. Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank*: an integrated model of pathogenesis of mineralization disorders. *Am J Pathol*. 2004; 164:1199-1209.

Hasegawa K, Hasegawa Y, Nagano A. Estimation of bone mineral density and architectural parameters of distal radius in hemodialysis patients using peripheral quantitative computed tomography. *J Biomech*. 2004; 37 (5): 751-6.

Hernandez JD, Wesseling K, Pereira R, Gales B, Harrison R, Salusky IB. Technical approach to iliac crest biopsy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008; 3 (3): S164-9.

Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, Sali A, Goding JW, Terkeltaub R, Millan JL. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 9445-9449.

Limori S, Mori Y, Akita W, Kuyama T, Takada S, Asai T, et al. Diagnostic usefulness of bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in predicting fractures in CKD stage 5D patients: a single-center cohort study. *Nephrol Dial Transplant*. 2012; 27 (1): 345-51.

Incidence and risk factors for hip or other bone fractures among hemodialysis patients in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study. *Kidney Int*. 2014; 85(1): 166–173.

Jamal SA, Gilbert J, Gordon C, Bauer DC. Cortical pQCT measures are associated with fractures in dialysis patients. *J Bone Miner Res*. 2006; 21 (4): 543-8.

Jamal SA. Bone mass measurements in men and women with chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2010; 19 (4): 343-8.

Jamal SA, West SL, Miller PD. Fracture risk assessment in patients with chronic kidney disease. *Osteoporos Int*. 2012; 23 (4):1191-8.

KDIGO Clinical Practice Guidelina for diagnosis, evaluation, prevention and treatment of chronic Kidney disease- Mineral and bone disorder (CKD-MBD). *Kidney Internacional*. 2009; 76, Supplement 113, S1-S130.

Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001; 142: 5050-5.

Kirsch T, Nah HD, Demuth DR, Harrison G, Golub EE, Adams SL, Pacifici M. Annexin V-mediated calcium flux across membranes is dependent on the lipid composition: implications for cartilage mineralization. *Biochemistry*. 1997; 36:3359–3367.

Kim HJ, Minashima T, Mc Carthy EF, Winkles JA, Kirsch T. Progressive ankylosis protein (ANK) in osteoblasts and osteoclasts controls bone formation and bone remodeling. *J Bone Miner Res*. 2010; 25:1771-1783.

Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*. 1997; 390(6655): 45-51.

Larsson T, Marsell R, Schipani E, Ohlsson C, Ljunggren O, Tenenhouse HS, Juppner H, Jonsson KB. Transgenic mice expressing fibroblast growth factor 23 under the control of the alpha 1 (I) collagen promoter exhibit growth retardation, osteomalacia and disturbed phosphate homeostasis. *Endocrinology*. 2004; 145 (7): 3087-3094.

Levey AS, Atkins R, Coresh J, Cohen EP, Collins AJ, Eckardt KU, et al. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int*. 2007; 72 (3): 247-59.

Lian JB, Stein GS, Javed A, Van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, et al. Network and hubs for transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endrocr Metab Disord*. 2006; 7: 1-16.

Lindberg JS, Moe SM. Osteoporosis in end-state renal disease. *Semin Nephrol*. 1999; 19 (2): 115-22.

Liu S, Guo R, Simpson LG, Xiao ZS, Burnham CE, Quarles LD. Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX. *J Biol Chem*. 2003; 278(39): 37419-37426.

Mac Way F, Lessard M, Lafage-Proust, MH. Pathophysiology of chronic kidney disease-mineral and bone disorder. *Joint Bone Spine*. 2012; 544-549.

Maravic M, Ostertag A, Torres PU, Cohen-Solal M. Incidence and risk factors for hip fractures in dialysis patients. *Osteoporos Int*. 2014; 25 (1): 159-65.

McNerny EMB, Nickolas TL. Bone Quality in Chronic kidney disease: Definitions and diagnosis. *Cur Osteoporos Rep*. 2017; S 11914-17.

Miller PD. Chronic kidney disease and osteoporosis:evaluation and management. *BoneKEy Reports*. 2014; 3, 542.

Miller, PD. Underdiagnoses and Undertreatment of Osteoporosis: The Battle to be Won. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016; 101(3): 852-859.

Murshed M,Harmey D, Millan JL, McKee MD, Karsenty G. Uinique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev*. 2005; 19: 1093-1104.

Myamoto K, Ito M, Kuwahata M, Kato S, Segawa H. Inhibition of intestinal sodium-dependent inorganic phosphate transport by fobroblast growth factor 23. *Ther Apher Dial*. 2005; 9(4): 331-335.

Negri AL, Barone R, Lombas C, Bogado CE, Zanchetta JR. Evaluation of cortical bone by peripheral quantitative computed tomography in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients *Hemodial Int*. 2006; 10 (4): 351-5.

Neuman WF, Neuman MW, Diamond AG, Menanteau J, Gibbons WS. Blood:bone disequilibrium. VI. Studies of the solubility characteristics of brushite: apatite mixtures and their stabilization by noncollagenous proteins of bone. *Calcif Tissue Int.* 1982; 34:149–157.

Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nihon Med Sch.* 2010; 77:4-12.

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. Report of ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987; 2 (6); 595-610.

Parfitt AM. The mechanism of coupling: a role for the vasculature. *Bone.* 2000; 26: 319-23.

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

Pereira RC, Valta H, Tumber N, Salusky IB, Jalanko H, Mäkitie O, Wesseling-Perry K. Altered Osteocyte-Specific Protein Expression in Bone after Childhood Solid Organ Transplantation. *PLoS One.* 2015; 10 (9): e0138156.

Pothuaud L, Benhamou CL, Porion P, Lespessailles E, Harba R, Levitz P. Fractal dimension of trabecular bone projection texture is related to three-dimensional microarchitecture. *J Bone Miner Res.* 2000; 15 (4): 691-9.

Qin L, Qin P, Wang L, Li X, Swarthout JT, Soteropoulos P, et al. Gene expression profiles and transcription factors involved in parathyroid hormone signaling in osteoblasts revealed by microarray and bioinformatics. *J Biol. Chem.* 2003; 278: 19723-31.

Rehman MTA, Hoyland JA, Denton J, Freemont AJ. Age related histomorphometric changes in bone in normal British men and women. *J Clin Pathol.* 1994; 47: 529-534.

Revisiting KDIGO clinical practice guideline on chronic kidney disease—mineral and bone disorder: a commentary from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes controversies conference. *Kidney International*. 2015; 87: 502–508.

Rowe PS, de Zoysa PA, Dong R, Wang HR, White KE, Econs MJ, Oudet CL. MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia. *Genomics*. 2000, 67: 54-68.

Rowe PS. The wracked pathways of FGF-23, MEPE and PHEX. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004; 15: 264-281.

Rowe PS: The chicken or the egg: PHEX FGF23 and SIBLINGS unscrambled. *Cell Biochem Funct*. 2012. 30: 355-375.

Russo CR, Taccetti G, Caneva P, Mannarino A, Maranghi P, Ricca M. Volumetric bone density and geometry assessed by peripheral quantitative computed tomography in uremic patients on maintenance hemodialysis. *Osteoporos Int*. 1998; 8 (5): 443-8.

Suzuki S, Haruyama N, Nishimura F, Kulkarni AB. Dentin sialophosphoprotein and dentin matrix protein-1: Two highly phosphorylated proteins in mineralized tissues. *Arch Oral Biol*. 2012; 57 (9): 1165-75

Taubman-Tink J, Barnstable CJ. Osteoblasts and osteoclasts express PEDF; VEGF-A isoforms and VEGF receptors: possible mediators of angiogenesis and matrix remodeling in the bone. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 316: 573-9.

Terkeltaub RA. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001; 281: C1-C11.

Wagner J, Jhaveri KD, Rosen L, Sunday S, Mathew AT, Fishbane S. Increased bone fractures among elderly United States hemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2014; 29 (1): 146-51.

West SL, Lok CE, Langstedmo L, Cheung AM, Szabo E, Pearce D, Fusaro M, Wald R, Weinstein J, Jamal SA. Bone mineral density predicts fractures in chronic kidney disease. *J Bone Miner. Res.* 2015; 30 (5): 913-9.

Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene.* 2004; 341: 19-39.

Williams BO, Insogna KL. Where Wnts went: the exploding field of Lrp5 and Lrp6 signaling in bone. *J Bone Miner Res.* 2009; 24(2): 171-8.

Winkler DG, Sutherland MK, Georghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *Embo J.* 2003; 22 (23): 6267-76.

Wu LN, Yoshimori T, Genge BR, Sauer GR, Kirsch T, Ishikawa Y, Wuthier RE. Characterization of the nucleational core complex responsible for mineral induction by growth plate cartilage matrix vesicles. *J Biol Chem.* 1993; 268: 25084–25094.

Wu LN, Genge BR, Dunkelberger DG, LeGeros RZ, Concannon B, Wuthier RE. Physicochemical characterization of the nucleational core of matrix vesicles. *J Biol Chem.* 1997; 272: 4404–4411.

Yavropoulou MP, Yovos JG. The role of the Wnt signaling pathway in osteoblast commitment and differentiation. *Hormones* 2007; 6(4): 279-94.

Zheng CM, Zheng JQ, Wu CC, Lu CL, Shyu JF, Yung-Ho H, Wu MY, Chiu IJ, Wang YH, Lin YF, Lu KC. Bone loss in chronic kidney disease: Quantity or Quality?. *Bone.* 2016; 6 (87): 57-70.

Zuscik, MJ. Skeletal Healing. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism.* 2013. 8ed. Cap 11:90-98.