RAQUEL FERNANDES VANDERLEI VASCO

**Efeitos dos diuréticos furosemida e hidroclorotiazida
sobre o distúrbio mineral e ósseo da doença renal
crônica**

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

Programa de Nefrologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosilene Motta
Elias

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Vasco, Raquel Fernandes Vanderlei
Efeitos dos diuréticos furosemida e
hidroclorotiazida sobre o distúrbio mineral e ósseo
da doença renal crônica / Raquel Fernandes Vanderlei
Vasco. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.
Orientadora: Rosilene Motta Elias.

Descritores: 1.Diuréticos 2.Furosemida
3.Hidroclorotiazida 4.Hiperparatireoidismo
5.Distúrbio mineral e ósseo na doença renal crônica
6.Densidade óssea

USP/FM/DBD-199/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Aos meu pais, **José Maria e Marileide**, que sempre me apoiaram e me permitiram alcançar meus objetivos, superando a saudade de anos longe de casa.

Aos meus irmãos, **Rafael e Rodrigo**, pelo apoio e incentivo ao longo do caminho.

À minha prima, **Edoarda**, que conviveu comigo durante todo o processo e me apoiou em todos os momentos.

À minha segunda mãe, **Iraci**, que chorou quando eu parti e rezou pelo meu retorno bem sucedido.

AGRADECIMENTOS

À **Dra. Rosilene Motta Elias**, pela orientação, oportunidade e ensinamentos. Agradeço ainda pelo carinho, compreensão e suporte contínuo como minha amiga, o que fez essa jornada menos árdua e mais gratificante.

À equipe do laboratório LIM 16 da FMUSP, pelo apoio e ensino das técnicas laboratoriais, em especial à **Dra. Rosa Maria Affonso Moysés**, pelo suporte e ensinamentos.

À equipe da reumatologia LIM 17 da FMUSP pelo apoio e realização dos exames de imagem do projeto, em especial à **Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira** e a **Lilium Takayama Guerra**.

À equipe do ambulatório e da enfermagem da Nefrologia, em especial a **Isis Ferreira**, pelo apoio durante a realização do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação da Disciplina de Nefrologia da FMUSP, na pessoa do **Dr. Luis Yu**, pelo apoio e suporte acadêmico.

À Disciplina de Nefrologia representada por seus titulares **Prof. Dr. Roberto Zatz** e a **Profa. Dra. Irene Noronha** pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Aos pacientes, pela participação no estudo.

*“If we falter in resolve
Just because the task is hard,
No accomplishment can follow:
It is the world’s way.”*

Imperador Meiji

(Sorte retirada pessoalmente no Templo Meiji – 05/10/2016)

Sumário

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO.....	2
1.1	Mecanismo de ação dos diuréticos nos túbulos renais	5
1.2	Efeitos dos diuréticos no metabolismo mineral e efeitos adversos	9
1.3	Impacto dos diuréticos sobre a densidade óssea e fraturas	10
1.4	Impacto da DRC sobre a densidade e microarquitetura óssea	12
1.5	Uso de diuréticos e a DMO-DRC, mecanismos extra renais envolvidos	16
1.6	Justificativa e interesse científico	18
2	OBJETIVOS	20
3	MÉTODOS	22
3.1.	DELINEAMENTO E POPULAÇÃO DE ESTUDO	22
3.2.	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	23
3.3.	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	23
3.4.	PROTOCOLO DE PESQUISA	24
3.4.1	Avaliação de adesão à farmacoterapia	24
3.4.2.	Avaliação de efeitos colaterais.....	25
3.4.3.	Avaliação laboratorial.....	25
3.4.4	Avaliação da estrutura óssea.....	26
3.5	COLETA E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	28
3.5.1	Amostragem e cálculo de poder.....	29
3.6.	ASPECTOS ÉTICOS.....	30
4	RESULTADOS	32
5	DISCUSSÃO.....	49
6	CONCLUSÕES.....	59
7	REFERÊNCIAS	61
8	APÊNDICES	66

Listas

FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática da reabsorção de cálcio pelos diferentes segmentos do néfron.....	6
Figura 2 -	Representação esquemática da célula do ramo espesso da Alça de Henle e o mecanismo de ação dos diuréticos de alça	7
Figura 3 -	Representação esquemática da célula do túbulo contorcido distal e o mecanismo de ação dos diuréticos tiazídicos.....	8
Figura 4 -	Desenho esquemático do estudo. Estudo prospectivo com sorteio randômico do grupo de intervenção	24
Figura 5 -	Imagem 3D do rádio e tíbia distal criada pela HRpQCT	27
Figura 6 -	Imagens geradas pela DXA para aferição de DMO	27
Figura 7 -	Fluxograma do estudo	35
Figura 8 -	Efeito dos diuréticos sobre as alterações bioquímicas e hormônios calciotrópicos.	38 e 39
Figura 9 -	Mudança percentual anual em relação ao basal dos hormônios calciotrópicos e marcadores ósseos, por grupo de estudo.	40
Figura 10 -	Mudança percentual em 1 ano em relação ao basal na DMO aferida pela DXA, por grupo de estudo.....	43
Figura 11 -	Mudança percentual em 1 ano em relação ao basal na DMO e parâmetros estruturais aferidos pela HRpQCT da tíbia (A) e rádio (B), por grupo de estudo	46

TABELAS

Tabela 1 -	Características demográficas e bioquímicas antes da randomização	32
Tabela 2 -	Parâmetros laboratoriais basal e após 1 ano, por grupo de estudo.	36
Tabela 3 -	Dados de densitometria óssea antes da randomização	42
Tabela 4 -	Dados de HRpQCT antes da randomização	44

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

Alb	Albumina
AU	Ácido úrico
BV/TV	Relação entre volume ósseo e volume total de tecido
CaT	Cálcio Total
Cai	Cálcio iônico
Ca/Cr	Relação cálcio/creatinina urinária
CaUr	Cálcio Urinário de 24h
Cl	Cloro
Cr	Creatinina
CTX	<i>C-terminal telopeptide of type I collagen</i>
DMO	Densidade Mineral Óssea
DMO-DRC	Distúrbio mineral e ósseo da doença renal crônica
DRC	Doença renal crônica
DXA	Densitometria óssea de dupla emissão com fonte de raio-X (DXA)
FA	Fosfatase Alcalina
FAo	Fosfatase Alcalina óssea
FE Ca%	Fração de excreção de cálcio (em porcentagem)
FE P%	Fração de excreção de fósforo (em porcentagem)
FE Na%	Fração de excreção de sódio (em porcentagem)
FGF-23	Fator de crescimento de fibroblastos – 23
FURO	Furosemida
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HIDRO	Hidroclorotiazida
HPT	Hiperparatireoidismo
HRpQCT	Tomografia computadorizada periférica quantitativa de alta resolução
K	Potássio
KDIGO	<i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
K/DOQI	<i>Kidney Disease Outcomes Quality Initiative</i>
Mg	Magnésio

Na	Sódio
NaUr	Sódio urinário de 24h
NCC	Cotransportador sódio-cloro
NCX1	Trocador sódio-cálcio
NKCC	Cotransportador sódio-potássio-cloro
P1NP	<i>Procollagen of type-1 N terminal propeptide</i>
P	Fósforo
PUr	Fósforo urinário de 24h
PA	Pressão arterial
PTH	Paratormônio
Rel CaT/PTH	Relação Cálcio Total Paratormônio
Rel PTH/ 1,25(OH) ₂ VitD	Relação Paratormônio/1,25 dihidroxi-vitamina D
TFG	Taxa de filtração glomerular
Trap5b	<i>tartrate-resistant acid phosphatase 5b</i>
TRPV5	Receptor potencial transiente vaniloide 5
Ur	Ureia
Vs.	Versus
25(OH)VitD	25 hidroxí-vitamina D
1,25(OH) ₂ VitD	1,25 dihidroxi-vitamina D

RESUMO

Vasco RFV. *Efeitos dos diuréticos furosemida e hidroclorotiazida sobre o distúrbio mineral e ósseo da doença renal crônica* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. 2019.

Introdução: Pacientes com doença renal crônica (DRC) apresentam com frequência hipertensão e como a retenção de líquidos é um dos principais mecanismos fisiopatológicos, o uso de diuréticos é comum nesta população. Enquanto os diuréticos tiazídicos estão associados à redução da calciúria, redução/manutenção dos níveis paratormônio e aumento da densidade óssea, os diuréticos de alça apresentam efeito oposto. Estes efeitos, embora conhecidos na população geral, não foram suficientemente avaliados em pacientes com DRC.

Objetivo: Este estudo propõe a avaliação da furosemida e hidroclorotiazida no distúrbio mineral e ósseo da doença renal crônica (DMO-DRC). **Métodos:** Ensaio clínico randomizado para comparar o efeito de duas intervenções, o uso de diurético tiazídico (grupo HIDRO - hidroclorotiazida 25mg/dia) e o uso de diurético de alça (grupo FURO - furosemida 40mg/dia) sobre o DMO-DRC. Incluídos pacientes com DRC estágio 3, estáveis, em acompanhamento regular ambulatorial. Após um período de *wash-out*, os pacientes foram randomizados para o grupo HIDRO ou FURO e seguidos prospectivamente a cada 3 meses por 1 ano, pelo mesmo observador, cego para a randomização. Foram avaliadas alterações bioquímicas séricas e urinárias no momento da inclusão e a cada 3 meses; paratormônio e vitamina D foram avaliados na inclusão e a cada 6 meses; marcadores de remodelação óssea (CTX e P1NP), densitometria (absortometria radiológica com dupla energia- DXA) e tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução (HRpQCT) foram avaliados na inclusão e após 1 ano. **Resultados:** foram incluídos 40 pacientes [61,8 (54,73) anos, 65% homens e 70% hipertensos], sendo 20 randomizados para cada grupo, os quais apresentaram características semelhantes após a randomização. Houve redução da calciúria e fração de excreção de cálcio no grupo HIDRO e aumento no grupo FURO, além de uma tendência ao efeito da medicação sobre a concentração de cálcio total, maior no grupo HIDRO. Não foi observada diferença nos níveis de paratormônio e 25-hidroxi-vitamina D, mas houve tendência à elevação de 1,25 dihidroxi-vitamina D no grupo FURO e redução no grupo HIDRO. Houve elevação de CTX, P1NP e fosfatase alcalina no grupo FURO e redução no grupo HIDRO. Não foi encontrada diferença significativa na mudança percentual da densidade óssea aferida pela DXA, apenas uma tendência a maior perda no 1/3 proximal do rádio distal, mais acentuada no grupo FURO. Na HRpQCT, no grupo FURO houve aumento da área cortical e espessura cortical, além de tendência ao aumento da densidade total e da densidade cortical, mas com redução da área trabecular no rádio, enquanto no grupo HIDRO o efeito oposto foi observado. Resultados da HRpQCT devem ser interpretados com cautela devido a dados incompletos. **Conclusão:** Furosemida e hidroclorotiazida tiveram efeitos opostos sobre o DMO-DRC em médio prazo. Embora o paratormônio não tenha se alterado significativamente, a furosemida se relacionou com um aumento e a hidroclorotiazida com redução da remodelação óssea, evidenciada pela CTX e P1NP.

Descritores: diuréticos; furosemida; hidroclorotiazida; hiperparatireoidismo; distúrbio mineral e ósseo na doença renal crônica; densidade óssea.

ABSTRACT

Vasco RFV. *Effects of diuretics furosemide and hydrochlorothiazide on chronic kidney disease-mineral and bone disorder* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Introduction: Patients with chronic kidney disease (CKD) often have hypertension and since fluid retention is a main pathophysiological mechanism, the use of diuretic is common in this population. While thiazide diuretics are associated with reduced calciuria, reduction/maintenance of parathyroid hormone levels and increased bone density, loop diuretics have the opposite effect. Although these effects are known in the general population, they have not been sufficiently evaluated in patients with CKD. **Objective:** This study intends to evaluate the effects of furosemide and hydrochlorothiazide in chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD). **Methods:** This was a randomized clinical trial comparing the effect of two drugs, thiazide diuretic (hydrochlorothiazide 25mg/day – HIDRO group) and loop diuretic (furosemide 40mg/day – FURO group) on the CKD-MBD. We included patients with stage 3 CKD, stable, in regular outpatient follow-up. After a washout period, patients were randomized to either the HIDRO or FURO group and followed prospectively every 3 months for 1 year, by the same observer, blinded to randomization. Serum and urinary biochemical changes were evaluated upon the inclusion and every 3 months; parathyroid hormone and vitamin D were evaluated at the inclusion and every 6 months; bone remodeling markers (CTX and P1NP), densitometry (DXA) and high-resolution peripheral quantitative computed tomography (HRpQCT) were evaluated at the inclusion and after one year. **Results:** 40 patients [61,8 (54,73) years, 65% male and 70% hypertensive) were included, and 20 were randomized to each group that presented similar characteristics after randomization. There was a reduction of calciuria and fraction of calcium excretion in the HIDRO group and an increase in the FURO group. There was a tendency of the medication effect in the total calcium concentration, which was higher in the HIDRO group. There was no difference in parathormone and 25-hydroxy-vitamin D levels, albeit there was a tendency to increase of 1,25 dihydroxy-vitamin D in the FURO group and a reduction in the HIDRO group. CTX, P1NP and alkaline phosphatase increased in the FURO group and reduced in the HIDRO group. No significant difference was found in the percentage change of bone density measured by DXA, only a tendency to greater loss in the proximal 1/3 of distal radius, more pronounced in the FURO group. Regarding HRpQCT, we found an increase in cortical area and cortical thickness, in addition to a tendency to increase of total density and cortical density, but with reduction of the trabecular area in the radius, in the FURO group, whereas in the HIDRO group the opposite effect was observed. **Conclusion:** Furosemide and hydrochlorothiazide had opposite effects on the CKD-MBD in the medium-term follow-up. Although parathormone did not change significantly, furosemide appears to be associated with an increase and hydrochlorothiazide with reduced bone remodeling, evidenced by CXT and P1NP.

Descriptors: diuretics; furosemide; hydrochlorothiazide; hyperparathyroidism; chronic kidney disease-mineral and bone disorder; bone density.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Doença renal crônica (DRC) é definida como queda da taxa de filtração glomerular (TFG) abaixo 60 ml/min/1.73m² ou presença de marcadores de lesão renal, ou ambos, por pelo menos 3 meses. É considerada um problema de saúde pública (1). Suas principais causas são diabetes e hipertensão arterial e foi associada à causa de morte em 1,5% da população mundial em 2012 (2).

Pacientes com DRC apresentam com frequência elevação da pressão arterial (PA), sendo a retenção de volume um dos mecanismos associados. Por esta razão, o uso de diuréticos é prática difundida e recomendada nesta população (3). Diuréticos são drogas de primeira linha para tratamento de hipertensão, que agem em diferentes partes do túbulo renal aumentando o débito urinário por mecanismos diversos. Em geral, os diuréticos de alça e tiazídicos são os mais utilizados em pacientes com DRC devido a sua capacidade de aumento da excreção de potássio, dessa forma auxiliando no controle de hipercalemia, que pode surgir nessa população.

Na prática clínica, pacientes com função renal mais comprometida utilizam diuréticos de alça como a furosemida, mais potentes. Por outro lado, aqueles com disfunção mais leve recebem como prescrição diuréticos tiazídicos, sendo a hidroclorotiazida o principal representante desta classe. Apesar de historicamente não se prescrever tiazídicos em pacientes com TFG < 30ml/min, atualmente esta classe de diuréticos é recomendada caso o paciente não apresente dificuldades no controle da PA ou sobrecarga de

volume, devido a possibilidade deste diurético ter uma ação anti-hipertensiva independente da diurese, através de mecanismos como a vasodilatação periférica (4).

Outra complicação importante associada à DRC é o distúrbio do metabolismo mineral e ósseo (DMO-DRC), que inclui alterações laboratoriais (no metabolismo do cálcio, fósforo, paratormônio e vitamina D), calcificações anormais (como as calcificações vasculares e em outros tecidos), além de alterações ósseas (anormalidades no remodelamento ósseo, mineralização, entre outros). Estas alterações são responsáveis por fraturas, doença cardiovascular e mortalidade nesse grupo de pacientes (5).

O conhecimento sobre o desenvolvimento e progressão da DMO-DRC nos estágios 3 a 5, antes da diálise, é relativamente escasso. No entanto, desfechos desfavoráveis como o aumento de incidência de fratura e mortalidade já são observados quando a TFG cai abaixo de 60 ml/min/1.73m² (6, 7). Alterações mais precoces incluem: aumento dos níveis circulantes de fator de crescimento de fibroblastos (FGF-23) e deficiência de vitamina D, seguidas por aumento do paratormônio (PTH) e da fração de excreção de fósforo a partir do estágio 3 (TFG < 60ml/min/1.73m²), e finalmente em estágios mais avançados, alterações nos níveis de cálcio e fósforo (8). A elevação do PTH secundária à queda da função renal, definida como hiperparatireoidismo (HPT) secundário, é uma alteração precoce na evolução da DRC. Entretanto, a concentração de PTH ideal em cada fase da doença renal ainda é desconhecida. Previamente recomendado pelas diretrizes K/DOQI, os níveis de PTH adequados eram de 35 a 70 pg/ml, 70 a

110 pg/ml, e 150 a 300 pg/ml para os estágios 3, 4 e 5 respectivamente. As diretrizes atuais do KDIGO recomendam que pacientes com aumento progressivo de PTH ou persistentemente acima do valor de referência do ensaio, devam ser avaliados quanto à hiperfosfatemia, hipocalcemia, alta ingestão de fósforo e deficiência de vitamina D. Além disso, o controle dessas alterações com dieta ou quelantes, suplementação de cálcio e/ou vitamina D, correção de acidose metabólica fazem parte da terapêutica atual (5).

Existem inúmeros fatores que interferem no metabolismo mineral e ósseo e são associados a um pior desfecho de estrutura óssea, independente da função renal, como por exemplo o sedentarismo, tabagismo, consumo de álcool, pós-menopausa, além de inúmeros medicamentos como corticosteroides, anticonvulsivantes, inibidor de bomba de prótons, entre outros. Mais recentemente, os anti-hipertensivos tem sido objetivo de estudos em população de não renais crônicos, devido a relação de HAS e elevação do PTH (9). Entre as drogas estudadas, os diuréticos de alça e os tiazídicos tem se destacado pelos efeitos opostos sobre o metabolismo do cálcio e calciúria, como será explicado a seguir.

1.1 Mecanismo de ação dos diuréticos nos túbulos renais

Os diuréticos, principalmente os tiazídicos e diuréticos de alça, são drogas muito utilizadas em pacientes com DRC para controles de PA e estado edematoso, agindo em diferentes porções dos túbulos renais para aumento do volume urinário. Os diuréticos de alça, como a furosemida, agem na porção espessa da alça de Henle, inibindo o cotransportador sódio-potássio-cloro (NKCC) localizado na membrana apical, reduzindo a reabsorção tubular de sódio e cloro. Os diuréticos tiazídicos, como a hidroclorotiazida, agem no túbulo contorcido distal, ligando-se ao cotransportador sódio-cloro (NCC), inibindo também a reabsorção de sódio e cloro. Ao inibir o transporte de sódio, aumentando sua excreção, os diuréticos aumentam consequentemente a eliminação de água (solvente) e o volume urinário (10).

Ao alterar a reabsorção de Na e Cl nos túbulos renais, os diuréticos também alteram a reabsorção de outros íons, como o cálcio. Em indivíduos hígidos, praticamente todo cálcio filtrado pelos rins é reabsorvido ao longo dos túbulos renais, em diferentes proporções, como demonstrado pela Figura 1 (11). A reabsorção de 60-70% do cálcio é feita pelo túbulo proximal por 2 mecanismos: 1) mais de 80% ocorre por meio de difusão passiva e arraste do solvente, em paralelo à reabsorção de sódio e água; e 2) 10-15% por transporte ativo regulado pelo PTH e calcitonina (12).

Figura 1. Representação esquemática da reabsorção de cálcio pelos diferentes segmentos do néfron. Cálcio filtrado pelos glomérulos é reabsorvido em torno de 60-70% no túbulo contorcido proximal (TCP). Os segmentos corticais da alça de Henle (AH) reabsorvem em torno de 20%, apenas na porção espessa. Aproximadamente 10% do cálcio filtrado é reabsorvido no túbulo contorcido distal (TCD), e 3-10% no duto coletor (DC). Adaptado de Clin J Am Soc Nephrol 10, Renal Regulation of Calcium, Phosphate, and Magnesium, Blaine et al pág 1259, Julho, 2015.

© Copyright Clearance Center - Order License Id: 4600510185352.

No ramo espesso da alça de Henle, a reabsorção de cálcio é em torno 20%, sendo realizada por via paracelular. A reabsorção por via paracelular é proporcional à “força de arrasto” gerada pelo gradiente eletroquímico transtubular. A reabsorção de sódio e cloro através do NKCC na membrana apical é eletroneutra, sendo que estes íons então transportados para a corrente sanguínea pela membrana basolateral via bomba de sódio-potássio-ATPase e canal de cloro. No entanto, a reabsorção de potássio pelo NKCC gera acúmulo deste cátion intracelular, que se difunde de volta para o lúmen tubular por canais específicos para potássio e muito abundantes na membrana luminal, os canais de ROMK. Estabelece-se assim um alto fluxo de potássio em direção ao lúmen tubular, gerando

potencial positivo no lúmen, enquanto a saída de cloro pelos canais de cloro na membrana basolateral, aumenta a negatividade intersticial, dessa forma propiciando um fluxo passivo de cátions, como cálcio e magnésio através das junções intercelulares (Figura 2). Quando os diuréticos de alça inibem o NKCC, este gradiente positivo do lúmen tubular desaparece, reduzindo a absorção de cálcio nessa porção túbulo renal (11).

Figura 2. Representação esquemática da célula do ramo espesso da Alça de Henle e o mecanismo de ação dos diuréticos de alça. A inibição do cotransportador sódio-potássio-cloro (NKCC) reduz drasticamente a absorção de NaCl, e em consequência, a de cálcio e magnésio. Adaptado de Clin J Am Soc Nephrol 09, Physiology of the Thick Ascending Limb, Mount pág 1975, novembro, 2014.

© Copyright Clearance Center - Order License Id: 4600510872282

No túbulo contorcido distal, o cálcio é exclusivamente absorvido por via transcelular, que corresponde a cerca de 5-10% do íon filtrado. Esta absorção ocorre de forma ativa, contra o gradiente eletroquímico, em três etapas: primeiro, a entrada de cálcio pela membrana apical através do receptor potencial transiente vaniloide 5 (TRPV5). Segundo o cálcio se difunde pelo citosol ligado às calbindinas, e por fim ao chegar à membrana

basolateral, ele é lançado na corrente sanguínea via trocador sódio-cálcio (NCX1) e bomba de cálcio-ATPase (PMCA1b) (Figura 3). Os diuréticos tiazídicos, ao inibirem o NCC, diminuem o transporte de cloro, o que resulta em aumento da eletronegatividade luminal, levando a abertura dos canais de cálcio voltagem sensíveis (TRPV5) na membrana apical, e consequente maior reabsorção de cálcio. Além disso, a diminuição do transporte de sódio, aumenta a atividade do NCX1 e extrusão do cálcio para corrente sanguínea pela membrana basolateral. Os tiazídicos também aumentam a reabsorção de cálcio no túbulo proximal ao causarem hipovolemia, estimulando maior reabsorção de sódio e água neste seguimento do túbulo e consequente absorção de cálcio por transporte passivo e arraste do solvente (11).

Figura 3. Representação esquemática da célula do túbulo contorcido distal e o mecanismo de ação dos diuréticos tiazídicos. Os tiazídicos inibem o cotransportador sódio-cloro (NCC), diminuindo assim a absorção transcelular de NaCl neste seguimento. Adaptado de Clin J Am Soc Nephrol 10, Renal Regulation of Calcium, Phosphate, and Magnesium, Blaine et al. pág 1261, Julho, 2015.

1.2 Efeitos dos diuréticos no metabolismo mineral e efeitos adversos

Partindo-se do mecanismo de ação dos diuréticos, ora aumentando a calciúria (no caso da furosemida), ora diminuindo-a (no caso dos tiazídicos), é de se esperar que o cálcio sérico possa se alterar, mesmo que dentro da faixa de normalidade, com consequente repercussão na concentração de PTH (13, 14). Dessa forma, em um estudo transversal comparando efeitos de diversos anti-hipertensivos, 1888 indivíduos com função renal normal e sem HPT primário foram avaliados; aqueles em uso de tiazídicos apresentaram as menores concentrações de PTH (44,4 vs. 46,9 pg/ml, $p < 0,02$), enquanto indivíduos em uso de diurético de alça apresentaram os maiores valores (PTH 60,7 vs. 45,5 pg/ml, $p < 0,0001$) (15). Confirmando estes achados, um estudo randomizado mostrou que o diurético de alça bumetanida, após 1 ano de uso, aumentou a reabsorção óssea, através da dosagem da concentração plasmática de *C-terminal telopeptide of type I collagen* (CTX) em associação com aumento na calciúria (17%) e concentração de PTH (9%), quando comparados com placebo, sendo que 6 meses após o término do tratamento os efeitos do diurético ainda estavam presentes (16).

Outro estudo randomizado comparou diuréticos tiazídicos e diuréticos de alça em um grupo de 40 mulheres após a menopausa, com função renal normal, que já apresentavam osteopenia. Tiazídicos provocaram uma diminuição do cálcio urinário, um aumento nos níveis de cálcio plasmático, um discreto aumento na 1,25 hidroxí-vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{VitD}$), mas não houve alteração na concentração de PTH. Por outro lado, o diurético de alça

aumentou a calciúria, o PTH e a $1,25(\text{OH})_2\text{VitD}$, efeito relacionado ao aumento da dose ao longo do estudo (17).

Os diuréticos assim como outras drogas apresentam efeitos adversos que devem ser monitorados e corrigidos. A associação de diuréticos tiazídicos com a incidência de hipercalcemia tem aumentado nas duas últimas décadas, mas na maioria dos casos a concentração de cálcio retorna ao normal após a suspensão da droga, exceto nos casos de HPT primário (18). Hiponatremia é mais comum com diuréticos tiazídicos do que com os de alça, pois eles aumentam a excreção de sódio e impedem a capacidade máxima de diluição urinária, enquanto preservam a habilidade inerente de concentração. Ambas as classes de diuréticos são associadas à hipocalcemia, aumentando a secreção distal de potássio, e hipomagnesemia, inibindo a reabsorção de magnésio. Alcalose metabólica leve é comum em usuários de tiazídicos, enquanto alcalose metabólica grave pode ser observada com uso de diuréticos de alça. Hiperuricemia, hiperglicemia e hiperlipidemia são mais comuns com uso de tiazídicos (10).

1.3 Impacto dos diuréticos sobre a densidade óssea e fraturas

O efeito dos diuréticos na densidade mineral óssea (DMO) e o impacto sobre a incidência de fraturas tem sido alvo de muitos estudos nas últimas décadas, principalmente em mulheres após a menopausa. Os tiazídicos têm sido associados a um aumento da DMO e menor risco de fratura de quadril (19-21), enquanto diuréticos de alça aparentam ter efeito

oposto (16, 22).

Os efeitos da furosemida na homeostase do cálcio e metabolismo ósseo são um pouco mais conhecidos do que os dos diuréticos tiazídicos. Estudos demonstraram que o uso de furosemida em mulheres após a menopausa e com função renal normal se associou a um aumento do risco de fraturas de 1,5 a 4 vezes (23-25). Rejnmark et al. (2006) demonstraram uma diminuição significativa da DMO em 2% no fêmur total e rádio ultradistal e 1,4% no corpo inteiro em um estudo randomizado placebo-controlado com diurético de alça bumetamida em mulheres menopausadas, após um ano de uso da medicação (16).

Outro estudo também em mulheres pós menopausa observou que os diuréticos tiazídicos promoveram melhora da DMO em 2 anos de uso de hidroclorotiazida na dose de 50mg ao dia. O efeito benéfico se estendeu em até 4 anos de uso, com aumento significativo da DMO em 0,9% no corpo total e 1,4% no rádio ultradistal, comparado com placebo (19). Quanto ao risco de fraturas, a clortalidona foi associada a um menor risco de fraturas de quadril (RR 0,79; 95% IC, 0,58-0,98), quando comparado ao lisinopril ou anlodipino em 5 anos de seguimento (21).

Entretanto, mesmo se considerando ações de diuréticos tiazídicos e de alça em sentidos opostos na calciúria e no risco de fraturas, a literatura mostra resultados conflitantes. Assim, embora a maior parte dos estudos mostre que o uso de diuréticos tiazídicos diminui o risco de fraturas (26-29), alguns mostram o inverso (23, 30). É possível que o tempo para verificar o

evento possa influenciar nestes resultados conflitantes, tendo um estudo mostrado que os tiazídicos podem, agudamente, aumentar o risco de fratura pelo aumento do risco de hipotensão e queda, o que diminui com o tempo de uso (31). Da mesma forma, ainda que a maioria dos estudos mostre aumento do risco de fratura com o uso de diuréticos de alça (25, 32), alguns estudos não conseguiram demonstrar este desfecho (33).

1.4 Impacto da DRC sobre a densidade e microarquitetura óssea

O esqueleto é um órgão metabolicamente ativo e tem um importante papel na homeostase do cálcio e fósforo, uma vez que armazena a maior quantidade destes íons na forma de cristais de hidroxiapatita. A estrutura óssea é composta de dois tipos de osso – o cortical e o trabecular. O osso cortical é mais denso, responsável pela sustentação do organismo, tem baixa remodelação óssea e predomina nos ossos longos. Já o osso trabecular é menos denso, com traves ósseas (as trabéculas), tem maior remodelação óssea e é mais metabolicamente ativo que o osso cortical, liberando rapidamente os minerais na insuficiência aguda, sendo o osso predominante nas vértebras (34).

No indivíduo adulto, o esqueleto está em constante processo de remodelação para reparo de estruturas danificadas e manutenção da homeostase mineral. Este processo exige uma coordenação fina realizada pelos osteócitos, células totalmente diferenciadas de osteoblastos e que, com suas ramificações dendríticas, agem como sensores mecânicos para

sinalizar e orquestrar a formação óssea, desempenhada pelos osteoblastos e a reabsorção óssea realizada pelos os osteoclastos (34). Para melhor compreensão do impacto da DRC sobre o esqueleto, a fisiopatologia do HPT secundário será discutida a seguir com mais detalhes.

À medida que a função renal se deteriora, com o intuito de evitar a retenção de fósforo, a produção de FGF-23 pelos osteócitos é um dos eventos mais precoces. O FGF-23 requer a expressão de seu receptor associado a Klotho (FGR1-Klotho) para executar sua ação, dessa forma age no túbulo renal inibindo a reabsorção de fósforo e aumentando a reabsorção de cálcio, além de reduzir a absorção intestinal de fósforo ao inibir a ativação da $1,25(\text{OH})_2\text{VitD}$ e as paratireoides. No entanto, com a perda progressiva da massa renal, os níveis de Klotho diminuem, reduzindo a ação do FGF-23, assim como a produção renal de $1,25(\text{OH})_2\text{VitD}$ se reduz ainda mais, ambos fatores inibitórios do PTH. Ainda em consequência dessas alterações, ocorreria um aumento de fósforo e redução de cálcio séricos, o que é contrabalanceado pelo maior estímulo e ação do PTH. O PTH cronicamente estimulado por sua vez age em 2 sítios: 1) No osso, aumentando a síntese de FGF-23 e a liberação de Ca e P; 2) No rim, aumentando a síntese de $1,25(\text{OH})_2\text{VitD}$, reabsorção de Ca e excreção de P. Dessa forma, os níveis de Ca e P se mantêm normais até estágios mais avançados da DRC, onde estes mecanismo compensatórios não são mais suficientes para homeostase (35).

Diversos estudos demonstram que a queda na TFG está associada à menor qualidade e força do osso. Isso se deve às diversas alterações

metabólicas e hormonais decorrentes da progressão da DRC citadas acima que incluem hipocalcemia, hiperfosfatemia, deficiência de vitamina D, HPT, além da acidose metabólica, inflamação crônica, entre outros. O principal mecanismo associado é a elevação crônica do PTH, que tem efeito catabólico sobre o osso cortical, causando erosão subperiosteal e intracortical, além de ter um efeito anabólico sobre o osso trabecular, causando aumento na espessura e número de trabéculas (36).

A biópsia óssea é o padrão ouro para determinação da qualidade do osso e determinação das anormalidades da remodelação óssea decorrentes da DRC, denominadas em conjunto de osteodistrofia renal, que compreende as doenças de alta remodelação - como a osteíte fibrosa a doença mista - e as de baixa remodelação - como doença óssea adinâmica e osteomalácia (5). No entanto, por ser uma exame invasivo, outros métodos vem sendo estudados como a aferição de DMO pela densitometria por emissão de raios X de dupla energia (DXA) e a tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução (HRpQCT), esta última capaz de quantificar a densidade e a geometria do osso trabecular e cortical (37).

Em um estudo longitudinal com 53 pacientes com DRC estágios 2 a 5D, com seguimento de 1,5 anos, foi observado uma perda anual de DMO aferida pela DXA no fêmur total (-1,3%) e rádio ultradistal (-2,4%). Esta perda observada na DXA parece refletir a perda de osso cortical, como observado na HRpQCT no rádio dos mesmos pacientes, com perda significativa de área cortical (-2,9%), densidade cortical (-1,3%), espessura cortical (-28%) e aumento da porosidade cortical (4,2%) e da área trabecular

(0,4%). Estas alterações foram associadas a maiores concentrações de PTH e maior remodelação óssea com aumento de marcadores de formação como a fosfatase alcalina óssea (FAo), osteocalcina e *procollagen of type-1 N terminal propeptide* (P1NP), assim como marcadores de reabsorção como *tartrate-resistant acid phosphatase 5b* (Trap5b) e CTX (38).

West et al. (2015) demonstraram, em uma amostra de 35 pacientes pré-diálise em estágios 3 a 5 de DRC, que a DMO aferida pela DXA e HRpQCT é baixa e a perda óssea é acelerada naqueles que sofreram fraturas subsequentes. Como preditores de incidência de qualquer fratura, a DMO avaliada pela DXA do rádio distal, o 1/3 ultradistal e 1/3 proximal do rádio, apresentaram as melhores áreas sob a curva (AUC) na curva ROC (0,74 e 0,70, respectivamente), enquanto a área cortical e a densidade cortical do rádio medida pela HRpQCT foram os melhores preditores, com AUC 0,73 e 0,72 respectivamente (39). Por se tratar de um estudo com amostra pequena de pacientes, o risco de fraturas em DRC depende de novos estudos para validação e adoção destes métodos pelas diretrizes. Em 2015, uma meta-análise com 1782 pacientes renais crônicos estágios 3 a 5d, demonstrou que a DMO foi significativamente menor no colo do fêmur, coluna, no 1/3 proximal e ultradistal do rádio em pacientes com fraturas, quando comparados àqueles sem fraturas (40). Este dado juntamente com outros estudos longitudinais levou à recomendação pelo KDIGO em 2017 do uso da DXA para aferição de DMO em pacientes renais crônicos, embora ainda haja muitos questionamentos quanto a modalidade dessas aferições e estratégias terapêuticas em pacientes em estágios mais avançados (41).

Dados sobre efeitos dos diuréticos sobre a microarquitetura óssea em pacientes DRC não foram reportados na literatura até o momento.

1.5 Uso de diuréticos e a DMO-DRC, possíveis mecanismos extra renais envolvidos

O uso de diuréticos na DRC é muito frequente como pontuado anteriormente, entretanto poucos estudos até o momento avaliaram o provável impacto destas medicações na DMO-DRC, dentre eles destaca-se o estudo CRIC publicado em 2011 (42). Este estudo avaliou 3616 pacientes com DRC, mostrando que o uso de furosemida foi diretamente relacionado ao aumento da calciúria, maior aumento do PTH (67,9 pg/ml, 95% IC 65,2 - 70,7) e, portanto, maior risco de desenvolvimento de HPT secundário (odds ratio 2,1; 95% IC 1,7-2,6). O uso de tiazídico, por sua vez, mostrou efeito inverso, diminuindo a calciúria e atenuando o aumento do PTH (50 pg/ml, 95% IC 47,8 - 52,3). Por se tratar de um estudo tipo coorte, portanto não randomizado, torna mais difícil a interpretação de causa-efeito. Além disso, existe a possibilidade de que o efeito desses diuréticos sobre a calciúria não seja o único mecanismo envolvido na alteração dos níveis de cálcio e a consequente ação na concentração de PTH.

Dados na literatura corroboram para a hipótese de uma ação extra renal dos diuréticos sobre o metabolismo ósseo. Primeiro ponto, o fato de não se ter descrito uma correlação entre a variação da calciúria e a variação de PTH (42). Nós estudamos dados retrospectivos de 275 pacientes com DRC entre os estágios 2 a 5, acompanhados no ambulatório do Hospital das

Clínicas, comparando o efeito de furosemida (FURO) e hidroclorotiazida (HIDRO) no risco de HPT secundário. Demonstramos que a calciúria em pacientes com DRC é baixa, independente do diurético em uso, sendo mais baixa em estágios mais avançados de função renal. Além disso, observamos um risco de HPT secundário 6,2 vezes maior no grupo em uso de furosemida comparado ao grupo HIDRO, mesmo ajustando-se para a TFG (Apêndice 3) (43).

Segundo ponto a ser debatido é a descrição de aumento do cálcio sérico após uso de tiazídico por um período curto em pacientes anúricos em hemodiálise, que foi demonstrado em um estudo em 1970 (44), cujo mecanismo ainda desconhecido parece ter relação com a concentração de PTH, como uma condição permissiva para ação renal desse diurético (45). Em estudo recente, nós demonstramos da mesma forma, em pacientes anúricos em hemodiálise, que o uso de tiazídico aumentou o cálcio sérico naqueles pacientes cujo PTH era maior que 300pg/ml, o que não ocorreu naqueles com menores concentrações de PTH. Não foi possível definir a origem extra renal do cálcio, se osso ou intestino (Apêndice 4) (46). A possível ação óssea e intestinal dos tiazídicos é corroborada pelo achado em estudo experimental, que a inativação do cotransportador sódio-cloro, sensível ao tiazídico, resultou em maior absorção intestinal de cálcio e diferenciação de osteoblastos (47, 48).

Por fim, um tipo cotransportador sódio-potássio-cloro, o NKCC1, sensível a diurético de alça, foi encontrado em tecido de adenoma de paratireoide humana, sugerindo que o estímulo direto deste diurético sobre

as paratireoides possa estar envolvido no surgimento do HPT, porém mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese (49).

1.6 Justificativa e interesse científico

A maioria dos estudos que se propuseram a estudar o efeito dos diuréticos no metabolismo do cálcio e metabolismo ósseo foi feita na população geral, com função renal normal. No cenário da DRC os dados de literatura são escassos e as alterações descritas são ainda mais intrigantes, uma vez que a própria função renal interfere diretamente no metabolismo ósseo e o uso dos diuréticos pode interferir de forma muitas vezes imprevisível.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

Comparar o efeito de duas intervenções, o uso de diurético tiazídico (hidroclorotiazida) e o uso de diurético de alça (furosemida) sobre a DMO-DRC durante o período de um ano de uso em pacientes com DRC estágio 3.

2.1 Objetivos específicos

Comparar o efeito de duas intervenções sobre:

1. As anormalidades bioquímicas relacionadas a DMO-DRC: cálcio, fósforo, calciúria, fosfatúria, fosfatase alcalina, vitamina D, PTH;
2. Os marcadores de formação e reabsorção óssea;
3. A DMO avaliada pela DXA;
4. A DMO e microarquitetura óssea avaliada pela HRpQCT.

3 Casuística e Métodos

3 MÉTODOS

3.1. DELINEAMENTO E POPULAÇÃO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo longitudinal, do tipo coorte prospectiva, com intervenção, em que foram recrutados pacientes em seguimento ambulatorial no serviço de Nefrologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), desde agosto de 2015 até janeiro de 2019. Pacientes selecionados para pesquisa que estavam em uso de hidroclorotiazida ou furosemida tiveram a droga suspensa (período de *washout*) por pelo menos 30 dias, sendo então randomizados para receberem hidroclorotiazida 25mg ou furosemida 40mg, 1 comprimido por via oral pela manhã. A dose escolhida foi baseada no uso habitual para início de terapia, com menor risco de efeitos adversos indesejáveis (50, 51). Além disso, estas são as apresentações de menor concentração disponíveis na farmácia do HCFMUSP sem que haja necessidade de quebrar o comprimido. O estudo foi cego para o investigador, que prescrevia de acordo com sorteio de diurético A ou B, então fornecido ao paciente pela enfermeira participante do estudo. Após a criação de uma lista de randomização para diurético A e B, pacientes foram alocados de forma seriada em blocos de 8 indivíduos para cada grupo de diurético, onde foram pareados para idade (≥ 65 anos e < 65 anos), sexo e função renal (estágio 3a e 3b).

Todos os pacientes receberam dose padrão de reposição de colecalciferol equivalente a 800UI/dia durante todo o estudo.

3.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos todos os pacientes adultos, em seguimento ambulatorial do HC-FMUSP que se encontravam no estágio 3 da DRC e que concordaram em participar do estudo, com aceitação manifesta ao assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido. A função renal foi determinada através de equação CKD-EPI (52) e deveria estar entre 30 e 60 ml/min/1,73m², configurando estágio 3a ou 3b da DRC.

Este estágio foi escolhido por tratar-se da fase em que PTH começa a se elevar em pacientes com DRC e como proposta de ver a ação dessas medicações em fases mais precoces do HPT, ainda sem uso de análogos de vitamina D.

3.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos pacientes com as seguintes comorbidades: diabetes, em vista que apresentam distúrbios ósseos específicos mais associados a doença de base (53), além de insuficiências cardíaca ou hepática importante, devido a necessidade de ajustes de dose de diuréticos durante o estudo; também foram excluídos aqueles com PA sistólica < 100mmHg sem uso de anti-hipertensivos, usuários de corticoide, bifosfonatos, carbonato de cálcio, terapia hormonal e anticonvulsivantes nos últimos 5 anos;

3.4. PROTOCOLO DE PESQUISA

Pacientes foram mantidos em uso do diurético por 1 ano, com avaliação clínica e laboratorial a cada 3 meses, e avaliação de estrutura óssea e marcadores ósseos no momento basal e após 1 ano, conforme demonstrado no desenho abaixo (Figura 4). A partir da análise final dos resultados e identificação dos grupos antes denominados A e B, definimos as análises como grupos HIDRO e FURO, conforme o uso de hidroclorotiazida ou furosemina, respectivamente.

Figura 4. Desenho esquemático do estudo.

3.4.1 Avaliação de adesão à farmacoterapia

Todos os pacientes foram orientados a tomar 1 comprimido da medicação pela manhã. Foi fornecida quantidade suficiente de comprimidos para 3 meses e os pacientes receberam um envelope onde traziam as

cartelas da medicação, incluindo as vazias. A cada retorno foi realizada a contagem de comprimidos ingeridos.

3.4.2. Avaliação de efeitos colaterais

Após a randomização, os pacientes retornaram no ambulatório a cada 3 meses, onde foram questionados de forma geral sobre efeitos colaterais como tontura, episódios de queda ou câimbras. A pressão arterial foi medida por método automático, realizando 3 medidas, descartada a primeira aferição e realizada média das duas últimas. Em caso de hipotensão, considerada quando a PA sistólica era menor que 100 mmHg, a dose dos demais anti-hipertensivos era reduzida. O diurético era suspenso em caso de não tolerância dos efeitos colaterais mesmo após ajustes de medicações.

3.4.3. Avaliação laboratorial

No momento da randomização e a cada 3 meses foram coletados exames bioquímicos no sangue (sódio, potássio, cálcio iônico, cálcio total, fósforo, magnésio, ácido úrico, fosfatase alcalina, gasometria venosa, creatinina, ureia, albumina) e em urina de 24h (cálcio, sódio e fósforo). A cada 6 meses foram dosados 25-hidroxi-vitamina D (DiaSorin, StilWater, Minn., EUA) e PTH (Eletroquimiluminescencia, Cobas®, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) com valor de referência 15,0-65,0 pg/mL; A análise de 1,25(OH)₂VitD (Quimioluminescência, DiaSorin, StilWater, Minn., EUA) foi realizada antes da randomização e ao final do protocolo, com valor

de referência 19,9 -79,3 pg/mL.

Também foram realizadas coletas de material biológico (soro e plasma), armazenados em freezer a -80° C para análise de marcadores ósseos de reabsorção e formação (CTX e P1NP), ao término do projeto, realizado pela equipe especializada no Laboratório de Fisiopatologia Renal (LIM-16) – grupo de Doença Óssea Metabólica;

3.4.4 Avaliação da estrutura óssea

A estrutura óssea foi avaliada no momento da randomização e após 1 ano, realizada pelo Laboratório de Metabolismo ósseo da Disciplina de Reumatologia da FMUSP (LIM-17), com os seguintes métodos:

- HRpQCT (XtremeCT, Scanco Medical AG, Bruttisellen, Suíça): Exame realizado no rádio e tíbia distal do membro não dominante. A HRpQCT é uma técnica de imagem que usa processamento computadorizado da atenuação de raios-X para a aquisição de imagens seccionais, da mesma forma que uma tomografia computadorizada convencional. A partir dos cortes é possível a produção de um modelo de alta qualidade em três dimensões (3D), como demonstrado na Figura 5. Este exame fornece informações sobre a geometria, densidade e microarquitetura óssea, possibilitando a diferenciação entre osso cortical e osso trabecular (54). Dentre os parâmetros mensurados, foi objetivo de estudo: DMO volumétrica (mg HA/cm³), Área Cortical (mm²), DMO cortical (mm²), Espessura Cortical (mm), Área Trabecular (mm²), DMO Trabecular (mg HA/cm³), Espessura Trabecular (mm), Número de Trabéculas (1 mm),

Espaço entre as trabéculas (mm), BV/TV.

Figura 5. Imagem 3D do rádio (A) e tíbia (B) distal criada pela HRpQCT. Representação esquemática do osso cortical e trabecular (C). Dados obtido de paciente incluído no estudo.

- DXA (Hologic QDR4500; Hologic, Bedford, MA). Este exame foi utilizado para avaliação da DMO (g/cm^2) na coluna lombar (L1-L4) e fêmur total com seus respectivos T-scores, para avaliação de osteopenia e osteoporose segundo critérios da OMS (55), além da avaliação do rádio distal (ultradistal e 1/3 proximal) e corpo total (Figura 6).

Figura 6. Imagens geradas pela DXA para aferição de DMO do fêmur (A), rádio distal (B), corpo total (C) e coluna lombar (D). Dados obtido de paciente incluído no estudo.

3.5 COLETA E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

As informações clínicas e demográficas dos sujeitos da pesquisa foram colhidas no ato da inclusão do paciente no presente estudo. Esses dados foram registrados em protocolo padronizado, sob a forma de questionário estruturado semifechado.

Para fins de tabulação de dados, os indivíduos incluídos foram identificados através do número de entrada no protocolo de pesquisa, de maneira que sua identidade fosse preservada durante o período de coleta de dados e por ocasião da divulgação dos resultados nos veículos científicos apropriados.

Variáveis contínuas foram apresentadas como média $\pm$ desvio padrão (distribuição normal) ou mediana e interquartis (distribuição não paramétrica), sendo a comparação entre os grupos feita através de teste t ou Mann-Whitney, respectivamente. Por sua vez, as variáveis categóricas foram apresentadas como número absoluto e porcentagem com a comparação entre os grupos feita por qui-quadrado ou Fisher, de forma apropriada. A comparação entre os dois grupos (FURO E HIDRO) foi realizada por General Linear Model (GLM) para medidas repetidas, com análise dos efeitos independentes da droga, do tempo e da interação tempo x medicação. Quando valores de p eram $<0,05$ o pós-teste de Bonferroni foi aplicado para identificar onde estava a diferença. Para fins de validação estatística, adotamos intervalo de confiança de 95% e valor de $p < 0,05$ como diferenças significativas, não aleatórias.

Todos métodos de processamento estatístico de dados foram realizados com o auxílio do software IBM SPSS Statistics Client for Trial 21.0 Mac OS Multilingual®.

3.5.1 Amostragem e cálculo de poder

Cálculo de amostra usando GPower 3.1.7, com poder do teste 80% (erro β), nível de significância 5%, tamanho de efeito estimado em 0,31 ($\eta^2 = 0,09$) para variação de PTH encontrada em publicação anterior, Apêndice 3 (n total 275, grupo HIDRO PTH 64 pg/ml vs. grupo Furo PTH 135pg/ml, $p < 0.001$), considerando o teste estatístico como ANOVA two-way, com 3 medidas repetidas de PTH em cada grupo (FURO e HIDRO), foi determinada em um total de 30 indivíduos.

3.6. ASPECTOS ÉTICOS

Todas as etapas do presente estudo foram desenvolvidas e aplicadas em conformidade com os requerimentos do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMUSP (número parecer - CAPPesq 1.016.084), respeitando as Normas de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Res. CNS 196/96) do Conselho Nacional de Saúde. Também está de acordo com os fundamentos estabelecidos na Declaração de Helsinki (1964), ementa de Tóquio (1975), Veneza (1983) e Hong Kong (1989).

Todos os participantes tiveram pleno conhecimento dos objetivos e métodos do experimento, tendo manifestado seu consentimento por escrito (TCLE), sendo devidamente notificados de que qualquer informação fornecida é estritamente sigilosa e que poderiam retirar seu consentimento a qualquer momento do decorrer da pesquisa.

O protocolo foi registrado no site da plataforma *Clinical Trials* sob número NCT03082742.

4 Resultados

4 RESULTADOS

As características basais dos pacientes, no momento da inclusão no estudo, estão demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1. Características demográficas e bioquímicas antes da randomização

	TOTAL (n=40)	Hidroclorotiazida (n=20)	Furosemida (n=20)	P
Dados Demográficos				
Idade (anos)	61,8 (54,73)	62,5 (58,73)	59,5 (49,73)	0,40
Homens, n (%)	26 (65)	14 (70)	12 (60)	0,51
Cor branca, n (%)	17 (42,5)	9 (45)	8 (40)	0,33
Doença de Base				
Hipertensão, n (%)	28 (70)	15 (75)	13 (65)	0,47
Tabagismo Atual, n (%)	2 (5)	1 (5)	1 (5)	0,81
Etilismo atual, n (%)	7 (17,5)	5 (25)	2 (10)	0,21
Mulheres na Menopausa, n (%)	12 (85,7)	6 (100)	6 (75)	0,18
Fratura prévia (últimos 10 anos), n (%)	1 (2,5)	1 (5)	0 (0,0)	0,31
História de queda no último ano, n (%)	2 (5)	1 (5)	1 (5)	1,00
Atividade física, n (%)	14 (35,9)	7 (36,8)	7 (35)	0,91
Peso (kg)	74,9 ± 14,2	77,2 ± 12,8	72,6 ± 15,6	0,32
IMC (Kg/m ²)	27,9 ± 4,3	28,5 ± 4,2	27,5 ± 4,4	0,46
Medicamentos em uso				
Diurético prévio à randomização				0,71
Diurético de Alça, n (%)	8 (20)	3 (15)	5 (25)	
Diurético Tiazídico, n (%)	20 (50)	11 (55)	9 (45)	
Nenhum diurético, n (%)	12 (30)	6 (30)	6 (30)	
Uso de Colecalciferol, n (%)	18 (45)	10 (50)	8 (40)	0,52
Bioquímica				
Plasma				
TFG - CKD-EPI (ml/min/1.73 m ²)	43,8 ± 8,0	43,6 ± 8,7	44,0 ± 7,3	0,89
Albumina (g/dl)	4,4 ± 0,3	4,5 ± 0,3	4,4 ± 0,3	0,24
Cálcio iônico (mg/dl)	5,0 ± 0,2	5,0 ± 0,2	5,0 ± 0,2	0,86
Cálcio Total (mg/dl)	9,5 ± 0,3	9,6 ± 0,4	9,4 ± 0,3	0,18
Fósforo (mg/dl)	3,2 ± 0,6	3,3 ± 0,6	3,2 ± 0,6	0,52
pH	7,35 ± 0,04	7,35 ± 0,04	7,35 ± 0,04	0,91
Bicarbonato (mmol/L)	25,2 ± 2,7	25,3 ± 2,7	25,0 ± 2,8	0,66
PTH (pg/ml)	74,2 ± 25,6	71,4 ± 27,2	77,1 ± 24,2	0,49
25(OH)VitD (ng/ml)	33,9 ± 10,5	35,9 ± 11,8	31,8 ± 8,9	0,22
1,25(OH) ₂ VitD (pg/ml)	44,5 ± 13,3	45,1 ± 13,3	46,9 ± 14	0,76
Fosfatase Alcalina (U/L)	70 (55, 83)	70 (54,79)	70 (54, 94)	0,56
Urina 24 horas				
Cálcio (mg/24h)	49,2 (21, 91)	52,3 (18, 91)	43,4 (22, 116)	0,78
Cálcio/Creatinina (mg/g)	52,2 ± 38,8	46,3 ± 32,5	58,1 ± 44,4	0,34
Fósforo (mg/24h)	573,8 ± 254,8	572,6 ± 222,9	575,2 ± 288,9	0,98
Fração de Excreção de Cálcio (%)	0,87 ± 0,6	0,86 ± 0,5	0,91 ± 0,7	0,65
Fração de Excreção de Fósforo (%)	23,7 ± 6,8	24,8 ± 7,4	22,6 ± 6,2	0,36

Dados apresentados em média e desvio-padrão, exceto quando especificado de outra forma.

Os pacientes incluídos tinham uma mediana de idade de 61,8 anos, sendo 45% idosos acima de 65 anos, a maioria do sexo masculino e brancos (42,5% de brancos, 27,5% de pardos e 30% de negros), com sobrepeso (47,5%) e obesos (30%), nível de escolaridade entre 4 a 8 anos de estudo, sedentários, mas mantendo certa atividade laborativa atual (55% dos pacientes).

Apenas duas mulheres incluídas no estudo não estavam na menopausa, as demais apresentaram média de 17,9 anos pós-menopausa. Observamos uma baixa prevalência de relato de quedas ou fraturas prévias. A doença de base predominante no estudo foi Hipertensão Arterial e a maioria dos pacientes estava em uso de diuréticos previamente à randomização, sendo necessário realizar *wash-out* em 28 pacientes antes de iniciar a coleta de dados. Não houve diferença significativa entre os grupos de estudo quanto ao uso atual de outros anti-hipertensivos, como inibidores da enzima de conversão da angiotensina, bloqueadores do receptor da angiotensina II, bloqueadores de canais de cálcio e beta bloqueadores.

As características demográficas e bioquímicas basais foram semelhantes entre os grupos de estudo, destacando-se um PTH acima do valor de referência (>65 pg/ml) em 55% da amostra e FE P% acima de 20% em 78,9% da amostra. Apenas 1 paciente apresentava deficiência de 25(OH)VitD (< 20ng/ml) e nenhum paciente apresentou níveis de 1,25 (OH)₂VitD abaixo do valor de referência do método. Os valores de cálcio e

fósforo estavam dentro da normalidade e observa-se uma calciúria mais reduzida.

Durante seguimento dos 40 pacientes randomizados, 5 pacientes tiveram o protocolo de pesquisa interrompido (Figura 7), sendo dois do grupo FURO aos 3 meses devido a efeitos adversos como tontura e fraqueza e três pacientes do grupo HIDRO (2 retiraram o consentimento e 1 apresentou hipotensão sintomática). Não observamos diferenças bioquímicas, demográficas ou de exames de imagem entre os 5 pacientes excluídos e aqueles que permaneceram no estudo, exceto o nível médio de Mg mais baixo (1,80 vs. 1,98 mg/dl, $p=0,043$) naqueles que foram excluídos. A adesão ao tratamento foi realizada com contagem de pílulas, a mediana do HIDRO foi 94% (86; 100) % enquanto no FURO foi 96% (93;100) %, o que não foi diferente estatisticamente ($p=0,19$).

Figura 7. Fluxograma do estudo

4.1 Alterações bioquímicas, hormônios calciotrópicos e marcadores ósseos durante o estudo

A Tabela 2 mostra os dados bioquímicos, hormonais e marcadores ósseos dos pacientes no período basal e após 1 ano de estudo.

Tabela 2. Parâmetros laboratoriais basal e após 1 ano, por grupo de estudo.

	Hidroclorotiazida		Furosemida		P		
	Basal	1 ano	Basal	1 ano	Hidro vs. Furo	Tempo	Interação
Bioquímica							
TFG	43,6 ± 8,7	40,7 ± 9,9	44,0 ± 7,3	41,7 ± 9,3	0,67	0,01	0,85
CaT (mg/dl)	9,6 ± 0,4	9,7 ± 0,4	9,4 ± 0,3	9,4 ± 0,6	0,06	0,75	0,66
CaI (mg/dl)	5,0 ± 0,2	5,00 ± 0,17	5,0 ± 0,2	4,99 ± 0,21	0,93	0,95	0,79
CaUr (mg/vol)	52,3 (18;91)	19,4 (14;45)	43,4 (22;116)	79 (35;105)	0,02	0,06	0,34
FE Ca%	0,8 (0,3;1,3)	0,4 (0,2;0,7)	0,6 (0,3;1,4)	1,3 (0,9;1,8)	0,01	0,99	0,005
P (mg/dl)	3,3 ± 0,6	3,3 ± 0,5	3,2 ± 0,6	3,3 ± 0,7	0,53	0,55	0,34
FE P%	23,9 (22;31)	23,6 (20;30)	21,2 (19;27)	24,2 (21;33)	0,61	0,07	0,04
Na (mEq/L)	141,2 ± 2,9	140,9 ± 2,6	142,0 ± 2,9	142,7 ± 2,5	0,22	0,87	0,04
K (mg/dl)	4,7 ± 0,5	4,2 ± 0,4	4,5 ± 0,2	4,4 ± 0,3	0,56	0,001	0,006
BIC (mmol/L)	25,3 ± 2,7	26,6 ± 2,8	25,0 ± 2,8	25,5 ± 3,1	0,44	0,07	0,38
AU (mg/dl)	6,2 ± 1,4	7,4 ± 1,3	6,0 ± 1,4	6,7 ± 1,4	0,25	0,003	0,36
Alb (g/dl)	4,5 ± 0,3	4,5 ± 0,3	4,4 ± 0,3	4,4 ± 0,6	0,37	0,92	0,56
FA (U/L)	68,5 (55;78)	65 (58;73)	69,5 (54;94)	77 (61;93)	0,47	0,94	0,03
Hormônios e Marcadores							
PTH (pg/ml)	71,4 ± 27,2	79,2 ± 39,2	77,1 ± 24,2	84,9 ± 29,3	0,49	0,15	0,89
Rel CaT/PTH	0,15 ± 0,05	0,16 ± 0,09	0,14 ± 0,05	0,12 ± 0,04	0,09	0,97	0,49
25(OH)VitD (ng/ml)	35,9 ± 11,8	35,1 ± 10,4	31,2 ± 8,9	32,4 ± 8,2	0,14	0,89	0,52
1,25 (OH) ₂ VitD (pg/ml)	45,1 ± 13,3	38,4 ± 13,1	46,9 ± 14	50,0 ± 10,6	0,19	0,47	0,06
Rel PTH/1,25 (OH) ₂ VitD	1,54 ± 0,83	1,63 ± 1,21	1,36 ± 0,58	1,49 ± 0,70	0,59	0,30	0,25
P1NP (ng/ml)	56,5 ± 29,6	50,5 ± 32,6	65,7 ± 68,6	81,2 ± 66,9	0,27	0,21	0,006
CTX (ng/ml)	0,39 ± 0,20	0,31 ± 0,24	0,40 ± 0,52	0,44 ± 0,46	0,60	0,24	0,01

Dados apresentados em média e desvio-padrão, exceto quando especificado de outra forma. TFG pelo CKD-EPI (mL/min/1.73 m²).

Quanto as alterações bioquímicas, observa-se redução da calciúria e FE Ca% no grupo HIDRO e aumento no grupo FURO, efeito esperado de cada droga ($p < 0,05$). Houve uma tendência do efeito da medicação na concentração de cálcio total, maior no grupo HIDRO, assim como a relação CaT/PTH, com tendência a ser maior no grupo FURO. Não encontramos alterações na concentração de cálcio iônico. Destaca-se ainda uma interação ao longo do tempo e uso da droga quanto aos valores de FE P%, com elevação no grupo FURO.

Dentre os efeitos colaterais possíveis de ambos os diuréticos, observa-se uma redução ao longo do tempo na concentração de potássio, mas nenhum paciente apresentou hipocalcemia durante o seguimento. Destaca-se ainda aumento do ácido úrico em ambos os grupos, sendo que 3 pacientes apresentaram queixa de dor articular, 1 do grupo HIDRO e 2 do grupo FURO. Não foram observados hipomagnesemia ou hiponatremia na amostra estudada.

A Figura 8 representa graficamente as alterações bioquímicas citadas previamente em cada período do estudo, tanto para valores absolutos - com destaque para variação no cálcio sérico e urinário (Figura 8E e 8G) - quanto para variação percentual em relação ao basal - com destaque para alterações na FA e FE P% (Figura 8L e 8P) - onde é possível observar os efeitos diferenciados de cada diurético.

Figura 8. Efeito dos diuréticos sobre as alterações bioquímicas e hormônios calcitropicos. (A-H) Média $\pm$ erro padrão para valores absolutos de PTH, 25(OH)VitD, TFG, FA, CaT, P, CaUr, FE P%. (I-P) Variação percentual em relação ao basal para mesmas variáveis.

Figura 8 (cont.) Efeito dos diuréticos sobre as alterações bioquímicas e hormônios calcitropicos. (A-H) Média $\pm$ erro padrão para valores absolutos de PTH, 25(OH)VitD, TFG, FA, CaT, P, CaUr, FE P%. (I-P) Variação percentual em relação ao basal para mesmas variáveis.

Como demonstrado na Tabela 2, notamos uma queda da TFG ao longo do tempo de seguimento ($p=0,01$), o que ocorreu nos dois grupos de estudo. Não foi observada diferença nos níveis de PTH e 25(OH)VitD, mas houve tendência a elevação de 1,25(OH)₂VitD no grupo FURO e redução no grupo HIDRO. Não houve diferença na relação PTH/1,25(OH)₂VitD entre os grupos. Quanto aos marcadores ósseos, observa-se efeitos opostos com elevação de CTX, P1NP e FA no grupo FURO e redução no grupo HIDRO com interação significativa entre do tempo e medicação.

A Figura 9 demonstra a mudança percentual anual de 1,25(OH)₂VitD, CTX e P1NP, confirmando os achados de aumento destes marcadores grupo FURO e efeito oposto no grupo HIDRO.

Figura 9. Mudança percentual anual (média $\pm$ erro padrão) em relação ao basal dos hormônios calciotrópicos e marcadores ósseos, por grupo de estudo.

Ao analisar a correlação entre os marcadores ósseos e os hormônios calciotrópicos com as variáveis bioquímicas, nota-se uma correlação direta da variação percentual anual de $1,25(\text{OH})_2\text{VitD}$ com a FE Ca% ($r=0,54$ e $p=0,012$) e uma tendência com CTX ($r=0,41$ e $p=0,06$). A variação percentual anual de PTH teve correlação inversa com a de cálcio total ($r= -0,56$ e $p<0,001$). A variação anual percentual da $25(\text{OH})\text{VitD}$ não apresentou correlação significativa com as variáveis estudadas. CTX e P1NP também apresentaram correlação direta com a FE Ca% ($r=0,36$ e $p=0,045$; $r=0,41$ e $p=0,02$, respectivamente) e FA ($r=0,47$ e $p=0,004$; $r=0,51$ e $p=0,002$, respectivamente). A variação da função renal não apresentou correlação com os hormônios e marcadores estudados.

4.2 Densitometria Óssea (DXA)

A densitometria óssea dos pacientes incluídos no estudo está demonstrada na Tabela 3. Nesta amostra foi observado osteoporose em 5,1% dos pacientes, diagnosticada em 2 pacientes na coluna lombar, ambos no grupo FURO. Também foi observada osteopenia em 11 pacientes (28,2%), na coluna lombar ou fêmur total, sendo 5 pacientes do grupo FURO e os demais do grupo HIDRO. Após a randomização, os dados de densitometria basais dos pacientes em cada grupo de estudo foram semelhantes.

Tabela 3. Dados de densitometria óssea antes da randomização.

	Todos	Hidroclorotiazida	Furosemida	P
	Basal (n = 39)	Basal (n = 19)	Basal (n=20)	
DMO em g/cm²				
Coluna Lombar	1,05 ± 0,15	1,08 ± 0,16	1,04 ± 0,15	0,46
T- Score	-0,26 ± 1,5	-0,08 ± 1,5	-0,4 ± 1,4	0,47
Fêmur total	0,93 ± 0,18	0,95 ± 0,12	0,92 ± 0,22	0,64
T-Score	-0,38 ± 0,9	-0,4 ± 0,7	-0,3 ± 1,0	0,64
Radio - Ultradistal	0,47 ± 0,08	0,45 ± 0,07	0,49 ± 0,07	0,11
Radio - 1/3 proximal	0,74 ± 0,08	0,73 ± 0,08	0,75 ± 0,08	0,58
Corpo Total	1,11 ± 0,09	1,10 ± 0,08	1,12 ± 0,1	0,43

Dados apresentados em média e desvio-padrão, exceto quando especificado de outra forma

Dos 40 pacientes randomizados, obtivemos até o momento os dados de DXA após 1 ano de 15 pacientes do grupo HIDRO e 13 pacientes do grupo FURO. A variação percentual de peso dos pacientes foi semelhante entre os dois grupos ($p=0,49$), sendo a mediana do grupo HIDRO de 0,69% (-1,3; 2,2) e a mediana do grupo FURO de 2,0% (-1,5; 4,6).

Comparado a variação percentual da DMO em relação ao basal, houve perda percentual significativa de DMO após 1 ano no rádio (-1,0%, IC 95% -1,8 a -0,2; $p=0,013$) e seu terço proximal (-1,47%, IC 95% -2,5 a -0,5; $p=0,006$), aumento na coluna (1,6%, IC 95% 0,65 a 2,7; $p=0,002$), e uma tendência de perda no fêmur (-0,9%, IC 95% -1,8 a 0,2; $p=0,06$) ao longo do tempo. Quando comparamos os dois grupos de estudo, não foi encontrada diferença significativa, apenas uma tendência maior de perda de DMO no 1/3 proximal do rádio, como demonstrado na Figura 10.

Figura 10. Mudança percentual (média $\pm$ erro padrão) em 1 ano em relação ao basal na DMO aferida pela DXA, por grupo de estudo.

4.3 Tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução (HRpQCT)

Os parâmetros aferidos pela HRpQCT dos pacientes incluídos no estudo estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 4. Dados de HRpQCT antes da randomização.

	Todos	Hidroclorotiazida	Furosemida	
	Basal (n=38)	Basal (n = 19)	Basal (n = 19)	p
HRpQCT da Tibia				
DMO volumétrica (mg HA/cm³)	280,7 ± 43,5	268,8 ± 51,6	292,5 ± 43,1	0,09
Área Cortical (mm²)	129,7 ± 22,8	129,5 ± 21,5	129,9 ± 24,6	0,96
DMO Cortical (mg HA/cm³)	883,7 ± 69,4	873,1 ± 57,2	894,4 ± 60,5	0,27
Espessura Cortical (mm)	1,2 ± 0,2	1,16 ± 0,2	1,21 ± 0,2	0,42
Área Trabecular (mm²)	640,9 ± 171,2	660,7 ± 173,6	621,0 ± 145,1	0,45
DMO Trabecular (mg HA/cm³)	148,0 ± 36,7	138,5 ± 29,8	157,5 ± 41,2	0,11
Espessura Trabecular (mm)	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,85
Número de Trabéculas (1mm)	1,73 ± 0,3	1,63 ± 0,3	1,81 ± 0,3	0,09
Espaço entre as trabéculas (mm)	0,53 ± 0,1	0,56 ± 0,1	0,48 ± 0,1	0,10
BV/TV	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,11
HRpQCT do Rádio				
DMO volumétrica (mg HA/cm³)	303,1 ± 50,8	273,6 ± 59,2	310,1 ± 41,4	0,12
Área Cortical (mm²)	55,7 ± 12,8	56,6 ± 15,6	54,8 ± 9,4	0,68
DMO Cortical (mg HA/cm³)	833,7 ± 77,2	825,4 ± 91,5	842,6 ± 59,9	0,50
Espessura Cortical (mm)	0,69 ± 0,16	0,69 ± 0,18	0,70 ± 0,13	0,85
Área Trabecular (mm²)	285,2 ± 92,4	297,7 ± 98,8	271,9 ± 85,9	0,40
DMO Trabecular (mg HA/cm³)	173,3 ± 38,9	161,8 ± 38,5	185,3 ± 36,5	0,07
Espessura Trabecular (mm)	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,46
Número de Trabéculas (1mm)	1,94 ± 0,3	1,86 ± 0,3	2,03 ± 0,3	0,10
Espaço entre as trabéculas (mm)	0,43 (0,38;0,53)	0,49 (0,38;0,53)	0,41 (0,37;0,44)	0,67
BV/TV	0,14 ± 0,03	0,13 ± 0,03	0,15 ± 0,03	0,07

Dados apresentados em média e desvio-padrão, exceto quando especificado de outra forma.

Não houve diferença entre os parâmetros de densidade mineral ou parâmetros estruturais basais entre os dois grupos de estudo.

Os dados de HRpQCT das mulheres incluídas no estudo (n = 14), foram comparados, de acordo com a idade, com dados de referência de mulheres saudáveis obtidos por Alvarenga et. al. (56), não tendo sido encontrada diferença entre os grupos. Entretanto, observou-se uma

tendência de menor DMO cortical na tíbia (faixa 50-59 anos e acima 70 anos) e no rádio (faixa 50-69 anos) de mulheres no presente estudo, comparado com medianas do estudo acima citado ($p = 0,07$).

Dos pacientes randomizados, obtivemos até o momento os dados de HRpQCT após 1 ano de uso da medicação de 10 pacientes do grupo HIDRO e 10 pacientes do grupo FURO, em virtude de manutenção técnica do aparelho. Comparando a variação percentual da HRpQCT em relação ao basal, não houve alteração significativa de nenhum dos parâmetros ao longo do tempo.

Na figura 11 está representada a variação percentual em 1 ano dos principais parâmetros com a comparação dos dois grupos de estudo.

Figura 11. Mudança percentual (média $\pm$ erro padrão) em 1 ano em relação ao basal na DMO e parâmetros estruturais aferidos pela HRpQCT da tíbia (A) e rádio (B), por grupo de estudo.

Na Figura 11A, observamos na HRpQCT da tíbia que os pacientes do grupo HIDRO tiveram um aumento do número de trabéculas ($p=0,05$) e redução do espaço entre elas ($p=0,008$), quando comparados com pacientes do grupo FURO, os quais apresentaram efeito oposto. Nos demais parâmetros não observamos diferença significativa entre os grupos.

Na Figura 11B, observamos que no grupo FURO houve aumento da área cortical ($p=0,02$) e espessura cortical ($p=0,02$), além de tendência ao aumento da densidade total ($p=0,05$) e da densidade cortical ($p=0,05$) no rádio, mas com redução da área trabecular ($p=0,04$), enquanto no grupo HIDRO o efeito oposto foi observado.

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, o uso dos diuréticos furosemida e hidroclorotiazida apresentaram efeitos diversos e muitas vezes opostos sobre o metabolismo mineral e ósseo. Com a hidroclorotiazida, houve redução da calciúria com tendência a maior cálcio sérico total, efeito oposto observado ao uso de furosemida. As concentrações de PTH e 25(OH)VitD mantiveram-se semelhantes nos dois grupos. O uso de furosemida foi associado a um aumento de CTX, P1NP, 1,25 (OH)₂VitD e fosfatase alcalina quando comparado à variação percentual em relação ao uso de hidroclorotiazida, que teve efeito oposto. Em ambos os grupos, observou-se perda de densidade óssea aferida pela DXA no 1/3 proximal do rádio distal, com tendência a maior perda no grupo FURO. Por outro lado, de forma inesperada, foi observado aumento de área cortical e espessura cortical aferida HRpQCT no rádio no grupo FURO em relação ao grupo HIDRO. Dados de microarquitetura óssea, porém, não foram obtidos na maioria da amostra e este resultado deve ser interpretado com cautela.

Nossa amostra de pacientes no estágio 3 da DRC, apresenta uma mediana de idade 61,8 anos, um pouco menor que estudos populacionais (57), mas semelhante a estudos prévios sobre diuréticos nesta população (42, 43). A prevalência elevada de hipertensos é comum em pacientes renais crônicos e nesta amostra foi responsável por 70% das etiologias de DRC, uma vez que não foram incluídos diabéticos no estudo. Obesidade e sobrepeso predominaram com 77,5% dos pacientes com IMC acima de 25

(média de 27,9kg/m²), como observado em outros estudos, principalmente devido a associação desta comorbidade com hipertensão e DRC (58). Nossa amostra foi constituída predominantemente por homens (65%), semelhante ao encontrado no estudo CRIC, que tinha 55% de homens na amostra (42). Assim, podemos salientar que a amostra estudada tem uma representatividade dentro na população de DRC, excluídos os diabéticos.

Alterações no metabolismo mineral e ósseo se iniciam precocemente na DRC e encontramos um PTH acima de 65 pg/ml em um pouco mais da metade dos casos, além de FE P% maior que 20% na maioria dos pacientes, mantendo concentrações de fósforo e cálcio dentro da faixa de normalidade, como esperado para esse nível de função renal (8, 57).

Apesar da alta prevalência de deficiência de vitamina D descrita em pacientes com DRC (59), em nosso estudo apenas 1 paciente apresentava níveis deficientes de 25(OH)VitD, provavelmente devido ao seguimento regular em ambulatório de nefrologia, no qual esses níveis são monitorados e reposição é prescrita rotineiramente. Corroborando com esta explicação, observamos que 45% da amostra já estava em uso de colecalciferol no momento da randomização. Nenhum paciente apresentou níveis de 1,25(OH)₂VitD abaixo do valor de referência, diferente do observado por Levin *et al.*, onde cerca de 20-45% dos pacientes no estágio 3 da DRC apresentaram níveis inferiores a 22 pg/ml, o que foi associado com diabetes e albuminúria, além da perda função renal (57).

Apesar da calciúria já reduzida no momento da inclusão no estudo em ambos os grupos, pacientes do grupo HIDRO cursaram com maior redução

da calciúria (Figura 8G) e tendência à aumento do cálcio sérico total (Figura 8E), quando comparados ao grupo FURO. No entanto, considerando esse efeito sobre o cálcio, esperava-se um aumento do PTH no grupo FURO e redução no grupo HIDRO, o que não ocorreu. Estudos observacionais demonstram um PTH mais elevado em pacientes em uso de diurético de alça tanto naqueles com função renal normal como naqueles com DRC, assim como há descrição de uso de diuréticos tiazídicos levarem a um PTH menor, mesmo que dentro da faixa de normalidade (15, 42, 43). Nesses estudos, a dose de diurético e o tempo de uso foram variáveis, assim como a TFG. Em nosso estudo, houve uma queda na TFG semelhante em ambos os grupos e a dose da medicação foi a mesma durante todo o período de estudo. Nestas condições não observamos alterações na concentração de PTH, o que pode ser atribuído a outros mecanismos regulatórios da homeostase do cálcio e fósforo como FGF-23 e calcitriol, ainda presentes nesta faixa de função renal. Nesse sentido, destacamos o fato dos níveis basais de $1,25(\text{OH})_2\text{VitD}$ estarem ainda dentro dos limites de referência do método no presente estudo. É possível também que o número de pacientes incluídos e o tempo de acompanhamento possa ter influenciado na ausência do achado de alteração do PTH.

A $1,25(\text{OH})_2\text{VitD}$ é um hormônio que também participa na regulação de cálcio do organismo, aumentando a absorção intestinal de cálcio, a reabsorção renal de cálcio no túbulo distal, além de promover a mobilização de cálcio do esqueleto (60). Os principais estímulos ao aumento de $1,25(\text{OH})_2\text{VitD}$ são um aumento no PTH e um balanço negativo de cálcio,

enquanto sua redução está associada à perda de função renal, aumento do FGF-23 e deficiência de 25(OH)VitD (35, 61). Em nosso estudo houve diferença entre os grupos na variação anual percentual de 1,25(OH)₂VitD (Figura 9), com aumento no grupo FURO e redução no grupo HIDRO, sendo que os níveis de 25(OH)VitD, PTH e TFG mantiveram-se semelhantes entre os grupos. Embora não tenhamos encontrado uma correlação entre as variações percentuais destas variáveis, observamos uma correlação direta com variação anual percentual da fração de excreção de cálcio ($r = 0,54$; $p = 0,012$). Estudos são controversos sobre o efeito tubular da 1,25(OH)₂VitD sobre a calciúria, enquanto alguns demonstram aumento da expressão de proteínas transportadoras de cálcio e maior reabsorção tubular (62, 63), outros sugerem redução de expressão de claudina-16 e maior excreção de cálcio (64).

A furosemida teoricamente poderia aumentar os níveis de 1,25(OH)₂VitD ao estimular produção de PTH de forma direta na paratireoide (49) ou indireta, por aumento da calciúria e redução momentânea da calcemia. Em contrapartida, a maior produção de 1,25(OH)₂VitD aumentaria a absorção intestinal de cálcio, aumentando a calcemia, que somando-se ao seu efeito direto sobre o receptor de vitamina D, ocasionaria um *feedback* negativo sobre produção de PTH (35). Em contrapartida, a hidroclorotiazida poderia aumentar a calcemia por estímulo direto da absorção duodenal de cálcio (47, 65) e maior reabsorção renal de cálcio, desta forma reduzindo o estímulo para secreção de PTH e produção de calcitriol. Assim, a diferença nos níveis de 1,25(OH)₂VitD pode estar relacionada ao efeito oposto de cada

diurético sobre a calciúria e metabolismo do cálcio, mesmo em pacientes renais crônicos, efeito antes já demonstrado em pacientes com função renal normal (17). Como não temos a dosagem do FGF23, a comprovação do mecanismo proposto fica comprometida.

Embora a diferença sobre o PTH entre os grupos não tenha sido observada, de forma interessante, verificamos efeitos sobre os marcadores ósseos, com a furosemida mais associada a aumento da remodelação óssea, conforme demonstrado pelo aumento de marcadores de reabsorção (CTX) e de formação óssea (P1NP, FA) e a hidroclorotiazida, por sua vez, associada à redução da remodelação óssea, com diminuição dos marcadores citados. Esses achados estão em concordância com o observado na literatura, onde os tiazídicos foram associados a menores concentrações de marcadores ósseos (P1NP e CTX) em mulheres hipertensas pós menopausa, quando comparados a outros anti-hipertensivos (66), assim como a redução de expressão gênica de osteocalcina pelos osteoblastos (67). O uso do diurético de alça bumetamida, também em concordância com nossos achados, esteve associado ao aumento de níveis de marcadores de reabsorção (CTX) e de formação (osteocalcina e FAo) em mulheres pós menopausa após 1 ano de uso (16). Assim, o presente estudo comprova o efeito destes diuréticos sobre a remodelação óssea, desta vez em pacientes com disfunção renal, o que até onde pudemos verificar, é um achado inédito nesta população.

A perda de massa óssea e aumento de risco de fraturas está relacionado a perda de função renal devido principalmente as alterações

metabólicas e hormonais decorrentes do DMO-DRC. A prevalência de osteoporose e osteopenia aferidas pela DXA no presente estudo foi de 5,1% e 28,2%, respectivamente, menor que o observado em estudo recente na mesma instituição em pacientes com DRC, onde a prevalência de osteoporose variou de 7,6% a 18,6% e osteopenia de 28,7% a 37,9% em pacientes com TFG entre 30-60ml/min/1,73m² (68).

O presente estudo demonstrou perda de DMO aferida pela DXA ao longo do tempo no rádio e seu terço proximal, com tendência à perda no fêmur total, o que se assemelha um pouco com o encontrado por Nickolas *et al.* (2013), que reportaram perda anual de DMO no fêmur e radio ultradistal em pacientes com DRC estágio 2 a 5 (38). Encontramos, porém, um aumento de DMO na coluna, o que pode ser interpretado à luz de algumas particularidades do método: 1. A medida de DMO pela DXA não consegue discriminar osso trabecular e osso cortical e a coluna é um osso 95% trabecular; 2. Estudo do nosso grupo demonstrou que o HPT em pacientes com DRC se associou com mais baixa DMO no fêmur, mas não na coluna (68), denotando que coluna e fêmur tem comportamento distinto nessa população; 3. A presença de afecções de coluna tais como osteofitose, esclerose, anquilose, sindesmose, osteocondrose e calcificação aórtica pode ser interpretada erroneamente, causando uma discrepância entre a DMO e o resultado da DXA, o que não ocorre no fêmur (69).

Embora não tenha sido encontrada diferença significativa na DMO entre os grupos de diuréticos, apenas uma tendência à perda maior no 1/3 proximal do rádio no grupo FURO, outros estudos com pacientes com

função renal normal, demonstraram efeitos distintos de cada diurético sobre o osso. Rejnmark et al. demonstraram perda de DMO no fêmur total e rádio ultradistal em mulheres após menopausa com 1 ano de uso de diurético de alça quando comparado ao uso de placebo (16); o uso de tiazídico foi associado à atenuação da perda anual de DMO no fêmur total e coluna quando comparado a outros anti-hipertensivos (70) e atenuação de perda da DMO em ossos longos após 2 anos de uso quando comparado com uso de placebo (71).

A HRpQCT é uma ferramenta de pesquisa que auxilia no entendimento dos mecanismos envolvidos na fragilidade óssea, uma vez que fornece informação sobre a microarquitetura do osso cortical e trabecular e permite uma comparação longitudinal de duas imagens do mesmo osso. Em nosso estudo, não foi possível observar diferença na variação anual dos parâmetros aferidos no rádio e tíbia distal, ao contrário do observado por Nickolas et al. que relataram uma redução significativa da área, densidade e espessura cortical no rádio distal em pacientes com DRC (38). Tal discordância pode estar associada ao número reduzido de imagens obtidas para comparação devido a problemas técnicos que ocorreram durante o estudo (manutenção do aparelho de HRpQCT), sendo que apenas metade da amostra foi analisada até o momento. No entanto, quando comparamos os dados basais das mulheres incluídas no estudo, observamos uma tendência à menor DMO cortical quando comparada com mulheres saudáveis de uma amostra da população brasileira (56).

Ao comparar os grupos, a hidroclorotiazida apresentou efeito sobre o osso trabecular da tíbia com aumento do número de trabéculas e uma redução do espaço entre elas, enquanto a furosemida teve efeito oposto. Dados na literatura sobre o efeito dos tiazídicos sobre o osso trabecular são provenientes de estudos experimentais e com achados diversos: enquanto o tiazídico melhorou a arquitetura trabecular em modelos de ratos hipertensos (aumento de densidade e volume trabecular com redução de separação entre as trabéculas com uso de indapamida) (72) e em modelos de ratos hipercalcêmicos (com aumento do volume trabecular, espessura e número de trabéculas com uso de clortalidona) (73), o mesmo dado não foi observado em camundongos nocautes para canal NCC sensível a tiazídico, que apresentaram aumento da DMO e espessura cortical (47). Por outro lado, não há dados na literatura sobre o efeito de diurético de alça sobre o osso trabecular, para compararmos com nossos achados.

De forma inesperada foi observado um efeito do aumento da área e espessura corticais, uma tendência a aumento de densidade total e cortical no rádio, com redução da área trabecular no grupo FURO, efeito oposto observado no grupo HIDRO. O uso de diurético de alça é associado a maiores valores de PTH, marcadores ósseos e menor DMO como discutido previamente, assim era esperado que o osso cortical apresentasse efeitos deletérios secundários ao uso de furosemida. Estes dados, porém, devem ser avaliados com muita cautela, uma vez que uma pequena parcela de pacientes foi incluída.

O presente estudo possui algumas limitações: a realização em um único centro com pacientes em estágio 3 da DRC não permite afirmar que os mesmos achados seriam encontrados em estágios mais avançados; Não conseguimos comprovar a hipótese de demonstrar a diferença no PTH entre os dois grupos, o que pode ser devido ao tamanho da amostra, ao tempo de observação ou à função renal; Dados sobre o efeito dos diuréticos sobre a microarquitetura óssea não foram conclusivos por problemas técnicos durante o estudo e limitada amostra estudada. Apesar das limitações, este é o primeiro estudo randomizado prospectivo sobre o efeito dos diuréticos em pacientes com DRC, com evidências de efeitos diversos sobre o metabolismo ósseo. Além disso, este foi o primeiro estudo clínico que demonstrou o efeito dos diuréticos sobre os marcadores ósseos em renais crônicos.

Em resumo, a furosemida e a hidroclorotiazida apresentaram efeitos opostos sobre DMO-DRC em um estudo de 1 ano de seguimento. O tiazídico parece estar associado a menor remodelação óssea, o seu uso preferencial poderia em teoria retardar a progressão do HPT ou mesmo reduzir os efeitos deletérios do uso de furosemida em estágios mais avançados da DRC. Estudos com uma amostra maior, maior tempo de seguimento e que incluam estágios mais avançados da DRC fazem-se necessários para confirmar esta hipótese e estabelecer mudança na prática clínica.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

1. No grupo HIDRO, houve redução da calciúria com tendência a maior cálcio sérico total, efeito oposto ao grupo FURO. As concentrações de PTH e 25(OH)VitD1 mantiveram-se semelhantes nos dois grupos. O uso de furosemida foi associado a um aumento de 1,25 (OH)₂VitD e fosfatase alcalina quando comparado ao uso de hidroclorotiazida.
2. O uso de furosemida foi associado a um aumento de CTX e P1NP em relação ao uso de hidroclorotiazida, que teve efeito oposto.
3. Não houve diferença em relação a DMO avaliada pela DXA entre os grupos;
4. Não houve diferença em relação a DMO avaliada pela HRpQCT entre os grupos, mas foi observada uma redução da área trabecular assim como um aumento de área cortical e espessura cortical no grupo FURO em relação ao grupo HIDRO, na HRpQCT do rádio. Houve aumento no espaço entre as trabéculas no grupo FURO em relação ao grupo HIDRO na HRpQCT da tíbia.

7 Referências

7 REFERÊNCIAS

1. El Nahas M. The global challenge of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2005;68(6):2918-29.
2. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet.* 2017;389(10075):1238-52.
3. Ptinopoulou AG, Pikilidou MI, Lasaridis AN. The effect of antihypertensive drugs on chronic kidney disease: a comprehensive review. *Hypertens Res.* 2013;36(2):91-101.
4. Chan CY, Peterson EJ, Ng TM. Thiazide diuretics as chronic antihypertensive therapy in patients with severe renal disease--is there a role in the absence of diuresis? *Ann Pharmacother.* 2012;46(11):1554-8.
5. Kidney Disease: Improving Global Outcomes CKD-MBDWG. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl.* 2009(113):S1-130.
6. Nickolas TL, Leonard MB, Shane E. Chronic kidney disease and bone fracture: a growing concern. *Kidney Int.* 2008;74(6):721-31.
7. Kovesdy CP, Ahmadzadeh S, Anderson JE, Kalantar-Zadeh K. Secondary hyperparathyroidism is associated with higher mortality in men with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2008;73(11):1296-302.
8. Drueke TB, Massy ZA. Changing bone patterns with progression of chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2016;89(2):289-302.
9. Vaidya A, Curhan GC, Paik JM, Kronenberg H, Taylor EN. Hypertension, Antihypertensive Medications, and Risk of Incident Primary Hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(6):2396-404.
10. Ellison DH. Clinical Pharmacology in Diuretic Use. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2019.
11. Blaine J, Chonchol M, Levi M. Renal Control of Calcium, Phosphate, and Magnesium Homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014.
12. Felsenfeld A, Rodriguez M, Levine B. New insights in regulation of calcium homeostasis. *Current opinion in nephrology and hypertension.* 2013;22(4):371-6.
13. Robey RB, Lash JP, Arruda JA. Does furosemide have a role in the management of hypercalcemia? *Ann Intern Med.* 2009;150(2):146-7; author reply 7.
14. Wermers RA, Kearns AE, Jenkins GD, Melton LJ, 3rd. Incidence and clinical spectrum of thiazide-associated hypercalcemia. *Am J Med.* 2007;120(10):911 e9-15.
15. Zaheer S, de Boer I, Allison M, Brown JM, Psaty BM, Robinson-Cohen C, et al. Parathyroid Hormone and the Use of Diuretics and Calcium-Channel Blockers: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Bone Miner Res.* 2016;31(6):1137-45.
16. Rejnmark L, Vestergaard P, Heickendorff L, Andreasen F, Mosekilde L. Loop diuretics increase bone turnover and decrease BMD in osteopenic postmenopausal women: results from a randomized controlled study with bumetanide. *J Bone Miner Res.* 2006;21(1):163-70.
17. Rejnmark L, Vestergaard P, Pedersen AR, Heickendorff L, Andreasen F, Mosekilde L. Dose-effect relations of loop- and thiazide-diuretics on calcium homeostasis: a randomized, double-blinded Latin-square multiple cross-over study in postmenopausal osteopenic women. *Eur J Clin Invest.* 2003;33(1):41-50.
18. Griebeler ML, Kearns AE, Ryu E, Thapa P, Hathcock MA, Melton LJ, 3rd, et al. Thiazide-Associated Hypercalcemia: Incidence and Association With Primary Hyperparathyroidism Over Two Decades. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(3):1166-73.
19. Bolland MJ, Ames RW, Horne AM, Orr-Walker BJ, Gamble GD, Reid IR. The effect of treatment with a thiazide diuretic for 4 years on bone density in normal postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2007;18(4):479-86.

20. LaCroix AZ, Ott SM, Ichikawa L, Scholes D, Barlow WE. Low-dose hydrochlorothiazide and preservation of bone mineral density in older adults. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.* 2000;133(7):516-26.
21. Puttnam R, Davis BR, Pressel SL, Whelton PK, Cushman WC, Louis GT, et al. Association of 3 Different Antihypertensive Medications With Hip and Pelvic Fracture Risk in Older Adults: Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA internal medicine.* 2017;177(1):67-76.
22. Lim LS, Fink HA, Blackwell T, Taylor BC, Ensrud KE. Loop diuretic use and rates of hip bone loss and risk of falls and fractures in older women. *J Am Geriatr Soc.* 2009;57(5):855-62.
23. Heidrich FE, Stergachis A, Gross KM. Diuretic drug use and the risk for hip fracture. *Ann Intern Med.* 1991;115(1):1-6.
24. Ooms ME, Lips P, Van Lingen A, Valkenburg HA. Determinants of bone mineral density and risk factors for osteoporosis in healthy elderly women. *J Bone Miner Res.* 1993;8(6):669-75.
25. Rejnmark L, Vestergaard P, Mosekilde L. Fracture risk in patients treated with loop diuretics. *J Intern Med.* 2006;259(1):117-24.
26. Felson DT, Sloutsakis D, Anderson JJ, Anthony JM, Kiel DP. Thiazide diuretics and the risk of hip fracture. Results from the Framingham Study. *JAMA.* 1991;265(3):370-3.
27. Rejnmark L, Vestergaard P, Mosekilde L. Reduced fracture risk in users of thiazide diuretics. *Calcif Tissue Int.* 2005;76(3):167-75.
28. Schlienger RG, Kraenzlin ME, Jick SS, Meier CR. Use of beta-blockers and risk of fractures. *JAMA.* 2004;292(11):1326-32.
29. Schoofs MW, van der Klift M, Hofman A, de Laet CE, Herings RM, Stijnen T, et al. Thiazide diuretics and the risk for hip fracture. *Ann Intern Med.* 2003;139(6):476-82.
30. Taggart HM. Do drugs affect the risk of hip fracture in elderly women? *J Am Geriatr Soc.* 1988;36(11):1006-10.
31. Berry SD, Zhu Y, Choi H, Kiel DP, Zhang Y. Diuretic initiation and the acute risk of hip fracture. *Osteoporos Int.* 2013;24(2):689-95.
32. Denburg MR, Leonard MB, Haynes K, Tuchman S, Tasian G, Shults J, et al. Risk of fracture in urolithiasis: a population-based cohort study using the health improvement network. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(12):2133-40.
33. Carbone LD, Johnson KC, Bush AJ, Robbins J, Larson JC, Thomas A, et al. Loop diuretic use and fracture in postmenopausal women: findings from the Women's Health Initiative. *Arch Intern Med.* 2009;169(2):132-40.
34. Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle. *Annals of clinical biochemistry.* 2018;55(3):308-27.
35. Portillo MR, Rodriguez-Ortiz ME. Secondary Hyperparathyroidism: Pathogenesis, Diagnosis, Preventive and Therapeutic Strategies. *Reviews in endocrine & metabolic disorders.* 2017;18(1):79-95.
36. Parisien M, Silverberg SJ, Shane E, de la Cruz L, Lindsay R, Bilezikian JP, et al. The histomorphometry of bone in primary hyperparathyroidism: preservation of cancellous bone structure. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;70(4):930-8.
37. McNerny EMB, Nickolas TL. Bone Quality in Chronic Kidney Disease: Definitions and Diagnostics. *Current osteoporosis reports.* 2017;15(3):207-13.
38. Nickolas TL, Stein EM, Dworakowski E, Nishiyama KK, Komandah-Kosseh M, Zhang CA, et al. Rapid cortical bone loss in patients with chronic kidney disease. *J Bone Miner Res.* 2013;28(8):1811-20.
39. West SL, Lok CE, Langsetmo L, Cheung AM, Szabo E, Pearce D, et al. Bone mineral density predicts fractures in chronic kidney disease. *J Bone Miner Res.* 2015;30(5):913-9.

40. Bucur RC, Panjwani DD, Turner L, Rader T, West SL, Jamal SA. Low bone mineral density and fractures in stages 3-5 CKD: an updated systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2015;26(2):449-58.
41. Jannot M, Mac-Way F, Lapierre V, Lafage-Proust MH. The use of bone mineral density measured by dual energy X-ray absorptiometry (DXA) and peripheral quantitative computed microtomography in chronic kidney disease. *Journal of nephrology.* 2017;30(5):635-43.
42. Isakova T, Anderson CA, Leonard MB, Xie D, Gutierrez OM, Rosen LK, et al. Diuretics, calciuria and secondary hyperparathyroidism in the Chronic Renal Insufficiency Cohort. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(4):1258-65.
43. Vasco RF, Moyses RM, Zatz R, Elias RM. Furosemide Increases the Risk of Hyperparathyroidism in Chronic Kidney Disease. *Am J Nephrol.* 2016;43(6):421-30.
44. Koppel MH, Massry SG, Shinaberger JH, Hartenbower DL, Coburn JW. Thiazide-induced rise in serum calcium and magnesium in patients on maintenance hemodialysis. *Ann Intern Med.* 1970;72(6):895-901.
45. Marcus R, Orner F, Arvesen G, Lundquist C. Thiazide diuretics do not potentiate cAMP response to parathyroid hormone. *Metabolism.* 1978;27(6):701-10.
46. Vasco RF, Reis ET, Moyses RM, Elias RM. Thiazide increases serum calcium in anuric patients: the role of parathyroid hormone. *Archives of osteoporosis.* 2017;12(1):31.
47. Hsu YJ, Yang SS, Cheng CJ, Liu ST, Huang SM, Chau T, et al. Thiazide-sensitive Na⁺ - Cl⁻ cotransporter (NCC) gene inactivation results in increased duodenal Ca²⁺ absorption, enhanced osteoblast differentiation and elevated bone mineral density. *J Bone Miner Res.* 2015;30(1):116-27.
48. Dvorak MM, De Joussineau C, Carter DH, Pisitkun T, Knepper MA, Gamba G, et al. Thiazide diuretics directly induce osteoblast differentiation and mineralized nodule formation by interacting with a sodium chloride co-transporter in bone. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2007;18(9):2509-16.
49. Muller ME, Forni Ognà V, Maillard M, Stoudmann C, Zweiacker C, Anex C, et al. Furosemide stimulation of parathormone in humans: role of the calcium-sensing receptor and the renin-angiotensin system. *Pflugers Archiv : European journal of physiology.* 2015;467(12):2413-21.
50. Abdel-Qadir HM, Tu JV, Yun L, Austin PC, Newton GE, Lee DS. Diuretic dose and long-term outcomes in elderly patients with heart failure after hospitalization. *American heart journal.* 2010;160(2):264-71 e1.
51. Wright JM, Musini VM, Gill R. First-line drugs for hypertension. *The Cochrane database of systematic reviews.* 2018;4:CD001841.
52. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, 3rd, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009;150(9):604-12.
53. Isidro ML, Ruano B. Bone disease in diabetes. *Current diabetes reviews.* 2010;6(3):144-55.
54. Fuller H, Fuller R, Pereira RM. [High resolution peripheral quantitative computed tomography for the assessment of morphological and mechanical bone parameters]. *Revista brasileira de reumatologia.* 2015;55(4):352-62.
55. Looker AC, Wahner HW, Dunn WL, Calvo MS, Harris TB, Heyse SP, et al. Updated data on proximal femur bone mineral levels of US adults. *Osteoporos Int.* 1998;8(5):468-89.
56. Alvarenga JC, Fuller H, Pasoto SG, Pereira RM. Age-related reference curves of volumetric bone density, structure, and biomechanical parameters adjusted for weight and height in a population of healthy women: an HR-pQCT study. *Osteoporos Int.* 2017;28(4):1335-46.

57. Levin A, Bakris GL, Molitch M, Smulders M, Tian J, Williams LA, et al. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int.* 2007;71(1):31-8.
58. Silva Junior GB, Bentes AC, Daher EF, Matos SM. Obesity and kidney disease. *Jornal brasileiro de nefrologia : 'orgao oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia.* 2017;39(1):65-9.
59. Jean G, Souberbielle JC, Chazot C. Vitamin D in Chronic Kidney Disease and Dialysis Patients. *Nutrients.* 2017;9(4).
60. Pike JW, Christakos S. Biology and Mechanisms of Action of the Vitamin D Hormone. *Endocrinology and metabolism clinics of North America.* 2017;46(4):815-43.
61. Negrea L. Active Vitamin D in Chronic Kidney Disease: Getting Right Back Where We Started from? *Kidney diseases.* 2019;5(2):59-68.
62. Nijenhuis T, Hoenderop JG, van der Kemp AW, Bindels RJ. Localization and regulation of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV6 in the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2003;14(11):2731-40.
63. Hoenderop JG, Dardenne O, Van Abel M, Van Der Kemp AW, Van Os CH, St -Arnaud R, et al. Modulation of renal Ca²⁺ transport protein genes by dietary Ca²⁺ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase knockout mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2002;16(11):1398-406.
64. Kladnitsky O, Rozenfeld J, Azulay-Debby H, Efrati E, Zelikovic I. The claudin-16 channel gene is transcriptionally inhibited by 1,25-dihydroxyvitamin D. *Experimental physiology.* 2015;100(1):79-94.
65. Bazzini C, Vezzoli V, Sironi C, Dossena S, Ravasio A, De Biasi S, et al. Thiazide-sensitive NaCl-cotransporter in the intestine: possible role of hydrochlorothiazide in the intestinal Ca²⁺ uptake. *The Journal of biological chemistry.* 2005;280(20):19902-10.
66. Olmos JM, Hernandez JL, Martinez J, Castillo J, Valero C, Perez Pajares I, et al. Bone turnover markers and bone mineral density in hypertensive postmenopausal women on treatment. *Maturitas.* 2010;65(4):396-402.
67. Lajeunesse D, Delalandre A, Guggino SE. Thiazide diuretics affect osteocalcin production in human osteoblasts at the transcription level without affecting vitamin D₃ receptors. *J Bone Miner Res.* 2000;15(5):894-901.
68. Bezerra de Carvalho KS, Vasco RFV, Custodio MR, Jorgetti V, Moyses RMA, Elias RM. Chronic kidney disease is associated with low BMD at the hip but not at the spine. *Osteoporos Int.* 2019;30(5):1015-23.
69. Gorriz JL, Molina P, Cerveron MJ, Vila R, Bover J, Nieto J, et al. Vascular calcification in patients with nondialysis CKD over 3 years. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015;10(4):654-66.
70. Solomon DH, Ruppert K, Zhao Z, Lian YJ, Kuo IH, Greendale GA, et al. Bone mineral density changes among women initiating blood pressure lowering drugs: a SWAN cohort study. *Osteoporos Int.* 2016;27(3):1181-9.
71. Reid IR, Ames RW, Orr-Walker BJ, Clearwater JM, Horne AM, Evans MC, et al. Hydrochlorothiazide reduces loss of cortical bone in normal postmenopausal women: a randomized controlled trial. *Am J Med.* 2000;109(5):362-70.
72. Lalande A, Roux C, Graulet AM, Schiavi P, De Vernejoul MC. The diuretic indapamide increases bone mass and decreases bone resorption in spontaneously hypertensive rats supplemented with sodium. *J Bone Miner Res.* 1998;13(9):1444-50.
73. Bushinsky DA, Willett T, Asplin JR, Culbertson C, Che SP, Grynepas M. Chlorthalidone improves vertebral bone quality in genetic hypercalciuric stone-forming rats. *J Bone Miner Res.* 2011;26(8):1904-12.

8 Apêndices

8 APÊNDICES

Apêndice 1. Aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq)

Apêndice 2. Submissão dos resultados à plataforma “Clinical Trials”

Apêndice 3. Publicação na revista *Am J Nephrology*

Apêndice 4. Publicação na revista *Arquives of Osteoporosis*

Apêndice 1.

Aprovação pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo clínico prospectivo sobre o efeito dos diuréticos tiazídicos e furosemida sobre a DMO-DRC

Pesquisador: Rosilene Motta Elias

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 42093415.9.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO
HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.016.084

Data da Relatoria: 25/03/2015

Apresentação do Projeto:

Projeto descrito adequadamente conforme primeiro parecer

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos estão adequados

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios do projeto estão claros e objetivos

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa tem mérito científico e ético

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As considerações sobre o TCLE foram respondidas adequadamente

Recomendações:

Sem recomendações adicionais

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto sem pendências

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 1.016.084

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 09 de Abril de 2015

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Apêndice 2.

Submissão dos resultados à plataforma “Clinical Trials”

ClinicalTrials.gov PRS DRAFT Receipt (Working Version)

Last Update: 04/24/2019 12:54

ClinicalTrials.gov ID: NCT03082742

Study Identification

Unique Protocol ID: Diuretics - CKD-MBD

Brief Title: The Effect of Diuretics on Mineral and Bone Disorder in Chronic Kidney Disease Patients

Official Title: The Effect of Thiazide and Loop Diuretic on Mineral and Bone Disorder in Chronic Kidney Disease Patients

Secondary IDs:

Study Status

Record Verification: October 2017

Overall Status: Completed

Study Start: August 1, 2015 [Actual]

Primary Completion: January 2019 [Actual]

Study Completion: April 22, 2019 [Actual]

Sponsor/Collaborators

Sponsor: University of Sao Paulo General Hospital

Responsible Party: Sponsor

Collaborators:

Oversight

U.S. FDA-regulated Drug:

U.S. FDA-regulated Device:

U.S. FDA IND/IDE: No

Human Subjects Review: Board Status: Approved

Approval Number: 42093415.9.0000.0068

Board Name: Cappelq

Board Affiliation: Universidade de Sao Paulo

Phone: 26617585

Email: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Address:

Data Monitoring: No

Study Description

Brief Summary: Chronic kidney disease (CKD) patients often have associated systemic hypertension due to volume retention, as one of the mechanisms, therefore the use of diuretics is widespread in this population. One of the major complications of CKD is mineral and bone metabolism disorder (CKD-MBD), which include changes in the levels of calcium, phosphorus, vitamin D deficiency, increased circulating levels of fibroblast growth factor (FGF-23) and parathyroid hormone (PTH). These alterations are responsible for fractures, cardiovascular disease and mortality among patients with CKD. According to diuretic mechanism of action, sometimes increasing serum calcium (in the case of furosemide), sometimes decreasing it (in the case of thiazide), it is expected that the serum calcium may be altered, even within the range of normality, with consequent impact on the levels of PTH. Although most studies have shown that the use of thiazide diuretics decreases the risk of fractures, some showed the opposite. Similarly, although most studies have shown increased risk of fracture in association to loop diuretics use, some have failed in demonstrated this outcome. Only one study, a cohort study in a population of CKD, showed that furosemide was directly related to increased calciuria and PTH levels and the use of thiazide, in turn, showed completely opposite effect. However, certain issues are still not completely solved, for example, the interference of renal function itself on calciuria. It is possible that calciuria is not a so simple explanation that justifies the PTH levels changes, as no correlation was seen between calciuria and PTH levels. Better understanding of the exact relationship between the use of diuretics and the impact on CKD-MBD may be an alternative intervention, easily accessible and relatively inexpensive. The purpose of this study is to evaluate the impact of diuretic, specifically hydrochlorothiazide and furosemide, on bone architecture and mineral metabolism.

Detailed Description: This is a prospective randomized study to test the effects of thiazide and furosemide in bone parameters, which will be assessed by peripheral micro-tomography at baseline and 12 months later. The role of calciuria in these possible changes will be tested.

Conditions

Conditions: Secondary Hyperparathyroidism
Chronic Kidney Disease

Keywords: diuretics
furosemide
hydrochlorothiazide
CKD-MBD
HRpQCT
parathyroid hormone

Study Design

Study Type: Interventional

Primary Purpose: Prevention

Study Phase: N/A

Interventional Study Model: Parallel Assignment

Number of Arms: 2

Masking: Single (Investigator)

Allocation: Randomized

Enrollment: 40 [Actual]

Arms and Interventions

Arms	Assigned Interventions
Active Comparator: Furosemide Use of Furosemide, 40mg (1 tablet) per day, over 12 months	Drug: Furosemide
Active Comparator: Hydrochlorothiazide Use of Hydrochlorothiazide, 25mg (1 tablet) per day, over 12 months	Drug: Hydrochlorothiazide

NOTE : Intervention Other Names have not been specified

NOTE : Intervention Other Names have not been specified

Outcome Measures

Primary Outcome Measure:

1. Parathyroid hormone (PTH) level.
Bone metabolism

[Time Frame: 12 months]

Eligibility

Minimum Age: 18 Years

Maximum Age: 80 Years

Sex: All

Gender Based:

Accepts Healthy Volunteers: No

Criteria: Inclusion Criteria:

- Estimated Glomerular Filtration Rate (calculated by CKD-EPI) between 30 and 60 ml/min

Exclusion Criteria:

- Diabetes;
- chronic use of: steroid, bisphosphonates and calcium carbonate

Contacts/Locations

Central Contact Person: Rosilene M Elias, M.D., Ph.D
Telephone: +5511 26617167
Email: rosilenemotta@hotmail.com

Central Contact Backup:

Study Officials: Rosilene M Elias, M.D., Ph.D

Study Principal Investigator
University of Sao Paulo

Locations: **Brazil**

Hospital das Clinicas

Sao Paulo, SP, Brazil, 05403-000

Contact: Rosilene M Elias, M.D, Ph.D +5511 2661-7167
rosilenemotta@hotmail.com

Principal Investigator: Rosilene M Elias, M.D., Ph.D

IPDSharing

Plan to Share IPD: No

References

Citations:

Links:

Available IPD/Information:

U.S. National Library of Medicine | U.S. National Institutes of Health | U.S. Department of Health & Human Services

Apêndice 3.

Publicação na revista *Am J Nephrology*

Furosemide Increases the Risk of Hyperparathyroidism in Chronic Kidney Disease

Raquel F.V. Vasco^a Rosa M.A. Moyses^{a, b} Roberto Zatz^a Rosilene M. Elias^a

^aDepartment of Medicine, Renal Division, Universidade de São Paulo, and ^bUniversidade Nove de Julho, Uninove, São Paulo, Brazil

Key Words

Chronic kidney disease · Furosemide · Thiazide · Hyperparathyroidism · Diuretics

Abstract

Background: Diuretics are widely used in patients with chronic kidney disease (CKD). While thiazide-like diuretics limit urinary calcium excretion, loop diuretics (LD) promote calcium wasting, which might facilitate the development of secondary hyperparathyroidism (HPT2). We sought to investigate, in CKD patients not on dialysis, the influence of either hydrochlorothiazide (Hydro) or furosemide (Furo) on circulating parathyroid hormone (PTH) and whether such actions are determined by the effects of these compounds on calcium excretion. **Methods:** Electronic charts of all nephrology outpatients (CKD stages 2–5) who were given Hydro or Furo were included. We assessed estimated glomerular filtration rate (eGFR), biochemical parameters and 24-hour calcium excretion. Hyperparathyroidism was defined as PTH >65 pg/ml. **Results:** Out of 275 patients, 108 (29%) were taking Hydro and 167 (61%) Furo. Patients on Hydro were younger, mostly female and had higher eGFR. The median 24-hour urinary calcium excretion in the overall cohort was 41 (22, 76), being lower in Furo than in Hydro patients (37 (16, 68) vs. 47 (26, 88) mg/24 h, respectively, $p = 0.016$). Logistic regression showed that, after adjustment for eGFR, calcium excretion rate was found not to increase the risk ratio for HPT2, where-

as Furo was a strong predictor of HPT2. **Conclusion:** Furo increased the risk of HPT2 among CKD patients compared to Hydro. This effect was independent of eGFR or calcium excretion. The use of LD in CKD, currently preferred in advanced stages, should be reappraised. © 2016 S. Karger AG, Basel

Introduction

Whereas thiazides and thiazide-like diuretics (TTLDs) are widely prescribed until stage 3 chronic kidney disease (CKD), loop diuretics (LDs) are preferred once estimated glomerular filtration rate (eGFR) falls below 30 ml/min [1, 2], although the evidence in favor of higher efficacy of the latter in this context is scarce.

A second established concept about the use of diuretics in CKD is that LDs promote calcium wasting as a result of their specific mechanisms of action, whereas TTLDs limit urinary calcium excretion. A possible consequence of the hyper-calciuric effect of LDs is that long-term use of these compounds may promote secondary hyperparathyroidism (HPT2) [3]. Accordingly, chronic use of furosemide (Furo) was associated with low bone mineral density and possibly high risk of fractures in postmenopausal women [4], whereas TTLD may exert an opposite effect [5–7]. However, no data are available for such effect of LD in CKD.

Fig. 1. Flowchart, showing the number of patients screened, the number of patients excluded because of missing data and the final number of patients included. Diuretic groups Furo or Hydro.

The notion that the respective effects of TTLD and LD on parathyroid hormone (PTH) are solely mediated by changes in calcium excretion has been challenged. Koppel et al. [8] showed that hydrochlorothiazide (Hydro) increases plasma calcium even in anephric patients. Hsu et al. [9] showed that TTLDs accelerate the differentiation of osteoblasts. Other TTLD effects unrelated to calcium excretion include vasodilation [1], increase of plasma Klotho [10] and renoprotection in experimental CKD [11–13].

In this retrospective study, we sought to investigate the influence of either Hydro or Furo on circulating PTH in a relatively large number of CKD patients who were not on dialysis and whether such actions are determined by the effects of these compounds on calcium excretion.

Methods

Source Population

This is an observational retrospective study. Patients were selected from a CKD outpatient clinic located in a medical school hospital (Hospital das Clinicas, Universidade de Sao Paulo).

As 24-hour urinary excretion was central to our study, we excluded patients for whom this information was not available. Overall, patients excluded were younger (57 ± 15 years) and exhibited higher eGFR (75.1 ± 28.0 ml/min), as well as higher circulating calcium (9.4 ± 0.7 mg/dl), albumin (4.4 ± 0.5 g/l) and bicarbonate

(25.8 ± 2.9 mmol/l) levels when compared to the final sample (all p values <0.005). In addition, excluded patients exhibited lower serum levels of alkaline phosphatase (82 ± 43 U/l), PTH (81.4 ± 96.4 pg/ml), potassium (4.2 ± 0.5 mEq/l), uric acid (5.9 ± 1.7 mg/dl), phosphate (3.9 ± 1.0 mg/dl) and PTH (99 (59, 187) pg/ml). However, when the comparison was done within each CKD stage, there was no statistically significant difference in any biochemical or demographic variable.

Data Collection

Data were obtained from electronic charts. We screened a total of 3,642 patients who were using Furo or Hydro, excluding those taking both diuretics. The variable of interest, 24-hour calcium excretion, was available only in 18.5% of these patients ($n = 555$). The eGFR was obtained using the CKD-EPI equation. We excluded patients with eGFR ≥ 90 ml/min (stage 1 CKD, $n = 220$), as a large fraction of them was being treated for lithiasis and/or primary hypercalciuria. After further exclusion of those with missing PTH values, there remained 275 individuals distributed into 2 groups: Furo, taking Furo, and Hydro, taking Hydro. A flowchart representing the study design is shown in figure 1.

Urine and total serum calcium, serum phosphate, albumin and uric acid were measured by automated colorimetry. Serum potassium and bicarbonate levels were measured with an ion-selective electrode. Serum 25(OH)-vitamin D was quantified by chemo-immunoassay (DiaSorin, Stillwater, Minn., USA), with normal values ranging between 30 and 40 ng/ml. Plasma PTH (normal range 11–62 pg/ml) and alkaline phosphatase (normal range 32–122 U/l) were assessed by radioimmunoassay and a kinetic automated method, respectively. Hyperparathyroidism was defined as a se-

Table 1. Demographic and laboratory parameters according to diuretic use

	Total (n = 275)	Hydro (n = 108)	Furo (n = 167)	p value
Age, years	65±14	63±13	66±14	0.006
Male sex, n (%)	130 (47.3)	39 (36.4)	91 (54.2)	0.004
eGFR, ml/min/1.73 m ²	30 (18, 45)	45 (33, 53)	21 (13, 33)	0.0001
Calcium, mg/dl	9.3±0.8	9.5±0.6	9.3±0.9	0.038
Phosphate, mg/dl	3.7±1.0	3.4±0.6	3.9±1.1	0.0001
Alkaline phosphatase, UI/l	80 (62, 102)	72 (59, 89)	85 (65, 114)	0.001
PTH, pg/ml	95 (61, 161)	64 (44, 90)	135 (81, 215)	0.0001
25(OH)-vitamin D, ng/ml	27.4±9.4	29.7±9.0	26.0±9.4	0.001
Dietary vitamin D use, n (%)	107 (38.9)	37 (34.6)	70 (42.4)	0.196
Calcium carbonate use, n (%)	23 (8.4)	8 (7.5)	15 (8.9)	0.672
Calcitriol use, n (%)	44 (16.0)	8 (7.5)	36 (21.4)	0.0001
Potassium, mEq/l	4.5±0.6	4.3±0.5	4.6±0.6	0.0001
Uric acid, mg/dl	7.0±1.7	6.7±1.7	7.2±1.8	0.069
Serum albumin, g/dl	4.3±0.4	4.4±0.3	4.2±0.5	0.0001
Hemoglobin, g/dl	12.8±2.1	13.6±1.8	12.3±2.1	0.0001
Bicarbonate, mmol/l	24.3±3.3	25.4±3.0	23.7±3.2	0.0001

rum PTH value exceeding 65 pg/ml [14]. No attempt was made to define 'adequate' values for serum PTH in patients with advanced CKD as the optimal PTH level is not known [15].

Patients received conventional pharmacologic treatment for hypertension, diabetes and comorbidities. Calcium carbonate, sevelamer, calcitriol and cholecalciferol were prescribed according to the usual clinical practice.

This study was approved by the local Research Ethics Committee (Cappesq #45163715.4.0000.0068). Since it was a retrospective study, no informed consent form was required.

Statistical Analyses

Comparisons between Furo and Hydro groups were performed by the Student t test or the Mann-Whitney U test (for normally and non-normally distributed variables, respectively). The chi-square and Fisher exact test were used to compare categorical variables. Correlations between single variables were examined by the Spearman or Pearson correlation coefficients as appropriate. Multivariable relationships between serum calcium and independent variables were examined by linear regression. Logistic analysis was performed with PTH >65 pg/ml as a dependent categorical variable (HPT2). Data are presented as means ± SD unless indicated otherwise. A p value <0.05 was considered significant. Analyses were performed with the use of SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA) and GraphPad Prism[®] software version 6.0 (GraphPad Software, Inc., Calif., USA).

Results

Demographics and Clinical Biochemistry

Table 1 presents the clinical characteristics of participants according to diuretic use. Patients in the Hydro group were younger (p = 0.006), had a lower proportion

of men (p = 0.004) and exhibited higher eGFR (p = 0.0001). Regarding mineral metabolism, these patients had higher serum levels of calcium (p = 0.038) and 25(OH)-vitamin D (p = 0.001), as well as lower levels of serum phosphate (p = 0.0001), alkaline phosphatase (p = 0.001) and PTH (p = 0.0001). Additionally, a lower proportion of Hydro patients were taking calcitriol (p = 0.0001). Lower potassium (p = 0.0001) and higher albumin (p = 0.0001), bicarbonate (p = 0.0001) and hemoglobin (p = 0.0001) were also observed in the blood of Hydro patients. As the majority of these differences might be explained by the lower eGFR observed in the Furo group, we analyzed differences between Furo and Hydro groups within each CKD stage as shown in table 2. Although serum calcium was similar between Furo and Hydro groups from stages 2 to 5, PTH was consistently higher among patients on Furo from stage 3 on.

Prevalence and Risk of HPT2

HPT2 (serum PTH >65 pg/ml) was found in 191 patients (145 patients from the Furo and 46 patients from the Hydro group, p = 0.0001; table 3). A fully adjusted logistic analysis showed that the risk ratio (RR) for HPT2 was 6.2 for the use of Furo when the use of Hydro was taken as reference. Additionally, the risk of HPT2 was inversely related to eGFR (RR 0.93) and weakly but significantly to urinary calcium excretion (RR 0.99). These results remained unchanged after adjustments for the use of calcium carbonate, sevelamer, cholecalciferol and calcitriol (data not shown).

Table 2. Participants' characteristics by diuretic use according to CKD stage

	CKD stage			
	CKD 2	CKD 3	CKD 4	CKD 5
Number for Furo/Hydro groups	14/53	40/33	60/18	55/2
Age, years				
All	62±12	67±13	67±16	64±12
Furo	65±13	68±13	68±16	65±12
Hydro	61±11	65±14	65±15	60±5
Calcium, mg/dl				
All	9.5±0.6	9.5±0.6	9.3±0.8	9.0±1.1
Furo	9.5±1.0	9.5±0.7	9.3±0.9	9.0±1.1
Hydro	9.5±0.5	9.5±0.5	9.2±0.6	9.2±1.5
Phosphate, mg/dl				
All	3.2±0.5	3.3±0.5	3.8±0.6	4.7±1.5
Furo	3.0±0.3	3.3±0.5	3.8±0.6	4.7±1.5
Hydro	3.2±0.5	3.4±0.6	3.6±0.5	4.7±0.8
Alkaline phosphatase, UI/l				
All	76 (59–95)	83 (64–103)	73 (60–106)	85 (71–117)
Furo	81 (61–135)*	84 (73–114)	81 (59–112)*	85 (71–115)
Hydro	73 (58–90)	80 (59–94)	69 (64–87)	60 (54–66) ^a
PTH, pg/ml				
All	59 (44–78)	79 (60–123)	117 (79–182)	212 (140–418)
Furo	69 (51–81)	100 (71–147)*	133 (86–207)*	212 (141–409)*
Hydro	58 (43–77)	65 (51–90)	87 (39–141)	87 (28–147) ^a
25(OH)-vitamin D, ng/ml				
All	28.1±9.3	28.0±8.4	28.5±10.2	24.6±9.5
Furo	24.8±8.4	27.0±9.0	27.1±9.9*	24.4±9.4
Hydro	28.9±9.4	29.2±7.6	32.9±9.9	26.0±4.5
24-Hour urinary calcium excretion				
All	63 (34–106)	54 (24–100)	32 (15–65)	28 (10–52)
Furo	78 (44–124)	65 (33–110)	32 (13–58)	28 (10–46)
Hydro	54 (34–94)	39 (22–86)	53 (15–74)	26 (10–47) ^a
eGFR				
All	52.8±4.6	36.3±4.2	22.3±4.3	9.9±3.5
Furo	52.3±4.2	35.6±4.0	22.1±4.4	9.9±3.5
Hydro	52.9±4.7	37.3±4.3	23.0±3.8	10.9±3.9
Dietary vitamin D use, n (%)				
All	23	28	29	26
Furo	7	14	22	26
Hydro	16	14	7	0
Calcium carbonate use, n (%)				
All	10	4	8	5
Furo	2	2	5	5
Hydro	8	2	3	1
Calcitriol use, n (%)				
All	2	7	18	17
Furo	1	5	13	17
Hydro	1	2	5	0

^a Indicates median (min–max) as only 2 samples were available.* $p < 0.05$ Furo vs. Hydro groups within each CKD stage.

Fig. 2. a Correlation between serum PTH and eGFR for the Hydro (clear circles/dashed line) and Furo (filled circles, continuous line). Correlation was highly significant for both groups ($r = -0.234$, $p = 0.016$ for the Hydro group, and $r = -0.546$, $p < 0.0001$ for the Furo group). The slope of the regression lines were -1.199 ± 0.36 (95% CI -1.91 to -0.48) for the Hydro group and -5.88 ± 0.91

(95% CI -7.66 to -4.09) for the Furo group, a highly significant difference ($p < 0.0001$). **b** No correlation was seen between serum PTH and serum calcium for the Hydro ($r = -0.120$, $p = 0.224$) and Furo groups ($r = -0.022$, $p = 0.773$), with no difference between the slopes of the regression lines ($p = 0.331$).

Table 3. Logistic analysis for the risk of HPT2 defined as PTH >65 pg/ml

	RR	95% CI	p value
Age, years	1.01	0.98–1.04	0.704
eGFR	0.93	0.89–0.98	0.007
Serum calcium	0.95	0.52–1.74	0.865
Serum phosphate	0.77	0.44–1.34	0.359
24-Hour calcium excretion	0.99	0.98–0.99	0.003
Levels of 25(OH)-vitamin D	0.99	0.95–1.03	0.703
Diuretic			
Hydro	Reference	Reference	Reference
Furo	6.20	2.62–14.67	0.0001

The higher risk of HPT2 associated with the use of Furo is further illustrated in figure 2a. Although a significant negative correlation existed between serum PTH and eGFR for both the Furo and the Hydro groups, the slope of the corresponding regression line was much higher in the Furo than in the Hydro group ($p < 0.05$). No correlation between serum PTH and serum calcium was shown in either the Furo or the Hydro group (fig. 2b).

The correlation between urinary calcium excretion rate and PTH is depicted in figure 3. Serum PTH tended to be higher in the Furo than in the Hydro group along the whole range of calcium excretion rates. Accordingly, the magnitude of the negative slope of the respective re-

gression line was much higher in the Furo (-0.67 ± 0.28) than in the Hydro (-0.25 ± 0.09) group ($p < 0.0001$).

A comparison between the Hydro and Furo groups regarding the 24-hour calcium excretion rate and the plasma levels of PTH in patients at stages 3 and 4 of CKD is given in figure 4. In this plot, the dissociation between calcium excretion rate and serum PTH levels is clear; while no significant difference in calcium excretion was seen, PTH levels were significantly higher in the Furo versus the Hydro group at both stages.

Urinary Calcium Excretion

Overall, the median 24-hour urinary calcium excretion was 41 (22, 76), with a maximum value of 245 mg/24 h. Although the overall urinary calcium excretion was lower in the Furo than in the Hydro group (37 (16, 68) vs. 47 (26, 88) mg/24 h, respectively, $p = 0.016$), this difference disappeared when the comparison was performed within each CKD stage (table 2). Urinary calcium excretion correlated inversely with eGFR in both Hydro and Furo groups (fig. 5). The 24-hour urinary calcium excretion also correlated significantly with serum albumin ($r = 0.187$), hemoglobin ($r = 0.362$) and bicarbonate ($r = 0.306$), even after adjustment for eGFR.

Serum Calcium Concentration

Serum calcium in the entire cohort was 9.3 ± 0.8 mg/dl, ranging from 6.0 to 12.9 mg/dl. Hypocalcemia (Ca

Fig. 3. Correlation between 24-hour urinary calcium excretion and serum PTH for Hydro ($r = -0.261$, $p = 0.007$) and Furo groups ($r = -0.294$, $p = 0.0001$). Again, the slope of the regression line was much higher in the Furo than in the Hydro group. Symbols as in figure 2.

Fig. 4. The 24-hour calcium excretion and PTH in patients with CKD stages 3 and 4. The median is represented by circles or squares and the 25, 75 interquartile ranges are represented as vertical bars.

Fig. 5. Relationship between 24-hour calcium excretion and eGFR. The filled circles represent results from the Furo group, whereas the clear circles represent the Hydro group. Vertical dashed lines delimit CKD stages. The correlation was significant for both Furo and Hydro groups ($r = 0.370$, $p < 0.0001$ and $r = 0.250$, $p = 0.009$, respectively), with no difference between slopes ($p = 0.296$).

<8.5 mg/dl) was observed in 22 patients (8.0%), being more frequent in the Furo than in the Hydro group (11 vs. 3%, respectively, $p = 0.012$). Deficiency of 25(OH)-vitamin D (<30 ng/ml) was not associated with a higher prevalence of hypocalcemia ($p = 0.266$). Hypercalcemia ($\text{Ca} >10.2$ mg/dl) was found in 27 patients (9.9%), with no significant difference between the Hydro and Furo groups (7.5 vs. 11.3%, respectively, $p = 0.309$).

Discussion

In the present study, Furo administration to CKD patients was associated with 3.9 time higher odds of developing HPT2 as with Hydro treatment, even after adjustment for eGFR. These observations, which are consistent with those obtained in the CRIC study [3], indicate that although LDs are often preferred over TTLDs for the treatment of hypertension and edema in advanced CKD, they may aggravate bone metabolic disease in this setting. Conversely, evidence is accumulating that TTLDs not only lack these adverse effects but might even exert a protective effect on bone density and fractures in the non-CKD population [5, 7, 16–19].

The reasons for the widely differing actions of LD and TTLD on bone metabolism are open to debate. In the CRIC study [3], this difference was ascribed to the well-known differences between TTLD and LD regarding calcium excretion [20]. However, a recent study has shown that acute administration of Furo to healthy individuals

promoted an increase of PTH levels in the absence of any detectable electrolyte changes [21], perhaps as a result of a direct effect on the Na-K-2Cl cotransporter expressed at the parathyroid gland [22]. A similar dissociation between serum calcium and PTH secretion in human subjects was observed when the administration of Furo lasted for several days [20]. Thus, although the increase of PTH levels by Furo appears to be well established, it cannot be easily ascribed to hypercalciuria. The complexity of these effects is further amplified in CKD, in which the interaction between PTH and calcium excretion is even more intricate, especially when such a wide range of eGFRs as observed in our study is considered.

The results of the present study are also in disagreement with the view that the differences between Hydro and Furo regarding the risk of HPT2 in CKD result from diverging effects on calciuria. The overall calcium excretion rate was never higher in the Furo group, whereas no difference between groups became apparent even when the cohort was ranked by eGFR or when plasma PTH levels were expressed as a function of calciuria. One possible explanation for this apparent dissociation between PTH and calcium excretion could be the selection bias that is inevitable in this setting, since Hydro is predominantly prescribed to patients with higher eGFRs, whereas Furo is usually preferred for patients with more advanced kidney disease, thus blunting whatever differences might exist between treatments. That such a selection occurred in this study is clearly shown in figure 2a, which nevertheless also shows that the regression lines between calcium ex-

cretion rate and eGFR for either therapy were nearly identical, suggesting that the overall effects of Hydro and Furo on calcium excretion along the course of CKD did not differ substantially and that, in these patients, the calcium excretion rate was largely a function of the remaining renal mass. Moreover, no difference in calcium excretion was observed even when only Hydro- and Furo-treated patients within the same CKD phase, who therefore exhibited similar eGFRs, were compared.

The logistic analysis we performed casts further doubt as to whether the divergent risks of HPT2 between Hydro and Furo can be explained by differences in calcium excretion rates. While the RR for HPT2 expectedly increased as eGFR fell, calcium excretion rate was not associated with an increased risk of HPT2, as would be expected if hypercalciuria were to explain the higher prevalence of HPT2 in Furo-treated patients. Rather, calcium excretion rate was a weak negative predictor of HPT2. On the other hand, when Hydro treatment was taken as a reference, Furo was a strong predictor of HPT2, in a way that was independent of either eGFR or calcium excretion rate, reinforcing the concept that Furo treatment exerted a deleterious effect on the parathyroid bone axis and stressing once again the complex relationship between calcium excretion rate, diuretic use and HPT2.

The reasons why TTLDs might help to prevent HPT2 without a clear mediation of its effect on calcium excretion rate are unclear. It should be noted that unlike LDs, TTLDs can facilitate phosphate excretion [23], which would tend to reduce the circulating PTH levels although the mechanisms underlying this effect are obscure. Although no difference in plasma phosphate concentration was observed in this study, it should be noted that this parameter is influenced by the simultaneous action of several factors, such as sodium and phosphorus dietary intake, the number of nephrons and FGF-23 levels, among others. Besides their effects on calcium and phosphorus metabolism, TTLDs can also directly influence some aspects of the calcium-parathyroid-bone axis. Dvorak et al. [24] showed that TTLDs can increase bone mineralization and osteoblast differentiation independent of any renal effects. Lajeunesse et al. [25] showed that Hydro blocks the effect of osteocalcin, an inhibitor of bone mineralization. Hsu et al. [9] showed that mice in which the distal sodium chloride cotransporter gene was inactivated (i.e., mimicking Gitelman's disease) exhibited enhanced intestinal calcium absorption, as well as accelerated osteoblast differentiation and increased bone mineral density. Whether any of these findings is related to

the protection against HPT2 conferred by TTLD is presently unclear.

The main strength of our study is to have examined the effect of diuretic therapy on HPT2 in a relatively large sample of CKD patients not on dialysis. Such studies are still rare, and most information on the effect of diuretics on bone metabolism has been obtained in people with normal renal function. On the other hand, our study has inherent limitations that stem from its observational and retrospective nature. First, our data are inevitably prone to bias, although this was attenuated by multivariable analyses and adjustments for confounders. Second, we cannot exclude the possibility of residual confounding due to incomplete information on prescribed medication, although the influence of drugs such as calcitriol and cholecalciferol was found to be negligible in an additional statistical model. Lastly, no direct assessment of bone disease was performed in these patients. Since 'abnormally high' values for serum PTH may be necessary to avoid adynamic bone disease [15], a diagnosis of HPT2 based solely on serum PTH levels may not entirely reflect the clinical condition of each patient.

As is the case with previous studies, the present observations have obvious clinical implications, suggesting that TTLDs should be preferred in the conservative management of CKD. Such recommendation may be hard to accept since TTLDs are widely believed to become ineffective once stage 3, and especially stage 4, is attained. This notion is largely based on a few clinical observations performed over 50 years ago [26, 27]. However, several recent clinical [28, 29] and experimental [11–13] observations indicate that, in patients with advanced CKD, TTLDs are not only effective as antihypertensives but can even exert a renoprotective action, especially in combination with ACE inhibitors or AT-1 receptor blockers, an effect only partially shared with LDs. The present study suggests that protection against the development of HPT2 could be an additional reason for the preferential use of TTLDs in CKD.

In summary, we have confirmed previous observations that administration of Furo to CKD patients is associated with an increased risk of HPT2 compared to Hydro treatment. This effect was independent of differences in eGFR or in calcium excretion, which was largely a negative function of eGFR. The differing actions of Furo and Hydro could not be attributed to selection bias in the prescription of diuretics. Whether the differences between Furo and Hydro result from non-diuretic salutary actions of Hydro or adverse effects of Furo or a combination of both is unclear. Whatever the mechanisms involved, the chronic use of Furo in CKD should be sub-

jected to judicious scrutiny to avoid bone disease, and administration of TTLD, even in the setting of advanced CKD, should be considered instead. Large, prospective randomized trials are needed to elucidate this matter and to establish a possible change in practice.

Acknowledgments

We thank Fatima Libânio for her assistance in collecting the electronic data.

Author Contributions

Research idea and study design: R.F.V.V., R.M.A.M. and R.M.E.; data acquisition: R.F.V.V.; data analysis/interpretation: R.F.V.V., R.M.A.M., R.Z. and R.M.E.; statistical analysis: R.M.E.;

supervision or mentorship: R.M.A.M., R.Z. and R.M.E. Each author contributed important intellectual content during manuscript drafting or revision and accepts accountability for the overall work by ensuring that questions pertaining to the accuracy or integrity of any portion of the work are appropriately investigated and resolved. R.M.E. takes responsibility that this study has been reported honestly, accurately, and transparently; that no important aspects of the study have been omitted.

Support and Financial Disclosure Declaration

R.F.V. and R.M.E.: nothing to declare. R.Z. and R.M.A.M. are supported by CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant numbers: 303684/2013-5 and 304249/2013-0, respectively). This financial support had no role in study design; collection, analysis and interpretation of data; writing the report; and the decision to submit the report for publication.

References

- Chan CY, Peterson EJ, Ng TM: Thiazide diuretics as chronic antihypertensive therapy in patients with severe renal disease – is there a role in the absence of diuresis? *Ann Pharmacother* 2012;46:1554–1558.
- Oh SW, Han SY: Loop diuretics in clinical practice. *Electrolyte Blood Press* 2015;13:17–21.
- Isakova T, Anderson CA, Leonard MB, Xie D, Gutierrez OM, Rosen LK, Theurer J, Bellorich K, Steigerwalt SP, Tang I, Anderson AH, Townsend RR, He J, Feldman HI, Wolf M; Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study Group: Diuretics, calciuria and secondary hyperparathyroidism in the chronic renal insufficiency cohort. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:1258–1265.
- Rejnmark L, Vestergaard P, Heickendorff L, Andreasen F, Mosekilde L: Loop diuretics increase bone turnover and decrease BMD in osteopenic postmenopausal women: results from a randomized controlled study with bumetanide. *J Bone Miner Res* 2006;21:163–170.
- Bokrantz T, Ljungman C, Kahan T, Schioler L, Hjerpe P, Hasselstrom J, Wettermark B, Bostrom K, Manhem K: 7b.10: thiazide diuretics and fracture-risk among hypertensive patients. Results from the Swedish primary care cardiovascular database (SPCCD). *J Hypertens* 2015;33(suppl 1):e94–e95.
- Kruse C, Eiken P, Vestergaard P: Continuous and long-term treatment is more important than dosage for the protective effect of thiazide use on bone metabolism and fracture risk. *J Intern Med* 2016;279:110–122.
- LaCroix AZ, Ott SM, Ichikawa L, Scholes D, Barlow WE: Low-dose hydrochlorothiazide and preservation of bone mineral density in older adults. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 2000;133:516–526.
- Koppel MH, Massry SG, Shinaberger JH, Hartenbower DL, Coburn JW: Thiazide-induced rise in serum calcium and magnesium in patients on maintenance hemodialysis. *Ann Intern Med* 1970;72:895–901.
- Hsu YJ, Yang SS, Cheng CJ, Liu ST, Huang SM, Chau T, Chu P, Salter DM, Lee HS, Lin SH: Thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter (NCC) gene inactivation results in increased duodenal Ca²⁺ absorption, enhanced osteoblast differentiation and elevated bone mineral density. *J Bone Miner Res* 2015;30:116–127.
- Zhou X, Chen K, Lei H, Sun Z: Klotho gene deficiency causes salt-sensitive hypertension via monocyte chemotactic protein-1/CC chemokine receptor 2-mediated inflammation. *J Am Soc Nephrol* 2015;26:121–132.
- Arias SC, Souza RA, Malheiros DM, Fanelli C, Fujihara CK, Zatz R: An association of losartan-hydrochlorothiazide, but not losartan-furosemide, completely arrests progressive injury in the remnant kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2016;310:F135–F143.
- Arias SC, Valente CP, Machado FG, Fanelli C, Origassa CS, de Brito T, Camara NO, Malheiros DM, Zatz R, Fujihara CK: Regression of albuminuria and hypertension and arrest of severe renal injury by a losartan-hydrochlorothiazide association in a model of very advanced nephropathy. *PLoS One* 2013;8:e56215.
- Fujihara CK, Malheiros DM, Zatz R: Losartan-hydrochlorothiazide association promotes lasting blood pressure normalization and completely arrests long-term renal injury in the 5/6 ablation model. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292:F1810–F1818.
- Ketteler M, Elder GJ, Evenepoel P, Ix JH, Jamal SA, Lafage-Proust MH, Shroff R, Thadhani RI, Tonelli MA, Kasiske BL, Wheeler DC, Leonard MB: 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 Int* 2015;87:502–528.
- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group: KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl* 2009;113:S1–S130.
- Denburg MR, Leonard MB, Haynes K, Tuchman S, Tasian G, Shults J, Copelovitch L: Risk of fracture in urolithiasis: a population-based cohort study using the health improvement network. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014;9:2133–2140.
- Felson DT, Sloutskis D, Anderson JJ, Anthony JM, Kiel DP: Thiazide diuretics and the risk of hip fracture. Results from the Framingham study. *JAMA* 1991;265:370–373.
- Reid IR, Ames RW, Orr-Walker BJ, Clearwater JM, Horne AM, Evans MC, Murray MA, McNeil AR, Gamble GD: Hydrochlorothiazide reduces loss of cortical bone in normal postmenopausal women: a randomized controlled trial. *Am J Med* 2000;109:362–370.
- Schoofs MW, van der Klift M, Hofman A, de Laet CE, Herings RM, Stijnen T, Pols HA, Stricker BH: Thiazide diuretics and the risk for hip fracture. *Ann Intern Med* 2003;139:476–482.

- 20 Coe FL, Canterbury JM, Firpo JJ, Reiss E: Evidence for secondary hyperparathyroidism in idiopathic hypercalciuria. *J Clin Invest* 1973; 52:134–142.
- 21 Muller ME, Forni Ogna V, Maillard M, Stoudmann C, Zwiackier C, Anex C, Wuerzner G, Burnier M, Bonny O: Furosemide stimulation of parathormone in humans: role of the calcium-sensing receptor and the renin-angiotensin system. *Pflugers Arch* 2015;467:2413–2421.
- 22 Maillard MP, Tedjani A, Perregaux C, Burnier M: Calcium-sensing receptors modulate renin release in vivo and in vitro in the rat. *J Hypertens* 2009;27:1980–1987.
- 23 Liamis G, Milionis HJ, Elisaf M: Medication-induced hypophosphatemia: a review. *QJM* 2010;103:449–459.
- 24 Dvorak MM, De Joussineau C, Carter DH, Pisitkun T, Knepper MA, Gamba G, Kemp PJ, Riccardi D: Thiazide diuretics directly induce osteoblast differentiation and mineralized nodule formation by interacting with a sodium chloride co-transporter in bone. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2509–2516.
- 25 Lajeunesse D, Delalandre A, Guggino SE: Thiazide diuretics affect osteocalcin production in human osteoblasts at the transcription level without affecting vitamin D3 receptors. *J Bone Miner Res* 2000;15:894–901.
- 26 Schreiner GE: Chlorothiazide in renal disease. *Ann N Y Acad Sci* 1958;71:420–429.
- 27 Reubi FC, Cottier PT: Effects of reduced glomerular filtration rate on responsiveness to chlorothiazide and mercurial diuretics. *Circulation* 1961;23:200–210.
- 28 Dussol B, Moussi-Frances J, Morange S, Somma-Delpero C, Mundler O, Berland Y: A pilot study comparing furosemide and hydrochlorothiazide in patients with hypertension and stage 4 or 5 chronic kidney disease. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2012;14:32–37.
- 29 Abe M, Okada K, Maruyama T, Matsumoto K: Renoprotect and blood pressure lowering effect of low-dose hydrochlorothiazide added to intensive renin-angiotensin inhibition in hypertensive patients with chronic kidney disease. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2009;47: 525–532.

Apêndice 4.

Publicação na revista *Archives of Osteoporosis*

CASE REPORT

Thiazide increases serum calcium in anuric patients: the role of parathyroid hormone

Raquel F. V. Vasco¹ · Eduardo T. Reis² · Rosa M.A. Moyses^{1,3} · Rosilene M. Elias¹

Received: 23 January 2017 / Accepted: 14 March 2017

© International Osteoporosis Foundation and National Osteoporosis Foundation 2017

Abstract

Summary We evaluated the effect of hydrochlorothiazide in a sample of anuric patients on hemodialysis and found an increase in serum calcium, which occurred only in those with parathyroid hormone >300 pg/ml. This finding highlights the extra-renal effect of this diuretic and a possible role of parathyroid hormone in the mechanism.

Purpose Thiazide diuretics are commonly used in patients with chronic kidney disease to treat hypertension. Their effects on calcium and bone metabolism are not well established, once calciuria may not fully explain levels of calcium and parathyroid hormone (PTH) in this population. A previous study has suggested that thiazides require the presence of PTH as a permissive condition for its renal action. In anuric patients, however, the role of PTH, if any, in the thiazide effect is unknown.

Methods To assess thiazide extra renal effect on serum calcium and whether such an effect is reliant on PTH, hydrochlorothiazide (HCTZ) 100 mg was given orally once a day to a sample of 19 anuric patients on hemodialysis for 2 weeks. Laboratories' analyses were obtained in three phases: baseline, after diuretic use, and after a 2-week washout phase.

Results We demonstrated that serum calcium (Ca) increased in ten patients (52.6%) after HCTZ use, returning to previous levels after the washout period. Out of the 19 patients, ten presented PTH ≥ 300 pg/ml, and Ca has increased in eight of them, whereas in the other nine patients with PTH < 300 pg/ml, serum Ca has increased only in two individuals (RR risk of increase Ca 3.9; $p = 0.012$).

Conclusions HCTZ was capable of increasing serum Ca in a sample of anuric patients on hemodialysis and seems this effect is highly dependent on PTH levels. Caution is required while interpreting this result, as the small sample size might implicate in a finding caused by chance.

Keywords Diuretic · Hemodialysis · Hydrochlorothiazide · Calcium · Parathyroid hormone

Introduction

Thiazide diuretics are widely used to treat hypertension in patients with chronic kidney disease (CKD). As the prescription of diuretics increased in the last two decades so did the incidence of associated hypercalcemia. In most cases, serum calcium returns to the normal range after drug suspension, except in cases of underlying primary hyperparathyroidism. [1] The mechanism of increasing serum calcium is often explained by renal effects of thiazides: increasing urinary calcium absorption or causing metabolic alkalosis. [2, 3] However, we have recently shown that diuretics' effects on calciuria did not fully explain serum calcium levels and PTH among CKD patients. [4] Still, observational studies do not allow us to conclude the use of diuretics can directly affect PTH levels.

✉ Raquel F. V. Vasco
raquelfvasco@gmail.com

¹ Department of Medicine, Renal Division, Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

² Hospital das Clínicas, Pharmacy Division, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

³ Universidade Nove de Julho, UNINOVE, São Paulo, Brazil

Table 1 Laboratory parameters during study protocol, according to parathyroid hormone (PTH) levels

	PTH < 300 (<i>N</i> = 9)				PTH ≥ 300 (<i>N</i> = 10)			
	Baseline	HCTZ	Washout	<i>p</i>	Baseline	HCTZ	Washout	<i>p</i>
PTH (pg/ml)	186 (39, 284)	118 (44, 204)	124 (39, 248)	0.918	575 (490, 926)	683 (224, 871)	590 (482, 847)	0.717
AP (U/l)	76 (61, 101)	77 (62, 102)	82 (61, 113)	0.809	96 (63, 169)	97 (56, 169)	115 (68, 174)	0.264
TCa (mg/dl)	8.9 (8.0, 9.6)	8.3 (7.7, 9.2)	8.7 (8.0, 10.2)	0.327	9.2 (9.1, 9.4)	9.4 (9.3, 10.1)*	9.2 (8.8, 9.7)	0.019
Mg (mg/dl)	2.4 ± 0.3	2.4 ± 0.3	2.4 ± 0.3	0.461	2.6 ± 0.5	2.5 ± 0.4	2.5 ± 0.5	0.571
P (mg/dl)	5.6 ± 1.4	5.2 ± 2.2	5.4 ± 1.6	0.759	6.0 ± 2.1	5.8 ± 2.1	5.8 ± 2.3	0.863

PTH parathyroid hormone, AP alkaline phosphatase, TCa total serum calcium, Mg magnesium, P phosphate

**p* < 0.005 vs. baseline

A previous study has shown that the hypocalciuric effect only occurs in the presence of at least normal levels of PTH. [5]. If there is any action of thiazide in patients without renal failure, and also, the role of PTH in such situation has never been tested. Meanwhile, in CKD patients, in which calciuria is lower due to a decline of renal function [4], thiazide-induced augment in serum calcium was observed on hemodialysis patients [6], suggesting an extra renal effect on calcium metabolism. Based on this result, one can argue that thiazide effect on serum calcium is not entirely based on calcium excretion. Nevertheless, this study was conducted in the 70s and, since then, dialysis prescription and technology, clinical guidelines, and even assays for measuring PTH have substantially changed.

To assess thiazide extra renal effect on serum calcium and whether such an effect is reliant on PTH, we evaluated a sample of anuric patients on hemodialysis.

Methods

A total of 19 individuals were included, and hydrochlorothiazide (HCTZ) was given orally 100 mg once a day for 2 weeks. Blood samples were obtained in three phases: baseline, after diuretic use (HCTZ phase), and after a 2-week washout phase. Chronic glomerulonephritis and diabetes accounted for the majority of CKD etiology (84%). During the study protocol, dialysis prescription was unchanged as well as medications such as calcium salts, calcitriol, and sevelamer.

Alkaline phosphatase, phosphorus, total calcium, 25 hydroxy vitamin D, and magnesium were measured in each phase of study, according to standard techniques. Calcium was measured by an automatic colorimetric method. Parathyroid hormone (PTH) was measured by a second-generation chemiluminescence immunoassay (RR = 11–65 pg/ml; Roche immunoassay analyzer, Roche Diagnostics, Germany). This assay

Fig. 1 Total serum calcium course during study protocol, according to parathyroid hormone (PTH) levels, <300 pg/ml (Fig. 1a) and ≥300 pg/ml (Fig. 1b)

detects both intact PTH and some inactive fragments, from 1.20 to 5000 pg/ml or 0.127 to 530 pmol/ml; CV of the method is 2.1%.

A pharmacist assessed adherence based on pill count technique.

All patients signed an informed consent. The Local Research Ethics Boards has approved this study (Cappesq #42093415.9.0000.0068).

Statistical analysis

Data are presented in mean $\pm$ SD or median (25.75) according to normality distribution, tested with D'Agostino-Pearson omnibus normality test. Mean differences in variables among baseline, HCTZ, and washout phases were assessed by repeated measures ANOVA, with Bonferroni post-test when significant, or Friedman test when appropriate. A value of $p < 0.05$ was considered significant. Analyses were performed with the use of SPSS 21.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and GraphPad Prism® software, version 6.0 (GraphPad Software, Inc., CA, USA).

Results

Patients aged 44 ± 15 years (68% were men), on hemodialysis for a median time of 4 years (2, 15). Serum calcium (Ca) increased in ten patients (52.6%) after HCTZ use when compared to the baseline, returning to previous levels after the washout period. No statistical significant changes were found in alkaline phosphatase, phosphorus, and magnesium during the study protocol, as shown in Table 1. A total of six patients had previous parathyroidectomy, in which serum calcium did not increase. In order to analyze the role of PTH in HCTZ response, we divided patients in two groups: $PTH \geq 300$ and $PTH < 300$ pg/ml. Baseline 25 hydroxy Vitamin D levels were similar between these groups [43 (31, 56) vs. 47 (33, 59) ng/ml in patients with $PTH \geq 300$ and $PTH < 300$ pg/ml, respectively, $p = 0.646$]. Out of the 19 patients, ten patients had $PTH \geq 300$ pg/ml, and Ca increased in eight of them whereas in the other nine patients with $PTH < 300$ pg/ml, serum Ca has increased in two patients (RR risk of increase Ca 3.9; $p = 0.012$). As shown in Fig. 1a, when PTH is < 300 pg/ml, there was no difference in serum Ca among study phases ($p = 0.652$). However, as shown in Fig. 1b, when PTH is ≥ 300 pg/ml, serum Ca increased at HCTZ phase and returned to baseline levels in the washout phase ($p = 0.010$).

Discussion

We have demonstrated that HCTZ was capable of increasing serum Ca in a sample of anuric patients on hemodialysis,

showing the extra renal effect of this diuretic. Furthermore, it seems that the effect of HCTZ on serum Ca is highly dependent on PTH levels.

A well-known thiazide effect on calcium metabolism is increasing calcium absorption in renal tubules, and this is accepted as the primordial mechanism to cause increase in serum Ca and consequent suppression of PTH, as demonstrated in patients without CKD. [7] The CRIC study has suggested that elevations in PTH in CKD patients were related to increased calciuria by loop diuretic use. Authors also showed that thiazide could attenuate this effect by the opposite mechanism. [8] However, we have shown that calciuria in CKD patients is low and decline similarly in both groups of diuretic use (HCTZ and furosemide), as the renal function decreases. Indeed, calcium excretion was not associated with increased risk of secondary hyperparathyroidism. [4] Corroborating this mechanism, it has been demonstrated that thiazides significantly decrease calciuria, with no effect on serum calcium and PTH. [9]

A previous study has suggested that thiazides require the presence of PTH as a permissive condition for its renal action [10]. In the current study, we have found an augment in Ca after HCTZ use only in patients with high $PTH > 300$ pg/ml, suggesting a similar mechanism, yet of unknown meaning. Although our study design could not assess the source of calcium, whether it came from the bone or bowel, or even if its effect would last longer, we alert the scientific community on the necessity of prospective studies to elucidate thiazide extra renal effect mechanism and to better understand the impact on bone disorders. Since HCTZ is a relatively low price drug and might be used for prevention of secondary hyperparathyroidism in CKD patients, further studies are welcome.

We are aware of several limitations of the current study: the small sample size, which increases a type I error and our PTH assay detected both intact PTH and some inactive fragments; there is no control group. This limitation was partially overcome by measuring the same subject in three different situations, and also because of a washout period, we have no data on 1.25 dihydroxy vitamin D, FGF23, and bone alkaline phosphatase that would certainly help explaining our results.

Acknowledgments The following contributed to this work: research idea and study design: R.F.V.V., R.M.A.M., and R.M.E.; data acquisition: R.F.V.V. and E.T.R.; data analysis/interpretation: R.F.V.V., R.M.A.M., and R.M.E.; statistical analysis: R.M.E.; supervision or mentorship: R.M.A.M. and R.M.E. Each author contributed important intellectual content during manuscript drafting or revision and accepts accountability for the overall work by ensuring that questions pertaining to the accuracy or integrity of any portion of the work are appropriately investigated and resolved. R.M.E. takes responsibility that this study has been reported honestly, accurately, and transparently, that no important aspects of the study have

been omitted, and that any discrepancies from the study as planned have been explained.

Compliance with ethical standards

Ethical approval All procedures performed in this study involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Conflicts of interest None.

Financial support Rosa M.A.Moyses is supported by CNPQ, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grant number 304249/2013–0). This financial support had no role in study design, collection, analysis and interpretation of data, writing the report, and the decision to submit the report for publication.

References

- Griebeler ML, Kearns AE, Ryu E, Thapa P, Hathcock MA, Melton LJ 3rd, Wermers RA (2016) Thiazide-associated hypercalcemia: incidence and association with primary hyperparathyroidism over two decades. *J Clin Endocrinol Metab* 101(3):1166–1173. doi:[10.1210/jc.2015-3964](https://doi.org/10.1210/jc.2015-3964)
- Blaine J, Chonchol M, Levi M (2014) Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol*. doi:[10.2215/CJN.09750913](https://doi.org/10.2215/CJN.09750913)
- Rejnmark L, Vestergaard P, Pedersen AR, Heickendorff L, Andreasen F, Mosekilde L (2003) Dose-effect relations of loop- and thiazide-diuretics on calcium homeostasis: a randomized, double-blinded Latin-square multiple cross-over study in postmenopausal osteopenic women. *Eur J Clin Invest* 33(1):41–50
- Vasco RF, Moyses RM, Zatz R, Elias RM (2016) Furosemide increases the risk of hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 43(6):421–430. doi:[10.1159/000446449](https://doi.org/10.1159/000446449)
- Parfitt AM (1972) The interactions of thiazide diuretics with parathyroid hormone and vitamin D. Studies in patients with hypoparathyroidism. *J Clin Invest* 51(7):1879–1888. doi:[10.1172/JCI106990](https://doi.org/10.1172/JCI106990)
- Koppel MH, Massry SG, Shinaberger JH, Hartenbower DL, Coburn JW (1970) Thiazide-induced rise in serum calcium and magnesium in patients on maintenance hemodialysis. *Ann Intern Med* 72(6):895–901
- Zaheer S, de Boer I, Allison M, Brown JM, Psaty BM, Robinson-Cohen C, Ix JH, Kestenbaum B, Siscovick D, Vaidya A (2016) Parathyroid hormone and the use of diuretics and Calcium-Channel blockers: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *J Bone Miner Res* 31(6):1137–1145. doi:[10.1002/jbmr.2779](https://doi.org/10.1002/jbmr.2779)
- Isakova T, Anderson CA, Leonard MB, Xie D, Gutierrez OM, Rosen LK, Theurer J, Bellovich K, Steigerwalt SP, Tang I, Anderson AH, Townsend RR, He J, Feldman HI, Wolf M, Chronic Renal Insufficiency Cohort Study G (2011) Diuretics, calciuria and secondary hyperparathyroidism in the chronic renal insufficiency cohort. *Nephrol Dial Transplant* 26(4):1258–1265. doi:[10.1093/ndt/gfr026](https://doi.org/10.1093/ndt/gfr026)
- Riss P, Kammer M, Selberherr A, Bichler C, Kaderli R, Scheuba C, Niederle B (2016) The influence of thiazide intake on calcium and parathyroid hormone levels in patients with primary hyperparathyroidism. *Clin Endocrinol* 85(2):196–201. doi:[10.1111/cen.13046](https://doi.org/10.1111/cen.13046)
- Marcus R, Omer F, Arvesen G, Lundquist C (1978) Thiazide diuretics do not potentiate cAMP response to parathyroid hormone. *Metabolism* 27(6):701–710