

**EDUARDO JORGE DUQUE DE SÁ CARNEIRO FILHO**

**O hiperparatireoidismo secundário grave altera a expressão  
gênica e proteica do tecido muscular:  
o papel da paratireoidectomia sobre a miopatia urêmica**

(Versão corrigida . Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo  
2023**

**EDUARDO JORGE DUQUE DE SÁ CARNEIRO FILHO**

**O hiperparatireoidismo secundário grave altera a expressão  
gênica e proteica do tecido muscular:  
o papel da paratireoidectomia sobre a miopatia urêmica**

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

Programa de Nefrologia

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Rosa Maria Affonso Moysés

(Versão corrigida . Resolução CoPGr 6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo  
2023**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Carneiro Filho, Eduardo Jorge Duque de Sá  
O hiperparatireoidismo secundário grave altera a  
expressão gênica e proteica do tecido muscular : o  
papel da paratireoidectomia sobre a miopatia  
urêmica / Eduardo Jorge Duque de Sá Carneiro Filho.  
-- São Paulo, 2023.  
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Nefrologia.  
Orientadora: Rosa Maria Affonso Moysés.

Descritores: 1.Hiperparatireoidismo secundário  
2.Músculos 3.Hormônio paratireóideo  
4.Paratireoidectomia 5.Osteopontina 6.Inflamação

USP/FM/DBD-226/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

à minha filha, **Clara**, pelo sorriso que ilumina a minha vida, por restabelecer as minhas prioridades e por me fazer querer ser uma pessoa melhor a cada dia

à minha esposa, **Guilhermanda**, por seu amor e companheirismo em todas as horas, pela paciência e todo o tempo disponibilizado para realização deste trabalho

aos meus pais, **Nair e Eduardo**, que me asseguraram todas as condições para que eu tivesse a melhor formação, por me estimularem a buscar os meus sonhos com determinação, ética e respeito pelo próximo

# Agradecimentos

---

---

À minha orientadora, **Dra Rosa Maria Affonso Moysés**, pela confiança depositada em mim, por ter me guiado com tanta paciência, por abrir portas para que eu desenvolvesse este trabalho. Agradeço por ter tido a melhor experiência possível durante a pós-graduação. Sinto-me honrado pela oportunidade de ser seu aluno.

À **Dra Vanda Jorgetti**, por ser fonte de inspiração para tantas gerações, exemplo de humanidade, dedicação aos pacientes e de amor à ciência.

À **equipe do LIM-16**, em especial à **Ivone** e à **Cléo**, pela assistência na realização da imuno-histoquímica; à **Luzia**, pela análise da expressão gênica; à **Luciene**, pelas discussões sobre fisiopatologia; ao **Wagner**, pela sua disponibilidade e seu jeito particular de me apoiar; à **Solange**, à **Meire** e à **Cláudia**, pelo apoio sempre que precisei.

À **Dra Rosilene Elias**, pelos ensinamentos, e por ser um exemplo de dedicação à pesquisa.

À **equipe do Lacre** e à colega de pós-graduação, **Shirley Crispilho**, pela ajuda com a realização dos testes de performance e exames de calorimetria.

À **Disciplina de Reumatologia do HCFMUSP**, em especial ao **Dr Samuel Shinjo**, pela disponibilidade para realização das biópsias de músculo, à **Dra Rosa Maria Pereira** (*in memoriam*) e à **Lilium Takayama**, pela oportunidade de realizar os exames de densitometria no LIM 17.

À equipe do **Hospital-dia do HCFMUSP**, por ceder espaço para realização das biópsias de músculo.

Ao Programa de pós-graduação da **Disciplina de Nefrologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, pelo suporte acadêmico.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), pelo suporte financeiro de auxílio à pesquisa.

A todos os **professores** que tive durante minha trajetória, por me mostrarem como o ensino é transformador e por me inspirarem a seguir na carreira acadêmica.

Ao meu irmão, **Bruno**, pela amizade e por ser exemplo de motivação na busca dos seus objetivos.

Aos meus **familiares**, avós, tios, primos, por estarem sempre torcendo pelas minhas conquistas. À minha avó **Aline** (*in memoriam*), que me enxergou médico e acreditou que esse momento seria possível quando eu ainda era criança.

Por fim, agradeço aos **pacientes** que foram voluntários desta pesquisa, pelo altruísmo e pela disponibilidade para realização dos protocolos do estudo.

*E uma das condições necessárias a pensar certo é não  
estarmos demasiado certos de nossas certezas*

**- Paulo Freire**

*Abandonar algo pela metade é fracassar totalmente*

- Desconhecido. Sorte tirada em meados de 2014

*O sonho é o que leva a gente para frente*

**- Ariano Suassuna**

### **Normalização adotada**

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

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

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

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



# Sumário

---

---

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

*Abstract*

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
1.1 Distúrbio mineral e ósseo da doença renal crônica: Hiperparatireoidismo secundário.....	05
1.2 Sarcopenia: vias de síntese e degradação de proteínas no tecido muscular .....	09
1.3 Interação bioquímica entre Osso e Músculo .....	14
1.4 Impacto da DRC sobre o tecido muscular.....	16
1.5 Impacto do PTH sobre o tecido muscular .....	18
1.6 Justificativa do estudo .....	19
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
2.1 Primário .....	21
2.2 Secundários .....	21
<b>3. MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
3.1 Critérios de Inclusão .....	23
3.2 Critérios de não-elegibilidade.....	23
3.3 Protocolo do estudo .....	24
3.4 Exames Bioquímicos .....	24
3.5 Avaliação funcional.....	25
3.5.1 Questionário SARC-F .....	27
3.5.2 Acelerômetro .....	27
3.5.3 Força de preensão (Handgrip strength) .....	28
3.5.4 Teste sit-to-stand-to-sit (STS) .....	28
3.5.5 Teste Timed Up and Go (TUG) .....	29
3.6 Avaliação da composição corporal.....	29
3.7 Avaliação de gasto energético de repouso.....	30
3.8 Biópsia muscular .....	31
3.8.1 Técnica de imuno-histoquímica .....	32
3.8.2 Técnica de quantificação de conteúdo proteico - Multiplex .....	35
3.8.3 Expressão gênica .....	37
3.9 Cálculo do tamanho da amostra .....	40
3.10 Análise estatística .....	40
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
4.1 Características clínicas e laboratoriais basais dos pacientes e após 6 meses .....	43
4.2 Avaliação funcional.....	48
4.3 Composição corporal basal a após 6 meses da PTX .....	49
4.4 Avaliação Histológica basal e após 6 meses da PTX.....	52
4.4.1 Expressão gênica .....	52
4.4.2 Imuno-histoquímica.....	54
4.4.3 Conteúdo proteico por multiplex.....	57

<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>63</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>77</b>
<b>7. ANEXOS</b> .....	<b>79</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>88</b>
<b>9. APÊNDICES</b> .....	<b>99</b>

# Listas

---

---

## ABREVIATURAS

Akt/PKB	proteína quinase B
Alb	albumina
Ca	cálcio
CaSR	receptor sensível a cálcio
Cr	creatinina
CTX	telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo 1 (do inglês, <i>C-terminal telopeptides of type I collagen</i> )
DKK1	dickkopf Related Protein 1
DMO	densidade mineral óssea
DMO-DRC	distúrbio mineral ósseo da doença renal crônica
DRC	doença renal crônica
DXA	densitometria óssea
ELISA	enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FA	fosfatase alcalina
FGF	fator de crescimento dos fibroblastos
FNDC5	fibronectina tipo III contendo o domínio 5
FoxO	fatores de transcrição “Forkhead” da família da FoxO
Fz	Frizzled
GEB	gasto energético basal
GER	gasto energético de repouso
GH	hormônio do crescimento (do inglês, <i>growth hormone</i> )
GM-CSF	fator estimulador de colônia de macrófago
HAS	hipertensão arterial sistêmica
Hb	hemoglobina
HPTS	hiperparatireoidismo secundário
IFN $\gamma$	interferon gama
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (do inglês, <i>Insulin-like growth factor 1</i> )
IIQ	Intervalo interquartil
IL-6	interleucina- 6
IL1 $\beta$	interleucina 1-beta
LPR5/6	proteína 5 ou 6 relacionada ao receptor de lipoproteína (do inglês, <i>low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6</i> )
MAF-bx	<i>Muscle Atrophy F-box</i>
MuRF-1	<i>Muscle Ring Finger-1</i>
OPG	osteoprotegerina

P	fósforo
PCR	proteína C reativa
PI3K	fosfatidilinositol-3-quinase
PTH	paratormônio
PTH-rp	paratormônio proteína-relacionada
PTHr1	receptor do paratormônio tipo 1
PTX	paratireoidectomia
P1NP	propeptídeo procolágeno tipo 1
RANK	receptor ativador do fator nuclear Kappa B
RANKL	ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B
SOST	esclerostina
STS	<i>sit-to-stand-to-sit</i>
SUP	sistema ubiquitina-proteassomo
TFG	taxa de filtração glomerular
TGF-β	fator de transformação do crescimento beta
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
TUG	<i>timed-up-and-go</i>
Ur	Ureia
VDR	receptor de vitamina D
VR	valor de referência
1,25 OH <sub>2</sub> VitD	1,25 dihidroxi-vitamina D
25OHD	25 hidroxi-vitamina D

## TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Pontos de corte para avaliação de sarcopenia (critérios EWGSOP2) .....	26
<b>Tabela 2</b> - Pontos de corte para avaliação de índice de massa muscular apendicular.....	26
<b>Tabela 3</b> - Lista de anticorpos utilizados nas técnicas de imuno-histoquímica e suas respectivas diluições. ....	34
<b>Tabela 4</b> - Nome dos genes, sequência dos primers e tamanho dos amplicons.....	39
<b>Tabela 5</b> - Dados clínicos e laboratoriais basais e 6 meses após PTX .....	43
<b>Tabela 6</b> - Dados laboratoriais relacionados ao metabolismo ósseo - <i>baseline</i> e 6 meses após PTX .....	44
<b>Tabela 7</b> - Dados laboratoriais relacionados ao metabolismo muscular e inflamação - <i>baseline</i> e 6 meses após PTX .....	47
<b>Tabela 8</b> - Avaliação funcional e metabólica antes e após PTX .....	48
<b>Tabela 9</b> - Parâmetros relacionados à composição corporal e densidade mineral óssea avaliados por DXA antes e após a paratireoidectomia .....	49
<b>Tabela 10</b> - Resultados de expressão gênica do grupo pré-PTX comparado com o grupo controle.....	53
<b>Tabela 11</b> - Comparação dos resultados de expressão gênica dos grupos pré e pós-PTX.....	54
<b>Tabela 12</b> - Expressão proteica muscular através de imunohistoquímica nos grupos controle, pré e pós-PTX .....	55
<b>Tabela 13</b> - Concentração proteica muscular através de multiplex nos grupos controle, pré e pós-PTX .....	58

## FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática da via de sinalização Wnt .....	04
<b>Figura 2</b> - Mecanismos patogênicos da progressão do hiperparatireoidismo secundário.....	06
<b>Figura 3</b> - Esquema de mecanismos que controlam a via PI3-quinase/Akt. ....	11
<b>Figura 4</b> - Sistema ubiquitina proteossoma dependente de ATP .....	13
<b>Figura 5</b> - Algoritmo avaliação de sarcopenia EWGSOP2 .....	25
<b>Figura 6</b> - Sequência para realização de biópsia muscular .....	32
<b>Figura 7</b> - Fluxograma do estudo .....	42
<b>Figura 8</b> - Parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo ósseo – baseline e 6 meses após PTX .....	45
<b>Figura 9</b> - Avaliação laboratorial de marcadores de distúrbio mineral ósseo e albumina antes e após PTX .....	46
<b>Figura 10</b> - Avaliação laboratorial dos níveis circulantes de marcadores de inflamação antes e após PTX .....	47
<b>Figura 11</b> - Avaliação da parâmetros da composição corporal e densidade mineral óssea avaliada por DXA antes e após PTX .....	50
<b>Figura 12</b> - Variação da densidade mineral óssea avaliada por DXA de coluna lombar, quadril e colo do fêmur de acordo com tipo de PTX .....	51
<b>Figura 13</b> - Correlações entre a variação de parâmetros avaliados pela DXA e variação dos níveis de PTH 6 meses após a PTX. ....	52
<b>Figura 14</b> - Comparação dos resultados de expressão gênica no baseline e após PTX em relação ao grupo controle .....	54
<b>Figura 15</b> - Avaliação da expressão de proteínas no tecido muscular pela técnica de imunohistoquímica nos grupos controle, pré e pós PTX .....	55
<b>Figura 16</b> - Padrão da expressão proteica do VDR, TGF- $\beta$ e miostatina pela imunohistoquímica em biópsia de músculo nos grupos controle, pré e pós PTX .....	56
<b>Figura 17</b> - Padrão da expressão proteica da osteopontina pela imuno-histoquímica em biópsia de músculo nos grupos controle, pré e pós PTX .....	57
<b>Figura 18</b> . Padrão da expressão proteica da artrogina pela imuno-histoquímica em biópsia de músculo nos grupos controle, pré e pós PTX .....	57
<b>Figura 19</b> - Avaliação da conteúdo proteico no tecido muscular avaliado pela técnica de multiplex nos grupos controle, pré e pós PTX .....	59
<b>Figura 20</b> - Avaliação da conteúdo proteico no tecido muscular avaliado pela técnica de	

multiplex nos grupos controle, pré e pós PTX .....	60
<b>Figura 21</b> - Avaliação da conteúdo proteico no tecido muscular avaliado pela técnica de multiplex nos grupos controle, pré e pós PTX .....	61
<b>Figura 22</b> - Correlações entre a variação dos níveis da concentração muscular de irisina e dos parâmetros de massa óssea avaliados pela DXA 6 meses após a PTX.....	62
<b>Figura 23</b> - Mecanismos propostos para a ação do hiperparatireoidismo secundário e da PTX sobre tecido muscular.....	76

# Resumo

---

---

Carneiro Filho EJDS. O hiperparatireoidismo secundário grave altera a expressão gênica e proteica do tecido muscular: o papel da paratireoidectomia sobre a miopatia urêmica [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

O Hiperparatireoidismo secundário (HPTS) grave está associado a aumento de morbidade e mortalidade de pacientes com doença renal crônica (DRC). O impacto negativo desta condição sobre o esqueleto resulta em aumento de risco de fraturas devido a alteração em remodelação óssea e perda de osso cortical. Embora a perda de força muscular seja comumente relacionada a esta patologia, o efeito do HPTS sobre a expressão gênica e proteica em tecido muscular é desconhecido. Avaliamos o fenótipo muscular através de análise funcional, gasto energético, composição corporal e biópsia muscular de pacientes com HPTS grave, assim como as mudanças ocorridas após 6 meses da paratireoidectomia (PTX). Examinamos a relação de componentes do distúrbio mineral e ósseo da DRC, proteínas relacionadas à remodelação óssea, dosagem de miocinas e citocinas inflamatórias com alterações na densidade mineral óssea e histologia do tecido muscular. Foram incluídos 30 pacientes com uma média de idade de  $39 \pm 12$  anos, predomínio de sexo feminino (60%), com tempo médio em diálise de 66 meses. No início, os pacientes apresentavam concentrações reduzidas de irisina e Akt no tecido muscular, além de aumento das concentrações de fator de transformação do crescimento-beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento dos fibroblastos (FGF)-21, osteopontina, osteocalcina e ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B (RANKL) em relação a indivíduos saudáveis. Após 6 meses da PTX, houve melhora de performance e força muscular, sem mudança na massa muscular ou no gasto energético de repouso. Houve ganho de massa óssea, que ocorreu de forma mais significativa em pacientes submetidos à PTX total em relação à subtotal. Em relação à análise tecidual, houve redução nas concentrações teciduais de osteopontina, esclerostina, RANKL, osteocalcina e TGF- $\beta$  no pós-PTX, além de um aumento significativo de irisina e de Akt. A redução dos níveis de paratormônio (PTH) se correlacionou com ganho de massa óssea e aumento na expressão de irisina muscular. Também observamos uma redução na concentração de citocinas inflamatórias no tecido muscular após PTX. Nossos achados sugerem que o HPTS exerce um papel na disfunção muscular causada pela DRC e que a PTX tem efeito benéfico sobre miopatia urêmica. Dentre nossas hipóteses, esse efeito sobre tecido muscular pode ser direto através do PTH e/ou indireto através de inflamação e alteração da remodelação óssea.

Palavras-chave: Hiperparatireoidismo secundário. Músculos. Hormônio paratireóideo. Paratireoidectomia. Osteopontina. Inflamação.



# Abstract

---

---

Carneiro Filho EJDS. Severe secondary hyperparathyroidism affects muscle gene and protein expression: The role of parathyroidectomy on uremic myopathy [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2023.

Secondary hyperparathyroidism (SHPT) is a serious condition and leads to increased morbidity and mortality in patients with chronic kidney disease (CKD). The negative impact of this condition on the skeleton results in higher risk of fractures due to changes in turnover and loss of cortical bone. Muscle dysfunction is commonly related to this pathology, but the impact of SHPT on muscle gene and protein expression is unknown. We evaluated the muscle phenotype through strength and performance analysis, energy expenditure, body composition, and muscle biopsies of patients with severe SHPT at baseline and 6 months after parathyroidectomy (PTX). We examined the relationship of CKD-mineral and bone disorder parameters, proteins related to bone remodeling, myokines, and inflammatory cytokines with changes in bone mineral density and muscle tissue histology. We enrolled 30 patients with  $39 \pm 12$  years, most of them were females, with dialysis vintage around 66 months. At baseline, patients had reduced concentrations of muscle irisin and Akt, and increased concentrations of transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ), fibroblast growth factor (FGF)-21, osteopontin, osteocalcin and receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) compared to muscle analysis from healthy patients. After 6 months of PTX, despite no changes to muscle mass or energy expenditure, there was an improvement in performance and muscle strength, as well as in bone mass, which occurred more prominently in patients undergoing total PTX compared to subtotal PTX. Regarding tissue analysis, there was a reduction in tissue concentrations of osteopontin, sclerostin, RANKL, osteocalcin and TGF $\beta$  after PTX, and a significant increase in muscle concentration of irisin and Akt. The reduction in parathyroid hormone (PTH) levels correlated with bone mass gain and increased muscle irisin. We also observed a reduction of inflammatory cytokines in muscle tissue after PTX. Our findings suggest that SHPT plays a role in CKD-induced muscle dysfunction and that PTX has a beneficial effect on uremic myopathy. We hypothesized that this effect on muscle tissue may be direct through PTH and/or indirect through inflammation and changes in bone remodeling.

Keywords: Secondary hyperparathyroidism. Muscles. Parathyroid hormone. Parathyroidectomy. Osteopontin. Inflammation.

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

O paratormônio (PTH) é um hormônio sintetizado inicialmente como um peptídeo pré-pró- paratireoideo de cadeia simples, que gera uma proteína com 84 aminoácidos, armazenada e secretada pelas glândulas paratireoides. Tem uma meia-vida de 5 a 10 minutos e é degradado pelo fígado e pelos rins. As células da paratireoide regulam a secreção de PTH através de um receptor acoplado à proteína-G, também conhecido como receptor sensível a cálcio (CaSR) (1). Em resposta ao aumento da concentração de cálcio extracelular, a ligação deste íon ao CaSR ativa vias de sinalização através da indução de fosfolipases e do aumento do cálcio intracelular, o que gera a supressão de secreção do PTH. Além da diminuição de secreção, o CaSR também atua aumentando a degradação intracelular e diminuindo a síntese de PTH.

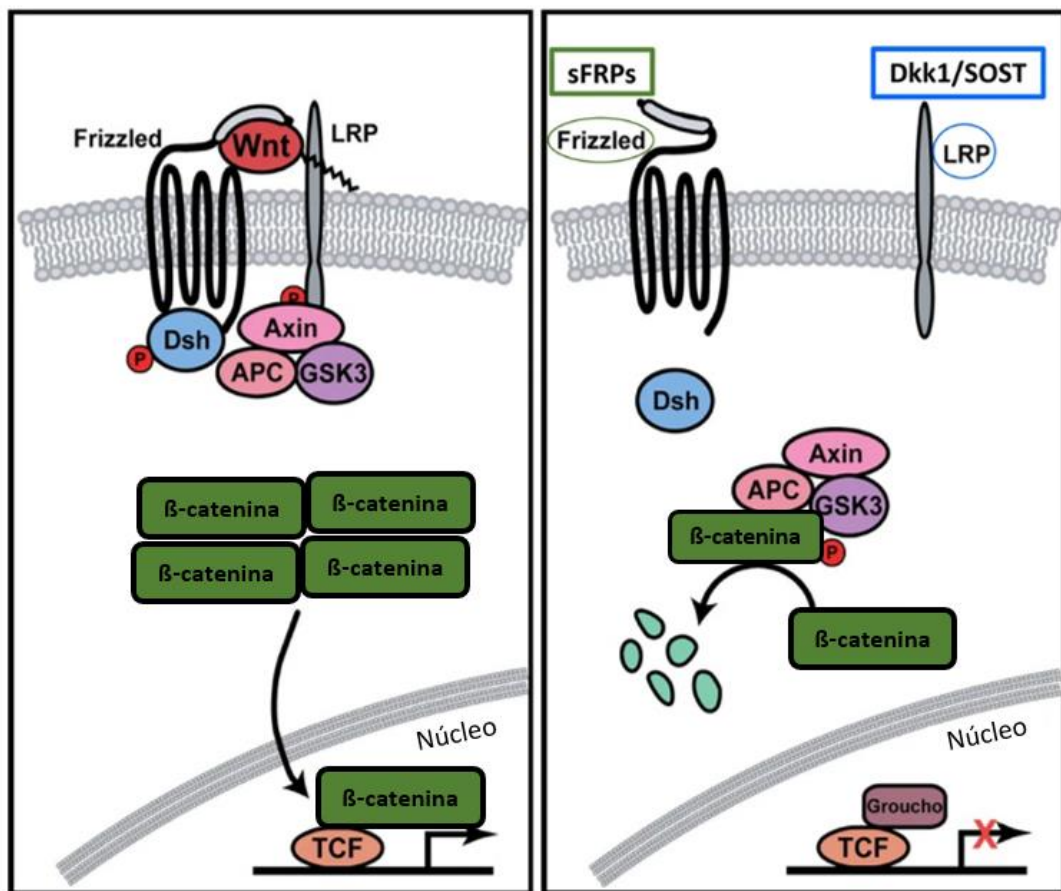
As ações do PTH são mediadas pelo receptor PTH/PTH-rp tipo 1 (PTHr1), igualmente ativado pelas porções aminoterminais do PTH e PTH-rp (proteína relacionada ao PTH). Este receptor é mais abundante nos ossos e nos rins; no entanto, também é expresso em níveis mais baixos em outras células do corpo (2). Apesar de ser 51% homólogo ao PTHR1, o receptor de PTH tipo 2 é ativado pelo PTH e tem menor afinidade pelo PTH-rp. É expresso particularmente no cérebro e no pâncreas, e a sua função ainda é desconhecida (3). Além destes dois subtipos de receptores de PTH, o subtipo 3 também já foi descrito, com ação estabelecida principalmente em espécies não-mamíferas (4).

Nos rins, o PTH atua nas células tubulares proximais para inibir a reabsorção de fósforo e estimular a atividade da  $1\alpha$ -hidroxilase, enzima que regula metabolismo da vitamina D, responsável pela conversão da 25-OH vitamina D (25OHD) em 1-25(OH)vitamina D (1,25 OH<sub>2</sub>VitD) ou calcitriol. Também aumenta a absorção de cálcio através da inserção de canais de cálcio na membrana apical dos túbulos distais e estimula a atividade de transportadores de sódio-cálcio basolaterais. Sobre o intestino, o PTH exerce influência indireta, promovendo

absorção de cálcio através da ação da 1,25 OH<sub>2</sub>VitD produzida pelos rins (5) .

No tecido ósseo, o PTH age diretamente nas células da linhagem dos osteoblastos, contribuindo para liberação de citocinas, como o fator estimulador de colônias de macrófagos (GM-CSF) e o ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B (RANKL), os quais estimulam formação de osteoclastos maduros. O PTH também inibe a produção de osteoprotegerina (OPG), proteína que atrai RANKL e impede a ativação dos osteoclastos (6).

A exposição intermitente ao PTH é osteoanabólica, causa ativação da sinalização Wnt e aumenta a sobrevivência de osteoblastos e osteócitos, células responsáveis pela formação óssea. A via Wnt engloba moléculas de sinalização que participam de diversos processos fisiológicos e que regulam interações celulares durante a embriogênese, dentre eles a diferenciação e maturação osteoblástica. Inicialmente, a proteína Wnt liga-se ao complexo formado pelo receptor *Frizzled* da família da proteína G e pelo correceptor LPR 5/6. Esses receptores liberam a  $\beta$ -catenina no citoplasma celular e, em seguida, ocorre sua entrada no núcleo, onde promove a transcrição gênica de proteínas relacionadas à diferenciação osteoblástica (figura 1). Um dos reguladores inibitórios da sinalização Wnt é a esclerostina, um produto do gene SOST, expresso por osteócitos (7)(8). Sabe-se que, dentre outros fatores ainda desconhecidos, sobrecarga mecânica e PTH inibem a esclerostina, enquanto citocinas (9), como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), a estimulam. Como o PTH inibe a esclerostina, atua sobre aumento de formação óssea (10).



**Figura 1.** Representação esquemática da via de sinalização Wnt. Adaptada da referência (11). A proteína Wnt liga-se ao complexo formado pelo receptor *Frizzled* e coreceptor LPR 5/6, liberando entrada da  $\beta$ -catenina no núcleo celular. A repressão da via Wnt através de seus inibidores (esclerostina e dickkopf related protein 1, DKK1) envolve a fosforilação da beta-catenina, o que a torna inativa.

Enquanto elevações intermitentes de PTH atuam estimulando predominantemente osteoblastos, a elevação persistente de PTH aumenta principalmente a atividade de osteoclastos. Portanto, a exposição intermitente ao PTH gera ganho de massa óssea, enquanto a exposição contínua causa perda da massa óssea (12).

### **1.1 Distúrbio mineral e ósseo da doença renal crônica: Hiperparatireoidismo Secundário**

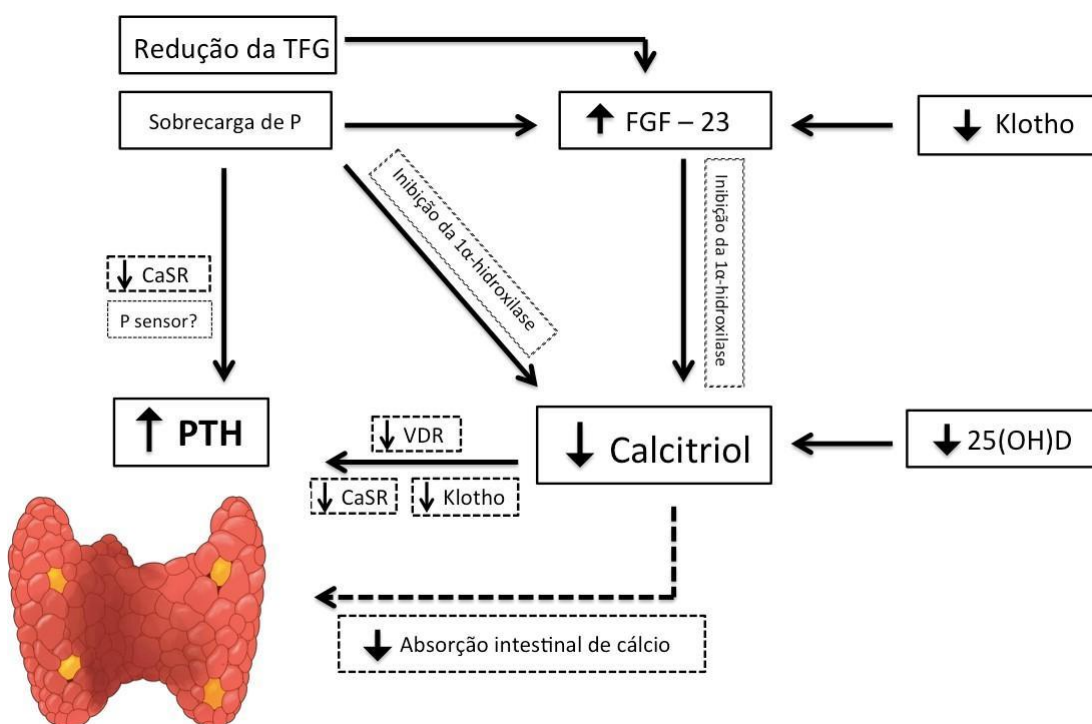
Na doença renal crônica (DRC), a perda de taxa de filtração glomerular está relacionada a um conjunto de alterações progressivas envolvendo o PTH, 1,25 OH<sub>2</sub>VitD, metabolismo do cálcio e fósforo, além do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23), proteína produzida pelos osteócitos, responsável pela regulação da fosfatúria e inibição da 1 $\alpha$ -hidroxilase. Distúrbios do metabolismo mineral e ósseo da DRC (DMO-DRC) são compostos por alterações laboratoriais, anormalidades na remodelação óssea, mineralização e volume ósseo, além da presença de calcificação extra-esquelética. A maior parte dos pacientes com DRC de longa data apresenta elevação dos níveis séricos de PTH, o que caracteriza o hiperparatireoidismo secundário à DRC (HPTS) (13).

Nos rins com função preservada, a enzima 1 $\alpha$ -hidroxilase converte a 25OHD em 1,25 OH<sub>2</sub>VitD, que promove a absorção intestinal de cálcio e fósforo, e inibe a transcrição de PTH. Portanto, a diminuição da produção de calcitriol na DRC, seja por déficit do substrato 25OHD, seja por diminuição da ação da 1 $\alpha$ -hidroxilase, favorece o aumento da síntese de PTH. Tal efeito ocorre tanto pela diminuição do cálcio sérico, como pelo menor efeito supressor do calcitriol sobre a paratireoide devido a uma menor expressão de receptor de vitamina D (VDR) nas glândulas (5).

O declínio da função renal está associado a aumento nos níveis de FGF-23, resultando em aumento da fosfatúria e deficiência de vitamina D ativada (14). Esse processo torna o balanço de fósforo no organismo complexo, adaptando-se de acordo com a progressão da DRC, conforme demonstrado em revisão anexada no apêndice A (15).

Além de redução na produção renal de calcitriol, a progressão da DRC também está associada à redução na expressão da proteína klotho, correceptor do FGF-23, que está presente principalmente nos rins e nas paratireoides. A diminuição da expressão renal de klotho leva a

um aumento compensatório do FGF-23 para manter os níveis séricos de fósforo dentro da faixa de referência. No entanto, em fases mais avançadas da DRC encontramos a coexistência de aumento dessa fosfatonina e altos níveis circulantes de fósforo, o que contribui para o desenvolvimento de calcificação vascular, conforme demonstrado em modelo experimental em camundongos (16). Além disso, níveis elevados de fósforo atuam sobre atividade de CaSR, contribuindo para aumento da secreção de PTH (17). À medida que a doença renal avança, também ocorre diminuição da expressão de klotho nas paratireoides. Uma vez que as glândulas paratireoides expressam receptores de FGF e klotho (18), um dos mecanismos que regulam a secreção de PTH envolve o FGF-23, reduzindo transcrição de PTH por vias dependentes e independentes de klotho (19). Assim, a perda de klotho renal e nas paratireoides, hiperfosfatemia, deficiência de vitamina D e aumento do FGF-23 (18) são mecanismos patogênicos da progressão do HPTS conforme ilustrado na figura 2.



**Figura 2.** Mecanismos patogênicos da progressão do hiperparatireoidismo secundário. TFG: taxa de filtração glomerular; P: fósforo; CaSR: receptor sensível a cálcio; PTH: paratormônio; VDR: receptor de vitamina D; 25OHD: 25-hidroxi-vitamina D; FGF: fator de crescimento dos fibroblastos. Adaptado da referência (20)

No tecido ósseo, a doença de alta remodelação induzida pelo excesso de PTH está associada à diminuição de densidade cortical e trabecular, aumentando o risco de fraturas (21). Há evidência de efeitos distintos sobre os compartimentos trabecular e cortical de acordo com diferentes níveis de PTH (22). O osso cortical contribui para a força mecânica do esqueleto, sendo o compartimento mais afetado pelo hiperparatireoidismo (23)(24), inclusive em avaliação com biópsias ósseas o excesso de PTH promoveu aumento da reabsorção periosteal e redução na espessura cortical em casos de hiperparatireoidismo primário (25).

Estudos sugerem que o fator de transformação do crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), proteína com papel sobre diferenciação celular, também age sobre remodelação óssea, regulando o recrutamento de osteoclastos e osteoblastos. Análise *in vitro* mostrou que o TGF- $\beta$  aumenta a síntese de proteínas pelas células osteoblásticas (26), e que a injeção local de TGF- $\beta$  no perióstio estimula a formação óssea (27). Além disso, camundongos com *knockout* do receptor de TGF- $\beta$  desenvolvem uma diminuição no osso cortical e um aumento no compartimento trabecular (28).

Em estudo com animais urêmicos, houve correlação entre a expressão renal de FGF-23 e a expressão de TGF- $\beta$  (29). Em pacientes com osteodistrofia renal, os níveis de TGF- $\beta$  são significativamente mais altos do que aqueles sem essa condição (30), e uma expressão óssea mais alta desta proteína foi observada em pacientes com DRC avançada e remodelação óssea aumentada (31). De fato, Santos *et al.*(32) demonstraram uma expressão elevada de TGF- $\beta$  na medula óssea de pacientes com HPTS, que melhorou após a PTX. Há evidências de que PTH e TGF- $\beta$  atuam juntos para exercer suas atividades biológicas no osso (33).

Além dos efeitos bem descritos sobre tecido ósseo, o excesso de PTH circulante tem repercussões sobre diversos órgãos no contexto da DRC em estágio avançado, conforme detalhado em publicação mostrada no apêndice B (20). Estudos observacionais encontraram associações entre níveis altos de PTH e doença cardiovascular, como calcificação vascular (34)



e insuficiência cardíaca (35), conferindo uma percentagem de risco de morte superior à anemia ou à baixa dose de diálise (17,5% contra 11,3% e 5,1%, respectivamente) (36). O aumento persistente de PTH eleva a oferta endógena de cálcio e de fósforo, o que contribui para a calcificação, disfunção endotelial e hipertrofia miocárdica (37). Portanto, o PTH atua sobre a remodelação cardíaca, gerando alterações sobre a morfologia e a função deste órgão.

Além do efeito cardiovascular, o HPTS também tem impacto negativo sobre a função renal. Um estudo de coorte retrospectivo com 13.772 pacientes incidentes em hemodiálise revelou uma associação entre a redução da função renal residual e DMO- DRC, incluindo níveis elevados de PTH intacto e fosfatase alcalina, e baixos níveis de cálcio (38). De acordo com dados publicados em uma metanálise, existe uma associação independente entre os níveis séricos de fósforo, insuficiência renal e mortalidade entre pacientes com DRC que não necessitam de diálise (39). Também foi demonstrado que pacientes com diabetes, HPTS e DRC em fase pré-diálise requerem maior utilização de recursos de saúde e experimentam uma progressão mais rápida da doença renal quando comparados com diabéticos com DRC em fase pré-diálise, mas sem HPTS (40). Portanto, o HPTS, além de ter efeito sobre remodelação óssea e regulação dos níveis de cálcio sérico, também tem ação sobre remodelação cardíaca e progressão de DRC.

O arsenal terapêutico para o tratamento do HPTS inclui vitamina D, análogos de calcitriol, calcimiméticos e quelantes de fósforo. Quando o diagnóstico do HPTS é feito tardiamente, na presença de doença óssea grave, frequentemente acompanhado de calcificação vascular e deterioração da qualidade de vida, apenas o tratamento medicamentoso não é eficaz. Neste caso, os pacientes têm indicação de paratireoidectomia (PTX).

A PTX é o tratamento cirúrgico para os pacientes com HPTS severo, refratário ao tratamento clínico ou que apresentem hipercalcemia, dor óssea, doença óssea, calcificações metastáticas ou prurido intratável. Atualmente, as técnicas mais utilizadas são a PTX total com

autotransplante de pequenos fragmentos de tecido paratireoideo no tórax ou no antebraço, e a PTX subtotal, quando são retiradas 3 glândulas e 3/4 da menor glândula. Após a cirurgia de PTX, ocorre aumento de mineralização e redução de reabsorção óssea, levando à síndrome de “fome óssea”, caracterizada por hipocalcemia, hipofosfatemia e elevação da fosfatase alcalina. Durante este período, geralmente há necessidade de reposição de grandes quantidades de cálcio e calcitriol (41).

Estudos confirmam a melhora de sobrevida em pacientes com HPTS moderado ou grave quando submetidos à PTX, com melhora de sintomas como dores ósseas e incidência de fraturas (42), além de melhora na qualidade de vida (43). Com frequência, é perceptível o ganho ponderal, aumento de índice de massa corporal (IMC) e circunferência abdominal em pacientes renais crônicos após serem submetidos à PTX (44). Em relação ao desempenho muscular, já foi demonstrado um ganho significativo de força 12 meses após PTX em pacientes com diagnóstico de hiperparatireoidismo primário (45).

Caso não seja realizado tratamento adequado, níveis persistentemente elevados de PTH geram efeitos deletérios sobre os tecidos, mediados diretamente através expressão do seu receptor ou, indiretamente, através da remodelação óssea alterada. Por meio de mecanismos dependentes e independentes do cálcio, além da perda de massa óssea, a ação do PTH leva a manifestações da síndrome urêmica (46), como calcificação da pele e tecidos moles, cardiomiopatia, aumento do gasto energético e fraqueza muscular, um dos aspectos fundamentais para o diagnóstico da sarcopenia.

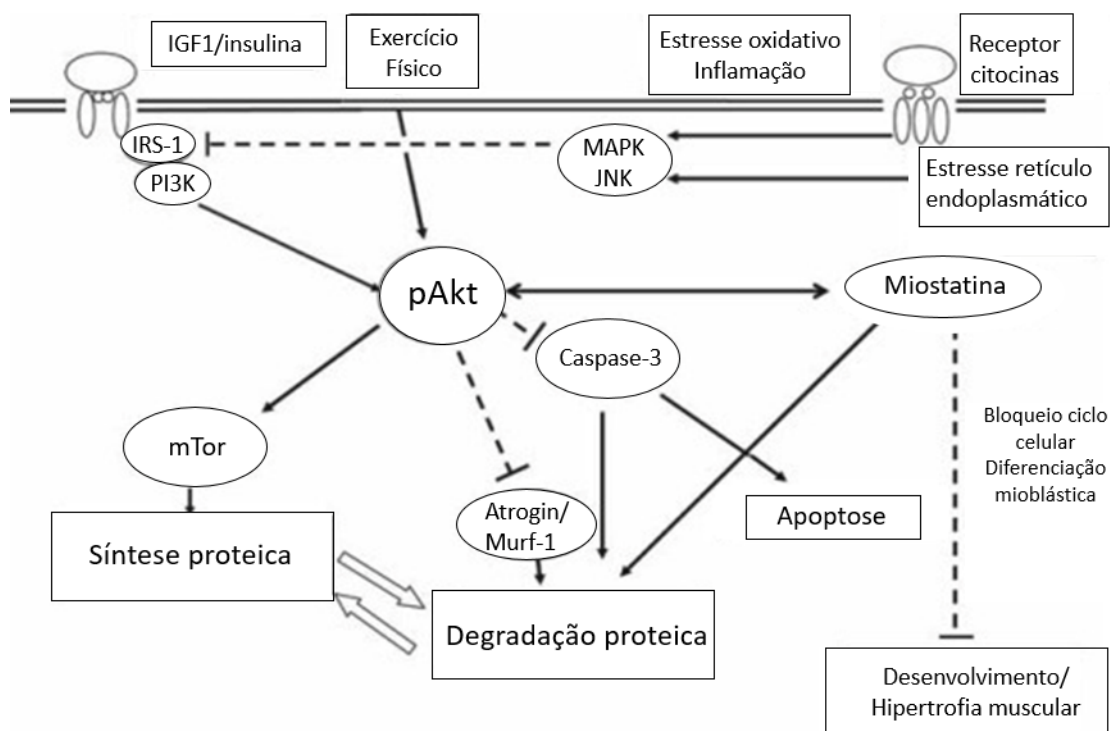
## **1.2. Sarcopenia: vias de síntese e degradação de proteínas no tecido muscular**

No passado, a sarcopenia era definida como a perda de massa muscular associada ao envelhecimento. Atualmente é considerada uma doença muscular, e sua definição inclui

aspectos qualitativos, como redução de força e performance muscular, além da redução da massa, podendo estar relacionada a condições sistêmicas associadas ou não ao envelhecimento (47).

O desequilíbrio entre síntese e degradação de proteínas miofibrilares é um dos pilares para desenvolvimento de sarcopenia. Redução da ingestão energético-proteica, sedentarismo e imobilidade prolongada são importantes desencadeantes de sarcopenia, bem como a redução de hormônios anabólicos (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 [IGF-1] e hormônio do crescimento [GH]) (48).

O GH regula a produção hepática de IGF-1, e esse eixo GH/IGF-1 é importante para a manutenção da homeostase óssea ao longo da vida. Indivíduos com deficiência de GH possuem níveis reduzidos de IGF-1 e menor massa óssea que os normais (49), e o declínio de IGF-1 sérico parece associado à redução de massa óssea no envelhecimento (50). Além do efeito em tecido ósseo, estes hormônios atuam como agentes anabólicos e anticatabólicos no músculo esquelético, promovendo ganho de massa muscular (51). Eles agem ligando-se aos seus respectivos receptores e desencadeiam a ativação de várias quinases, como a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), que ativa cascata de sinalização intracelular da Akt, também denominada de proteína quinase do tipo B (PKB). A Akt tem papel importante no controle de vias regulatórias de funcionamento celular, bem como em vias de sinalização intracelular que regulam a síntese proteica no tecido muscular, conforme demonstrado na figura 3. Terracciano *et al.* revelaram uma expressão reduzida dos níveis de Akt no tecido muscular de pacientes idosos com osteoporose e concluíram que a baixa densidade mineral óssea está associada a atrofia muscular nestes pacientes (52).

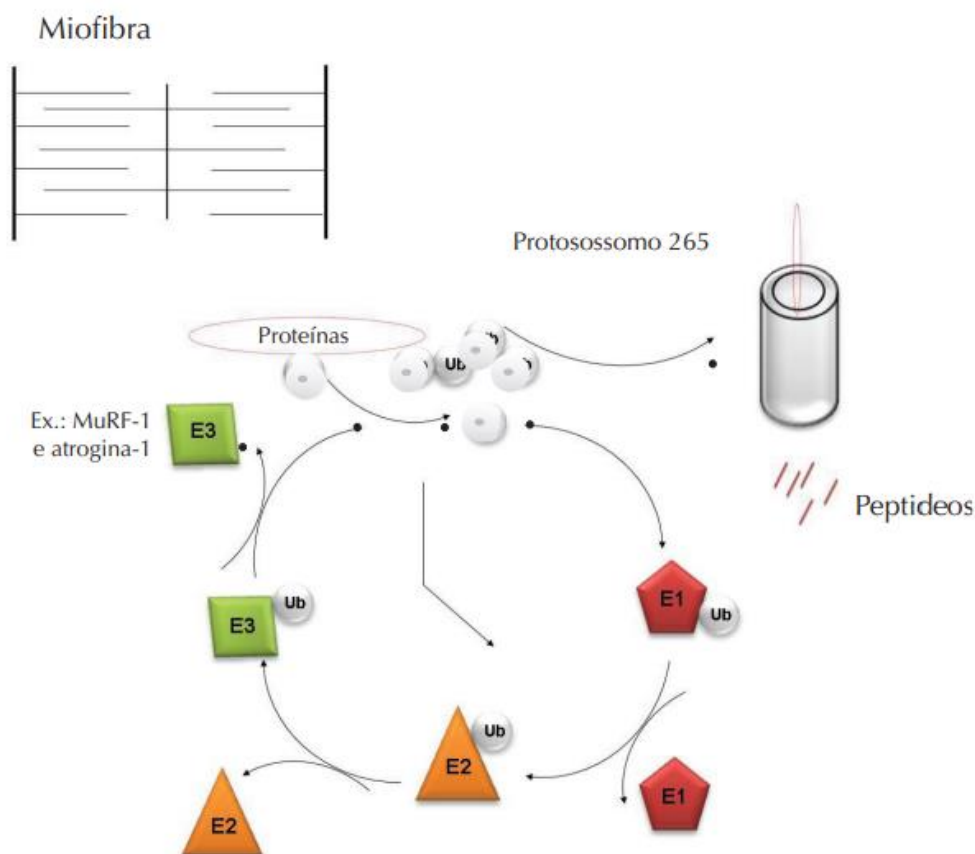


**Figura 3.** Esquema de mecanismos que controlam a via PI3-quinase/Akt. mTor: *mammalian Target of Rapamycin*; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina tipo1; IRS: receptor da insulina; PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase; JNK: c-Jun N-terminal quinase; MAPK: proteíno-quinases ativadas por mitógenos. Adaptado da referência (53)

Além de atuar sobre síntese, a Akt também age inibindo a degradação proteica através da fosforilação dos fatores de transcrição da família FoxO (*Forkhead box O*). Esse fatores integram uma subfamília de um grupo de fatores de transcrição *forkhead*, com papel importante para a homeostase celular. Em seres humanos, existem os subtipos FoxO1, FoxO3, FoxO4 e FoxO6, todos presentes no tecido muscular esquelético (54). Em relação ao trofismo muscular, os FoxO1 e FoxO3 são reguladores da degradação proteica através da apoptose de fibras musculares estriadas, uma vez que atuam sobre vias proteolíticas, como a via ubiquitina-proteassoma e a autofágica-lisossomal (55). A Akt estimula a síntese proteica através da ativação da proteína alvo da rapamicina em mamíferos ou *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR), entre outras moléculas sinalizadoras (56). Por outro lado, a Akt promove inibição de atividade da FoxO, e a inativação da Akt causa desfosforilação de FoxO, que, ao ser translocado para o núcleo, pode exercer a sua atividade transcricional e ativar genes constituintes do sistema

proteolítico dirigido pelo proteassoma.

As duas principais vias proteolíticas dentro do músculo esquelético, o sistema ubiquitina-proteassoma (SUP) e sistema autofágico-lisossomal, são responsáveis pela degradação da maioria das proteínas e organelas. A maioria dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de sarcopenia estimula a via do SUP dependente de ATP (57), ilustrada na figura 4, que tem como funções básicas a ubiquitinação de substratos proteicos destinados à proteólise. Proteínas destinadas à degradação devem estar marcadas com uma ligação covalente de múltiplos monômeros de ubiquitina, peptídeos compostos de 76 aminoácidos. A ubiquitinação é produto de reações químicas que requerem ação de três enzimas: a enzima ativadora de ubiquitina (E1), a enzima conjugadora de ubiquitina (E2) e a enzima ubiquitina-ligase (E3), também conhecida como E3-ligase. As enzimas do tipo E3 conferem especificidade à proteína-alvo para degradação. No músculo esquelético, foram identificadas duas E3 específicas que estão relacionadas ao processo de atrofia: a atrogina-1 (*Muscle Atrophy F-box* ou MAF-bx) e a MuRF-1 (*Muscle Ring Finger-1*). Alguns estudos descreveram o aumento da expressão de subunidades do proteossomo e de enzimas ubiquitinantes durante a atrofia muscular, bem como o aumento da expressão de E3 ligases em modelos de denervação, imobilização, restrição alimentar, diabetes mellitus e uremia (58).



**Figura 4.** Sistema ubiquitina-proteossoma dependente de ATP. Adaptado de Rev Bras Reumatol 2012;52(2):247-259

Evidências apontam que a atividade da via da PI3K/Akt é inibida em estados de atrofia, levando a ativação dos fatores de transcrição FoxO e da atroquina-1/MAFbx (59). Além disso, o tratamento com IGF-1 ou a expressão aumentada da Akt inibe a expressão da atroquina-1 (60) (61).

Outro regulador da via proteolítica no processo de atrofia do músculo esquelético é a miostatina, proteína integrante da superfamília TGF- $\beta$ , que atua na regulação do desenvolvimento muscular durante a fase embrionária e na vida adulta. Além de inibir a síntese proteica por redução da resposta celular a fatores anabólicos, como insulina e IGF-1, também promove aumento na degradação de proteínas musculares por inibição da via PI3K/Akt, e por estimulação da atroquina e outros genes relacionados à atrofia muscular (62), conforme demonstrado na figura 3. Além dos efeitos sobre o músculo, há relatos da atuação da miostatina

sobre inibição de diferenciação osteoblástica (63) e aumento da expressão de RANKL, promovendo a diferenciação e a atividade dos osteoclastos (64). Esses achados sugerem que a miostatina exerce efeitos negativos na massa óssea por meio da diminuição da formação e do aumento da reabsorção.

### 1.3. Interação bioquímica entre Osso e Músculo

Além da influência mecânica, muitos fatores circulantes, como a miostatina, afetam simultaneamente os ossos e músculos, gerando interação entre ambos por meio de vias de sinalização locais e humorais. O entendimento sobre as vias de sinalização que regulam o *turnover* proteico do tecido muscular permite maior compreensão da interação entre osso e músculo, além da elaboração de uma abordagem terapêutica direcionada.

Produtos específicos de osteoblastos e osteócitos, incluindo osteocalcina e esclerostina, podem atuar como fatores endócrinos com ação sobre o músculo. Já foi demonstrado que a osteocalcina, proteína da matriz óssea não colágena produzida por osteoblastos, através da fração não carboxilada, está envolvida na adaptação da miofibrila ao exercício (65). Mera *et al.* (66) mostraram que camundongos com deficiência de osteocalcina exibiram uma diminuição na massa e função muscular, sugerindo que a osteocalcina pode exercer efeitos anabólicos musculares. Os níveis de esclerostina, por sua vez, já foram negativamente relacionados com a massa muscular esquelética, independentemente de fatores como conteúdo mineral ósseo e massa gorda (67). Como é um regulador da via Wnt, que é ativada durante a regeneração muscular *in vivo*, a esclerostina pode ter papel na diferenciação e proliferação de mioblastos.

Embora tenha uma ação bem definida sobre o músculo cardíaco (68), o papel do FGF-23 sobre musculatura esquelética ainda é desconhecido. Sabe-se que outros FGFs têm papel na manutenção e reparação do músculo esquelético (69), podendo ativar inclusive vias de

sinalização intracelular, como PI3K/Akt. O FGF-19, por exemplo, está envolvido na preservação de massa muscular durante a atrofia induzida pelo tratamento com glicocorticóides, obesidade e envelhecimento (70). Enquanto o FGF-19 atua na síntese proteica, o FGF-21 é um marcador de disfunção mitocondrial do tecido muscular (71, 72).

O TGF- $\beta$  é expresso em tecido ósseo e tecido muscular, e atua inibindo a miogênese (73). Há evidências em estudos com murinos de que ocorre liberação de TGF- $\beta$  pelo osso em situações de remodelação óssea alterada, como metástases ósseas, que afetam canais de cálcio nas células musculares e contribuem para desenvolvimento de fraqueza muscular (74). Os níveis de TGF- $\beta$ 1 também estão aumentados em pacientes com doenças musculares, como distrofia muscular de Duchenne (DMD), tanto no plasma quanto no músculo, e a expressão de TGF- $\beta$ 1 se correlaciona com fibrose muscular (75, 76). O aumento da sinalização de TGF- $\beta$  também foi associado a várias outras miopatias adquiridas (77).

A osteopontina (OPN) é uma glicoproteína não-colágena da matriz extracelular do tecido ósseo, codificada pelo gene *SPP1*, e está envolvida em muitos processos fisiológicos e patológicos, como na fibrose muscular relacionada a distrofinopatias. Além do seu papel na regulação da resposta das células ósseas ao efeito do PTH (78, 79), ela também atua como citocina inflamatória e promove a migração de células imunes (80, 81). Vetrone *et al.* (82) descreveram concentrações elevadas de OPN tanto no soro de camundongos *mdx*, modelo animal para a DMD, quanto músculo de pacientes com DMD. A deleção de OPN levou a uma redução nos neutrófilos e células T *natural killer* nos músculos em comparação com os músculos de camundongos *mdx* expressando OPN. Essas alterações nas células inflamatórias também foram acompanhadas por uma redução na expressão de TGF- $\beta$  muscular, que se correlacionou com o aumento da força e redução da fibrose.

Não somente o tecido ósseo, mas o músculo esquelético também atua como um órgão endócrino por meio de peptídeos chamados de miocinas, que estão envolvidas no *crosstalk* entre



o músculo e outros órgãos. Além da miostatina já mencionada, vários tipos de miocinas já foram identificadas, dentre elas a irisina.

A irisina é um dos peptídeos produzidos pelo músculo a partir da proteína transmembrana fibronectina tipo III contendo o domínio 5 (FNDC5), que, após clivagem e glicosilação, é liberada na circulação durante o exercício físico, possuindo efeito em órgãos à distância. Pertence à classe das adipomiocinas, modulando o gasto energético através do tecido adiposo e facilitando a captação de glicose pelo músculo.

A irisina tem efeitos sobre metabolismo ósseo; inclusive, há evidência de que proteínas da classe  $\alpha V$  integrina atuam como possíveis receptores da irisina em osteócitos (83). Também há estudos que demonstraram efeito da irisina sobre diferenciação e proliferação dos osteoblastos, bem como aumento na expressão de reguladores da transcrição osteoblástica (84, 85). Estudos experimentais sugeriram uma correlação negativa entre irisina e PTH, uma vez que foi identificada uma expressão reduzida de FNDC5 em miotubos tratados com PTH (1-34), além de uma expressão diminuída do receptor de PTH em osteoblastos tratados com irisina (86). Tais achados foram corroborados pelo achado de uma redução significativa da concentração sanguínea de irisina em mulheres na pós-menopausa com diagnóstico de hiperparatireoidismo primário.

#### **1.4. Impacto da DRC sobre o tecido muscular**

A sarcopenia afeta todos os estágios da DRC, piorando com o declínio da taxa de filtração glomerular, e envolve tanto uma redução no número quanto no tamanho da fibra muscular (87). Já foi demonstrado que a progressão da DRC está associada à disfunção mitocondrial no tecido muscular (88), e que pacientes com DRC em tratamento dialítico

apresentam perda mais significativa de massa muscular quando comparados àqueles em tratamento conservador (89). O diagnóstico de miopatia urêmica é baseado em características clínicas, incluindo fraqueza muscular, e está relacionado a diminuição da sobrevivência dos pacientes. Sua origem é multifatorial, envolvendo alterações imunológicas, hormonais, inatividade física, acidose metabólica, ingestão reduzida de proteínas, excesso de angiotensina II e anormalidades do eixo GH/IGF-1. Como resultado desses fatores, ocorre aumento do catabolismo de proteínas musculares e também uma redução no anabolismo muscular. Uma análise experimental em modelos de camundongos com DRC demonstrou que ocorre redução de síntese proteica em tecido muscular, bem como aumento da inflamação e expressão de proteínas nucleolares com atividade sobre as histonas desacetilases, enzimas reguladoras de transcrição gênica (90).

Além destes fatores, a deficiência de vitamina D também é reconhecida como fator de risco para a miopatia da DRC (91). Estudos *in vitro* confirmaram que o receptor de vitamina D está presente no músculo, e sua atuação ocorre através da expressão gênica de proteínas contráteis e de um efeito não genômico pela regulação dos canais de cálcio da membrana. Portanto, a vitamina D pode ter papel importante nas funções musculares mediadas por cálcio, como contração muscular e função mitocondrial.

O tratamento da sarcopenia, condição associada à elevada morbidade em pacientes em diálise, ainda é alvo de debate. A prática regular de atividade física contribui para desfechos favoráveis em pacientes com DRC independente do estágio (92). Inclusive, já foi demonstrado que o treinamento físico em pacientes em diálise promove alterações na expressão gênica de proteínas musculares relacionadas ao anabolismo proteico (93). Contudo, diante das inúmeras comorbidades associadas no paciente com DRC, comumente a prescrição de atividade física regular torna-se um desafio, exigindo alternativas para manutenção de massa muscular nesta população.

O aporte nutricional também deve ser avaliado para tratamento desta condição. Entretanto, apesar de a redução de ingesta energético-proteica ter papel importante no desenvolvimento da sarcopenia, o aumento isolado na taxa de consumo de proteínas é insuficiente para corrigir a taxa de síntese proteica muscular. Condições específicas, como envelhecimento por exemplo, causam aumento de proteólise muscular, e a síntese proteica limitada não é corrigida com o aumento isolado do aporte de proteína dietética. Bhasin *et al.* (94) avaliaram o aumento de consumo proteico em pacientes idosos (0,8 versus 1,3 g de proteína/kg por dia) e não identificaram aumento de massa corporal magra ou desempenho muscular. Fujii *et al.* (95) demonstraram que a síntese de proteínas no músculo é suprimida em ratos urêmicos e este defeito metabólico não é revertido com o aumento da proteína dietética. Diante disso, ainda são necessários mais estudos visando ao desenvolvimento de estratégias para prevenir ou atenuar a progressão de sarcopenia relacionada a DRC.

### **1.5. Impacto do PTH sobre o tecido muscular**

Há evidências em modelos animais de câncer e DRC de que o PTH e o PTH-rp atuam como mediadores na perda de tecido adiposo e massa muscular, através da ativação do PTHR1. Em estudo experimental, a inoculação de células cancerígenas em camundongos foi responsável por aumento da concentração de citocinas e proteínas relacionadas ao tumor, dentre as quais o PTH-rp, com capacidade de estimular a transformação de tecido adiposo branco em tecido adiposo marrom, contribuindo para o aumento do consumo de energia através de termorregulação. Ao comparar modelos de DRC em camundongos nefrectomizados (nefrectomia 5/6), animais com deleção de PTHR1 em tecido adiposo (modelo *Adipo-PTHr1-KO*) apresentaram, em comparação àqueles sem a deleção do receptor de PTH, redução de atrofia muscular e bloqueio na regulação dos genes da MuRF-1, atrogina-1 e miostatina, bem como dos genes reguladores de termogênese do tecido adiposo. Tal achado sugere uma atuação

do PTH sobre o tecido muscular e sobre a regulação do metabolismo energético, e que a deleção do PTHR1 pode atuar como importante fator para resistência ao desenvolvimento de sarcopenia (96).

### **1.6. Justificativa do estudo**

A ação do HPTS sobre o balanço de cálcio e taxa de formação óssea já é bem estabelecida; contudo, a ação do PTH sobre o tecido muscular é pouco conhecida, apesar deste partilhar com o tecido ósseo a mesma origem embriológica: as células mesenquimais. Diante da comprovação da ação do PTH sobre o músculo, o HPTS pode ter papel adjuvante definido no desenvolvimento da sarcopenia, condição de elevada morbidade relacionada a DRC avançada, e o seu controle efetivo pode servir como estratégia para melhorar a capacidade funcional dos pacientes.

## **2. OBJETIVOS**

---

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Primário**

- Avaliar o impacto da PTX sobre a expressão gênica e proteica do tecido muscular de pacientes com HPTS grave

### **2.2. Secundários**

- Avaliar influência do tratamento cirúrgico do HPTS sobre a composição corporal em pacientes com DRC;

- Avaliar influência da PTX sobre performance muscular e gasto energético de repouso;

- Estudar mecanismo fisiopatológico do HPTS sobre miopatia urêmica.

## **3. MÉTODOS**

---

### **3. MÉTODOS**

Trata-se de um estudo longitudinal, do tipo coorte prospectiva observacional. Foram selecionados pacientes acompanhados no ambulatório de DMO-DRC da nefrologia do Hospital das Clínicas com indicação de PTX, com condição clínica estável e capacidade de manter seguimento regular após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

O seguimento clínico pré e pós-cirúrgico do paciente foi realizado pela equipe de nefrologia do referido ambulatório.

#### **3.1. Critérios de Inclusão**

- Diagnóstico de Doença renal crônica estágio 5 submetidos a hemodiálise convencional 3 vezes por semana com diagnóstico de HPTS grave, definido pela necessidade de tratamento cirúrgico (PTX);
- Idade acima de 18 anos, de ambos os sexos, com aceitação manifesta ao assinarem o TCLE.

#### **3.2. Critérios de não-elegibilidade**

- Pacientes em uso de imunossupressores ou bisfosfonatos;
- Diabetes mellitus;
- Limitação física devido dor ou fratura prévia, uso de suporte para deambulação (cadeira de rodas ou muleta);
- Pacientes em diálise peritoneal;
- Pacientes em uso de dupla antiagregação plaquetária ou anticoagulantes;
- Doenças infecciosas (hepatites virais ou HIV).



### 3.3. Protocolo do estudo

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HC-FMUSP, sob o número 87886218.7.0000.0068. Pacientes foram submetidos a coleta de amostra de sangue, testes funcionais, calorimetria indireta, densitometria de corpo total e biópsia muscular em topografia de vasto lateral antes da PTX e 6 meses após, período geralmente suficiente para fim do período de fome óssea pós-PTX e redução da necessidade de reposição de cálcio e calcitriol (97) . .

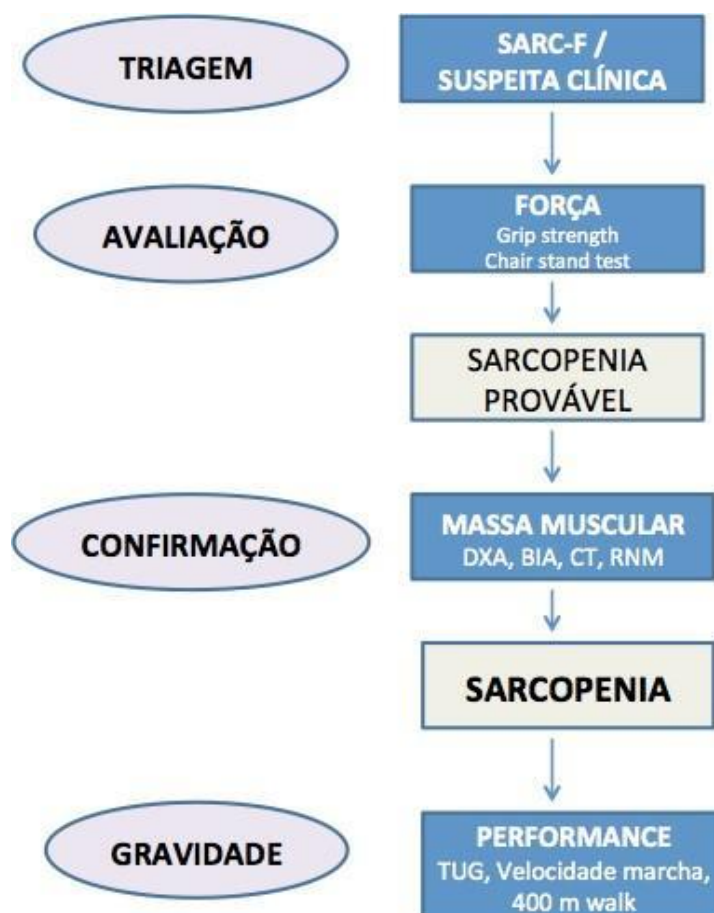
### 3.4. Exames Bioquímicos

As análises de PTH (Valor de referência - VR 15-65 pg/mL) e 25OH D (VR 30-60 ng/mL para grupos de risco, incluindo DRC) foram feitas pelo método eletroquimioluminométrico. A fosfatase alcalina (VR mulheres 35-104 U/L e homens 40-129 U/L) foi analisada pelo método cinético automatizado. As análises de cálcio total (VR = 8,4-10,2 mg/dL), fósforo (VR= 2,7-4,5 mg/dl) e albumina (VR 3,4-4,8 g/dL) foram feitas pelo método colorimétrico automatizado. Proteína C Reativa (VR<5,0 mg/L) foi feita pelo método imunoturbidimétrico, enquanto hemoglobina (VR 13,0-18,0 g/dL) e hematócrito (VR 40,0-52,0%) foram feitos pelo método automatizado/microscopia. Também foi realizada dosagem de glicemia e insulinemia para identificação dos níveis de resistência insulínica (fator relacionado a perda de massa muscular).

As análises da esclerostina, FGF-23 intacto, RANKL, osteocalcina, leptina, interleucinas (IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-17A), TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e das miocinas (miostatina, irisina, FGF-21) foram realizadas por Milliplex®MAP Human Bone Metabolism Magnetic Bead Kit, baseado na tecnologia Luminex MAP® (Sem VR; Merck Millipore, Darmstad, Alemanha). As análises de CTX (VR mulheres até 0,57 ng/mL, homens até 0,7 ng/mL) e P1NP (VR mulheres 15,1 a 58,6 ng/mL, homens 13,9 a 85,5 ng/mL) foram feitas pelo método eletroquimioluminométrico.

### 3.5. Avaliação funcional

Para triagem e diagnóstico de sarcopenia, o *European Working Group on Sarcopenia in Older People* (EWGSOP) (47) recomenda seguir o algoritmo ilustrado na figura 5.



**Figura 5.** Algoritmo para avaliação de sarcopenia EWGSOP2. DXA: densitometria de dupla emissão com fonte de raios X; BIA: bioimpedância elétrica; CT: tomografia; RNM: ressonância magnética; TUG: timed-up-and-go test

- Triagem: Para identificar indivíduos com risco de sarcopenia, além da suspeita clínica, o EWGSOP recomenda o uso do questionário SARC-F para encontrar sintomas associados à sarcopenia;
- Avaliação: Diante do rastreio positivo, recomenda-se o uso de teste de força de preensão (*Handgrip*) ou o teste de levantar da cadeira (*sit to stand* - STS);
- Confirmação: Pode ser utilizada densitometria de dupla emissão com fonte de raios X

(DXA) ou bioimpedância elétrica (BIA) na prática clínica. Por meio da avaliação de parâmetros de massa magra corrigidos, como massa magra apendicular ajustada para IMC ou altura (ALM/IMC e ALM/alt<sup>2</sup>, respectivamente), é possível discriminar o índice de massa esquelética apendicular e sujeitos com perda “patológica” de massa muscular baseados em valores de corte específicos validados na literatura, como os descritos na tabela 2.

- Determinar a gravidade: pode ser avaliada por medidas de desempenho como velocidade de marcha ou *timed-up-and-go* (TUG).

- **Tabela 1.** Pontos de corte de sarcopenia EWGSOP2

Teste	Ponto de corte (Masculino)	Ponto de corte (Feminino)
<b>AVALIAÇÃO</b>		
<i>Handgrip</i>	< 27 Kg	< 16 Kg
<i>Sit-to-stand</i>	> 15 seg para 5 subidas	
<b>QUANTIFICAÇÃO</b>		
Massa muscular esquelética apendicular	< 20 Kg	< 15 Kg
Massa muscular esquelética apendicular/altura <sup>2</sup>	< 7 Kg/m <sup>2</sup>	< 5,5 Kg/m <sup>2</sup>
<b>DESEMPENHO</b>		
Teste da caminhada	≤ 0,8 m/s	
Timed Up and Go (TUG)	≥ 20 seg	
Caminhada de 400 m	Não concluído ou ≥ 6 min para conclusão	

seg: segundos; m/s: metro/segundo; min: minutos

- **Tabela 2.** Avaliação de índice de massa muscular apendicular

Fonte	Diagnóstico	Ponto de corte
EWGSOP	MMA/alt <sup>2</sup>	F ≤ 5,5 kg/m <sup>2</sup> M ≤ 7,26 Kg/m <sup>2</sup>
EWGSOP II	MMA/alt <sup>2</sup>	F ≤ 5,5 kg/m <sup>2</sup> M ≤ 7 Kg/m <sup>2</sup>
FNIH	MMA/IMC	F < 0,512 M < 0,789
IWGS	MMA/alt <sup>2</sup>	F ≤ 5,67 kg/m <sup>2</sup> M ≤ 7,23 Kg/m <sup>2</sup>
SSCWD	MMA/alt <sup>2</sup>	- 1 SD para população de referência
AWGS	MMA/alt <sup>2</sup>	F < 5,4 kg/m <sup>2</sup> M < 7 Kg/m <sup>2</sup>

EWGOP: European Working Group on Sarcopenia in Older People; IWGS: International Working Group on Sarcopenia; SSCWD: Society of sarcopenia, Cachexia and Wasting Disorders; AWGS: Asian Working Group for Sarcopenia; FNIH: Foundation for the National Institutes of Health on Sarcopenia Project; MMA: Massa magra apendicular; Kg/m<sup>2</sup>: quilograma por metro quadrado; IMC: índice de massa corporal; F: feminino, M: Masculino.

### 3.5.1 Questionário SARC-F

Foi desenvolvido como teste de rastreio para a sarcopenia e está demonstrado no anexo C. Existem 5 componentes avaliados: força (dificuldade para levantar peso), assistência com caminhadas, capacidade de levantar de uma cadeira, subir escadas (dificuldade para subir 10 degraus) e frequência de quedas no último ano. Os escores variam de 0 a 10, com 0 a 2 pontos para cada componente. O rastreio é considerado positivo quando o resultado é maior ou igual a 4.

### 3.5.2 Acelerômetro

A atividade física habitual foi medida através de acelerômetro triaxial (Actigraph, modelo GT3X). O acelerômetro é um sensor de movimento que mensura a aceleração do movimento corporal, quantificando a frequência, duração e intensidade da atividade física. Isso reduz a variação subjetiva estimada pelo autorrelato dos indivíduos, e atribui medidas objetivas, em três planos diferentes (anteroposterior, médio-lateral e vertical), através de sinais de aceleração, como um padrão de oscilação, intervalo de tempo e a magnitude. Todos os pacientes foram instruídos a usar o aparelho durante o dia, exceto durante o banho ou em atividades aquáticas, por 7 dias consecutivos, garantindo sempre a utilização em pelo menos um dia do final de semana. O dispositivo ficava preso a um cinto elástico, fixado no lado direito do quadril. Todos deveriam acumular pelo menos 10 horas de gravações de atividade válidas por dia durante pelo menos 4 dias. Eles foram instruídos a preencher um diário com registro de quando o dispositivo foi utilizado e removido para garantir a precisão dos dados do acelerômetro (por exemplo, para distinguir o tempo de sedentarismo). Os dados foram exportados pelo software Actilife versão 6.0. A medida do acelerômetro (*count*) é dada por meio da aceleração do corpo em movimento, e a média do tempo despendido em cada intensidade de atividade foi calculada

utilizando pontos de corte específicos (98). O tempo total gasto em atividade sedentária e atividade física moderada e vigorosa (AFMV) foi demonstrado em minutos/dia.

### **3.5.3 Força de preensão (*Handgrip strength*)**

A força isométrica foi avaliada através de um dinamômetro de preensão manual (Takei A5001 Hand Grip Dynamometer, Takei Scientific Instruments Co., Ltd., Tóquio, Japão). O protocolo consistiu em três contrações isométricas máximas de 5 segundos com períodos de recuperação de 60 segundos, sendo o teste realizado em ambas as mãos. Foi realizado o ajuste para regular a distância da pegada do dinamômetro com a falange intermédia, para obter um encaixe adequado na mão para um melhor desempenho. Os participantes foram posicionados em pé, com os braços estendidos ao lado do corpo com o dinamômetro voltado para fora. O maior valor foi anotado para as análises. Para definição de perda de força foram utilizados pontos de corte de estudo com uma população brasileira com faixa etária correspondente (99).

### **3.5.4 Teste *sit-to-stand-to-sit* (STS)**

Para o teste de “sentar e levantar”, os participantes iniciavam a avaliação na posição sentada, em uma cadeira apoiada contra uma parede para reduzir o risco de queda, e com os braços cruzados à frente do tronco. Foi realizado ajuste do assento para manter 90 graus de flexão de joelho. Em seguida, foram orientados a manter a extensão dos joelhos ao ficarem de pé e a apoiarem as costas ao sentarem. No disparo do cronômetro, os voluntários levantaram e sentaram na cadeira o maior número de vezes no período de 30 segundos, iniciando e finalizando na posição sentada. Duas tentativas foram realizadas com 60 segundos de intervalo entre elas. Assim, o maior número de repetições entre as tentativas foi utilizado para análise.

### 3.5.5 Teste *Timed Up and Go* (TUG)

Para a realização do teste, os participantes foram orientados a sentar na cadeira com as costas apoiadas no encosto, levantar ao sinal do avaliador, sem o auxílio das mãos, caminhar 3 metros, dar uma volta de 180° e voltar ao ponto de partida, sentando na cadeira novamente, apoiando as costas. Os voluntários foram orientados a realizar o percurso no menor tempo possível, sem correr. Duas tentativas foram realizadas com 60 segundos de intervalo entre elas. Os participantes foram encorajados verbalmente durante a realização de todas as tentativas. Não foi utilizado qualquer dispositivo auxiliar de marcha durante o teste. Assim, o menor tempo obtido foi utilizado para análise. O cronômetro era pausado quando o participante encostava novamente no banco.

### 3.6. Avaliação da composição corporal

Estudo de composição corporal foi realizado através de DXA para quantificação da massa óssea, massa magra apendicular e massa adiposa total. Foi utilizado o densitômetro GE Healthcare Lunar iDXA no Laboratório de Metabolismo Ósseo da Disciplina de Reumatologia (LIM17).

Foram utilizados valores de referência da EWGSOP II para definição de massa apendicular reduzida ou índice de massa esquelética alterado (sexo feminino  $< 15$  kg ou  $\leq 5,5$  kg/m<sup>2</sup>, masculino  $< 20$  kg ou  $\leq 7$  kg/m<sup>2</sup>) (47).

A DMO é expressa em g/cm<sup>2</sup> e foram analisados coluna lombar, quadril e corpo total. O laudo fornece o número de desvios padrão do resultado obtido em relação à média de adultos jovens, população que representa o pico de massa óssea. Este desvio padrão, ou T-score, é usado para definir o diagnóstico de osteoporose segundo os critérios da Organização Mundial da

Saúde: valores até -1 desvios padrão (DP) da média são considerados normais, valores entre - 1,1 e - 2,4 DP definem osteopenia e valores  $\leq$  - 2,5 DP diagnosticam osteoporose.

### 3.7. Avaliação de gasto energético de repouso

A análise de gasto energético foi feita por meio de calorimetria indireta, exame realizado no Laboratório de Avaliação e Condicionamento em Reumatologia (*Lacre*). Durante o exame, os dados foram monitorados com o Ergo PC Elite, Inc. Micromed, Brasil. É um método não-invasivo que determina as taxas de utilização dos substratos energéticos a partir do volume de oxigênio consumido e o de dióxido de carbono produzido por um indivíduo. Os valores são obtidos a cada inspiração/expiração (*breath-by-breath*) e expressos por meio de sistema de sensor de calorimetria indireta (Cortex® - MetaLyzer 3B® Leipzig, Alemanha) em médias de 30 segundos. Os sensores de oxigênio e dióxido de carbono são calibrados antes de cada medição.

O local das avaliações foi climatizado, a umidade relativa do ar e a pressão barométrica foram continuamente monitoradas durante o exame. Por meio de contato telefônico, os participantes eram instruídos a não ingerir bebidas cafeinadas ou alcoólicas, a não realizar exercícios físicos intensos nas 24 horas antecedentes à avaliação e a comparecerem em jejum de pelo menos 3 horas. Após permanecerem em repouso por aproximadamente 30 minutos, os pacientes eram posicionados em decúbito dorsal, e a mensuração era iniciada.

O consumo de oxigênio e a produção de dióxido de carbono foram medidos em intervalos de 1 minuto durante 30 minutos, e a média do último período de medição de 25 minutos foi usada para calcular o GER de acordo com a equação de Weir [ $3,942 * VO_2$  (L/min) +  $1,106 * VCO_2$  (L/min) \* 1.440 min] (100).

### **3.8. Biópsia muscular**

Os pacientes foram submetidos a biópsia por punção com agulha Bergström modificado em topografia de músculo vasto lateral para análise histológica e molecular. Para realização do procedimento, após assepsia e antissepsia, é administrado anestésico local e procedida incisão de cerca de 0,5 cm na pele do paciente em topografia de músculo vasto lateral da coxa. A agulha é introduzida dentro do músculo através do tecido subcutâneo e fáscia. Em seguida, com uma seringa de 20 mL, é aplicada pressão negativa no interior da agulha através de aspiração. O trocarte exterior é puxado, enquanto o tecido muscular é deslocado para dentro da janela da cânula por sucção, e o trocarte interior rapidamente fechado para coleta do tecido sob técnica de guilhotina. Este processo pode ser repetido até três vezes. Esta técnica de corte produz uma amostra tecidual de cerca de 90 a 100 mg em indivíduos saudáveis. Como o procedimento é feito por punção, não há necessidade de sutura após a sua realização, apenas oclusão da incisão com curativo. Após o procedimento, os indivíduos podem retomar suas atividades de vida diária e realizar atividade física vigorosa dentro de 48 a 72 horas. A Figura 6 abaixo ilustra a técnica utilizada para o procedimento.





**Figura 6.** Sequência para realização de biópsia muscular

Após a realização da biópsia, o fragmento de músculo coletado foi dividido em 2 partes: o primeiro fragmento foi fixado por 20 horas em solução de formalina tamponada a 10% (10% formaldeído, 0,1M tampão fosfato pH 7,4), e destinado para realização de imuno-histoquímica; e o segundo foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e estocado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior processamento (homogeneização), dosagem proteica e avaliação de expressão gênica.

### **3.8.1 Técnica de imuno-histoquímica**

O fragmento da biópsia muscular destinado à imuno-histoquímica foi processado, logo após o período de fixação, em processador automático de tecidos (Jung Histokinette 2000, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Alemanha). O processamento consiste na incubação do tecido em banhos, aproximadamente 90 minutos cada, de etanol para desidratação (concentrações crescentes 50%, 70%, 96% e 100%), xilol para diafanização e por fim, parafina fundida ( $58^{\circ}\text{C}$ )

para impregnação com parafina. Os fragmentos de tecido assim processados foram incluídos em blocos de parafina e cortados em micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica, Nussloch, Alemanha) com navalhas descartáveis, em fragmentos de 4 a 5 mm de espessura. Posteriormente foram aderidos em lâminas previamente tratadas com solução organossilano 2% (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) em acetona (Merck Darmstadt, Alemanha). Para melhor adesão dos fragmentos, as lâminas foram mantidas por 2 horas a 60°C (em estufa Fabbe-Primar, São Paulo, Brasil), e em seguida armazenadas a 4°C até a utilização.

Para a realização dos ensaios de imuno-histoquímica, os fragmentos passaram pelo processo de desparafinização, permanecendo 30 minutos em estufa a 60°C (para derreter a parafina), em seguida as lâminas passaram por 3 banhos de 9 minutos em xilol (remoção da parafina), 2 banhos de 5 minutos em etanol absoluto (remoção do xilol), 3 banhos sequenciais em etanol 96%, etanol 80% e água destilada (reidratação do tecido). Finalizada essa etapa, as lâminas foram expostas ao calor por 30 minutos para recuperação antigênica, em panela a vapor e imersas em tampão citrato (ácido cítrico 10mM , pH=6,0 ajustado com NaOH). Após esfriar até a temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas em água destilada por 5 minutos e então submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena do tecido por 30 minutos de incubação em solução de peróxido de hidrogênio 3% (Merck, Honenbrunn, Alemanha) e álcool metílico 70%. As lâminas foram lavadas por 5 minutos em tampão PBS (0,2 M fosfato de sódio, 0,9% NaCl, pH 7,4).

Para a realização da imunohistoquímica para atrogina 1, miostatina e TGF- $\beta$  foi utilizado o kit EnVision+ System-HRP Labelled Polymer (K4001 e K4003, Dako, Carpinteria, CA, EUA). Os fragmentos de tecido foram incubados, durante 30 minutos, em câmara úmida com solução de soro não imune de cavalo (1:50, Vector, S-2000) e albumina sérica bovina (0,5%, Sigma-Aldrich–ST Louis, EUA) para bloqueio das interações inespecíficas. O controle negativo do método foi realizado em todos os experimentos omitindo-se o anticorpo primário.

As diluições dos anticorpos utilizados estão descritas na tabela 3.

**Tabela 3.** Lista de anticorpos utilizados nas técnicas de imunohistoquímica e suas respectivas diluições.

Anticorpo	Fabricante	Código	Origem	Diluição
Fbx32 - Atrogina 1	Abcam	ab 157596	Coelho	1:200
Anti-Miostatina	Invitrogen	PA5 11936	Coelho	1:50
Anti-OPN	Santa Cruz	SC 10593	Cabra	1:20
Anti-TGF $\beta$	Genetex	GTX 21279	Camundongo	1:800
Anti-VDR	Invitrogen	MA 1-710	Camundongo	1:50

OPN: osteopontina; TGF $\beta$ : fator de transformação do crescimento- $\beta$ ; VDR: receptor de vitamina D

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS por 5 minutos e incubadas por 30 minutos com HRP Labelled Pollymer anti-camundongo (K4001) ou anti-coelho (K4003). Após lavagem em PBS, para a revelação do antígeno os fragmentos de tecido foram incubados com substrato cromogênico para peroxidase contendo AEC 3-Amino-9 Ethyl-Carbazol (Sigma-Aldrich–ST Loius, EUA). Durante o período de revelação, as lâminas foram observadas sob microscopia (Alphaphote-2 Nikon, Tóquio, Japão) para visualização da positividade celular. Após um período de 5 a 20 minutos dependendo do antígeno, a reação foi interrompida por lavagem em PBS. Em seguida, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 2 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos para intensificação da tonalidade azul do corante. A montagem das lâminas foi feita com gelatina glicerinada Kaiser (Merck, Darmstadt, Alemanha) previamente aquecida.

Para avaliação da expressão de VDR e OPN foi utilizado o Kit Vectastain ABC-HRP complexo Avidina/Biotina. Após a desparafinização, exposição antigênica e bloqueio da peroxidase endógena, os tecidos foram submetidos ao bloqueio da biotina endógena através da incubação sucessiva com solução de Avidina e de Biotina (Avidin-Biotin Blocking kit, Vector, SP 2001), por 15 minutos cada. O bloqueio de interações inespecíficas foi feito por incubação de 30 minutos em soro não imune de cavalo (1:50, diluído em PBS). As incubações com os

anticorpos primários foram realizadas da mesma maneira descrita anteriormente, nas concentrações indicadas na tabela 3. No dia seguinte, os cortes foram lavados em PBS e incubados com o anticorpo secundário anti-rato biotilado (1:500, Vector BA 4000) ou anti-cabra biotilado (1:250, Vector BA 9500), por 45 minutos. Os tecidos foram então incubados por 30 minutos com o Complexo Avidina-Biotina-HRP (1:100, Vector PK4000), lavados em PBS e submetidos à revelação, contra-coloração e montagem segundo os procedimentos descritos anteriormente.

Controles negativos do método foram realizados em todos os experimentos, omitindo-se o anticorpo primário. A fração de tecido muscular marcada por atrogina, miostatina, OPN e TGF- $\beta$  foi quantificada por contagem de pontos na área total do tecido obtido, em aumento final de 400x e com uma grade de 144 pontos. Os resultados foram expressos em percentagem em relação à área total (%). A quantificação de VDR foi realizada através da contagem de células marcadas no tecido muscular em aumento de 400x. Os resultados foram expressos em células por milímetro quadrado (cél/m<sup>2</sup>).

### **3.8.2 Técnica de quantificação de conteúdo proteico - Multiplex**

O ensaio pela tecnologia xMAP (*Multiple Analyte Profiling*) da Luminex é um método multiplex que permite quantificar diversos biomarcadores em uma pequena quantidade de amostra biológica. Possui princípio similar ao ELISA sanduíche, porém utiliza microesferas coloridas fluorescentes (*beads*) que se ligam, de forma covalente, aos anticorpos de captura. Ao adicionar as amostras de interesse na reação, os anticorpos específicos “capturam” seus respectivos antígenos, permitindo, inclusive, que vários possam ser detectados ao mesmo tempo. Em seguida, anticorpos específicos conjugados com biotina são adicionados na reação. Esses irão também “capturar” seus respectivos antígenos de interesse, formando então um

sistema de captura "sanduíche" (anticorpo-antígeno-anticorpo). Após essa etapa, adiciona-se estreptavidina conjugada com ficoeritrina (PE) que irá ligar-se ao anticorpo conjugado com a biotina. Uma vez formado esse imuno-complexo, a reação está pronta para ser lida num sistema de detecção das microesferas (Luminex 200™, Luminex Inc., Austin, EUA), identificando o anticorpo-antígeno a ela associado e a magnitude do sinal obtido pela estreptavidina - PE, que é diretamente proporcional à quantidade dos antígenos de interesse detectados.

Para a homogeneização dos fragmentos de músculos foram utilizados tubos com esferas de cerâmica de 2,8 mm (OMNI International, Kennesaw, USA), submetidos à agitação durante 1 ciclo de 30 segundos no Bead Ruptor (OMNI International, Kennesaw, USA). O RNA total e a proteína total foram extraídos seguindo o protocolo estabelecido para uso do reagente Trizol™ (Invitrogen, Carlsbad, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

Nos lisatos proteicos obtidos dos fragmentos de biópsias de músculos dos pacientes e de amostras de indivíduos normais, foram quantificadas as proteínas RANKL, DKK-1, FGF-23, Osteocalcina, Osteopontina, Osteoprotegerina, Esclerostina, GM-CSF, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-17A, TGF- $\beta$ 1, Akt (Total), Akt (Ser473), FGF-21, Irisina e Miostatina, através de kits Milliplex® (HADK1MAG-61K, HRNKLMAG-51K, HBNMAG-51K, HSTCMAG-28SK, TGFBMAG-64K, 48-618MAG e HMYOMAG-56K, Millipore, Darmstadt, Alemanha), baseado na tecnologia Luminex™ xMAP, de acordo com as instruções do fabricante.

Como ainda não há um padrão de normalidade para a quantificação dessas proteínas no tecido muscular, utilizamos o grupo controle para comparação. Para cada lisato proteico foi quantificada a proteína total em mg/mL ou em média de intensidade de fluorescência (MFI), utilizando o kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) para normalização das dosagens de proteínas obtidas nos ensaios multiplex.

### 3.8.3 Expressão gênica

A concentração do RNA total foi determinada por meio da leitura em 260 nm, e o grau de pureza pelas relações 260/280 nm (contaminação com proteína) e 260/230 nm (contaminação com compostos fenólicos) no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). As amostras com pureza satisfatórias foram as que obtiveram razões 260/280 próximas de 2,0 e 260/230 entre 1,8 e 2,2. A partir do RNA total extraído, foram sintetizados o cDNA pelo método da transcriptase reversa (Improm-II Reverse Transcriptase, Promega Corporation, Madison, USA) utilizando o termociclador (DNA Engine, MJ Research, Massachusetts, USA), o qual posteriormente foi utilizado para quantificar a expressão gênica por meio do PCR quantitativo (qPCR).

A expressão gênica foi determinada através do qPCR a partir do cDNA, utilizando o método de SYBR Green (Rotor Gene SYBR Green PCR kit, Qiagen, Hilden, Alemanha) e o termociclador Rotor-Gene Q, (Qiagen, Hilden, Alemanha), a partir do RNA total extraído das amostras de tecidos musculares dos pacientes e de pessoas saudáveis (grupo controle). Os genes analisados foram IGF-1 (ACC# NM\_000618.5); IL-6 (ACC# NM\_000600.5); TNF- $\alpha$  (ACC# NM\_000594.4); miostatina (ACC# NM\_005259.3); FNDC5 (fibronectin type III domain containing 5 - ACC# NM\_153756.3); Klotho (ACC# NM\_004795.4); RANK (ACC# NM\_003701.4); RANKL (ACC# NM\_001270949.2); VDR (receptor da vitamina D - ACC# NM\_000376.3); FGF23 (ACC# NM\_020638.3); FGF21 (ACC# NM\_019113.4); AKT (serine/threonine kinase 1- ACC# NM\_001014431.2); Atrogin-1 (ACC# NM\_001242463.2); MuRF-1 (tripartite motif containing 63 - ACC# NM\_032588.4); Foxo1 (forkhead boxO1 - ACC# NM\_002015.4); Foxo3a (ACC# NM\_001455.4); SPP1 (ACC#NM\_000582.3), IL-17A (ACC#NM\_002190.3), IL-1  $\beta$  (ACC#NM\_000576.3), e os genes normalizadores GAPDH (Proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - ACC# NM\_002046.4) e beta-actina (ACC# NM\_001101.5) através dos seus respectivos primers (tabela 4), os quais foram desenhados pelo

programa da IDT (Integrated DNA Technologies). A análise dos resultados foi realizada de forma relativa, com a comparação entre dois grupos, controle e tratamento. Para isso, o grupo controle foi constituído de amostras de 7 indivíduos jovens saudáveis com função renal normal e também serviu como referência para as curvas dos ensaios.

Para análise da expressão gênica dos grupos através do PCR, os resultados dos genes foram calculados como expressão relativa ao gene de referência GAPDH e normalizados ao seu calibrador usando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  para comparação dos resultados entre os grupos *baseline* e pós-PTX. Calculou-se o  $\Delta C_T$  de cada amostra a partir dos valores de  $C_T$  (*threshold cycle* ou limiar de ciclo) do gene controle (GAPDH) e dos valores do  $C_T$  do gene alvo.

Para análise da expressão relativa entre indivíduos saudáveis (grupo controle) e *baseline* (pré-PTX), os resultados da expressão gênica foram analisados pelo programa REST 2009 (Relative Expression Software Tool).

**Tabela 4.** Nome dos genes, sequência dos primers e tamanho dos amplicons.

Nome da sequencia	Sequencia 5-3'	Tamanho do amplicon
IGF-1 - forward	GAATCCTTCCTCTCCTTGGAAC	104
IGF-1 - reverse	GCCTTCTCCCAAGTGCATAA	
IL-6 - forward	GGAGACTTGCCTGGTGAAA	99
IL-6 -reverse	CTGGCTTGTTCCCTCACTACTC	
TNFalfa - forward	GATCCCTGACATCTGGAATCTG	129
TNFalfa -reverse	GAAACATCTGGAGAGAGGAAGG	
Miostatin - forward	GTCTGGAAACAGCTCCTAACA	107
Miostatin - reserse	GTCATCCCTCTGGACATCATAAC	
FNDC5 - forward	GCAGCTAAGAAGACAGACAGTAG	100
FNDC5 - reverse	TGGAGGGAAGAGATGTAGAGAG	
Klotho - forward	TCAGGCGTGGACTCTTCTAT	115
klotho - reverse	GGTAAAGGAGGGAAGCCATTT	
Rank - forward	CCCAAGTTCTCATACCCTGATG	118
Rank - reverse	TTCCTCTCCAGACCGTAACT	
RankL - forward	GGGACTCCTTAGCCAACATAAA	88
RankL - reverse	GGGCAGGAATGACGGTAAA	
VDR - forward	GAGGGAACAGACAGGAGAAATG	122
VDR - reverse	TATCGTGAGTAGGCAGGAGAG	
FGF23 - forward	CACTATTTTCGACCCGGAGAAC	84
FGF23 - reverse	GTGATACTGAGGAGAGTGGTAGA	
FGF21 - forward	GATCAAGGAACCTCAGTGTCAG	113
FGF21 - reverse	ACCACCTCTTGGACCATCTA	
AKT - forward	CTTTCAGGGCTGCTCAAGAA	100
AKT - reverse	ACACGATACCGGCAAAGAAG	
Atrogin-1 - forward	CAGGACCAGCTATGAGATTCAG	107
Atrogin-1 - reverse	CTGGCTGCCTCATGGAATAA	
MuRF-1 - forward	CTTTGGGACAGATGAGGAAGAG	113
MuRF-1 - reverse	CTCTCATTCATCCAGCTCCTTAC	
Foxo1 - forward	ACAGACCAACCTGGCATTAC	95
Foxo1 - reverse	TACGTCCTGATGGGACTTACA	
Foxo3a - forward	AGAGCTGAGACCAGGGTAAA	98
Foxo3a - reverse	GACAGGCTTCACTACCAGATTC	
Beta-actina - reverse	GTACAGGTCTTTGCGGATGT	108
SPP1 – forward	CATATGATGGCCGAGGTGATAG	
SPP1- reverse	AGGTGATGTCCTCGTCTGTA	103
IL-17A forward	CAAGACTGAACACCGACTAAGG	
IL-17A - reverse	CCATTCCTCAGGGCCATTATC	95
IL-1 $\beta$ forward	CTCTCACCTCTCCTACTCACTT	
IL-1 $\beta$ reverse	TCAGAATGTGGGAGCGAATG	102
GAPDH - forward	CAAGAGCACAAGAGGAAGAGAG	
GAPDH - reverse	CTACATGGCAACTGTGAGGAG	



### 3.9. Cálculo do tamanho da amostra

Não existem estudos prévios que tenham avaliado o impacto da PTX sobre a sarcopenia na DRC e a relação de marcadores do DMO-DRC com expressão gênica e proteica no tecido muscular, por esse motivo o tamanho da coorte foi estabelecido através de amostragem por conveniência.

### 3.10. Análise estatística

Os dados descritivos foram expressos como médias e desvios-padrão ou medianas e intervalo 25-75%, para variáveis com distribuição paramétrica e não paramétrica, respectivamente. Comparações entre variáveis contínuas foram feitas usando teste t pareado ou teste de Wilcoxon de acordo com a distribuição gaussiana ou não-gaussiana dos dados, respectivamente. Os dados categóricos foram apresentados em valor numérico e percentual, e comparados através de teste de McNemar antes e após a intervenção. Correlação entre variáveis independentes foi feita por Pearson ou Spearman, apropriadamente. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. As análises foram realizadas com o uso do SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill., EUA) e do software GraphPad Prism® versão 9.0 (GraphPad Software, Inc., Califórnia, EUA).

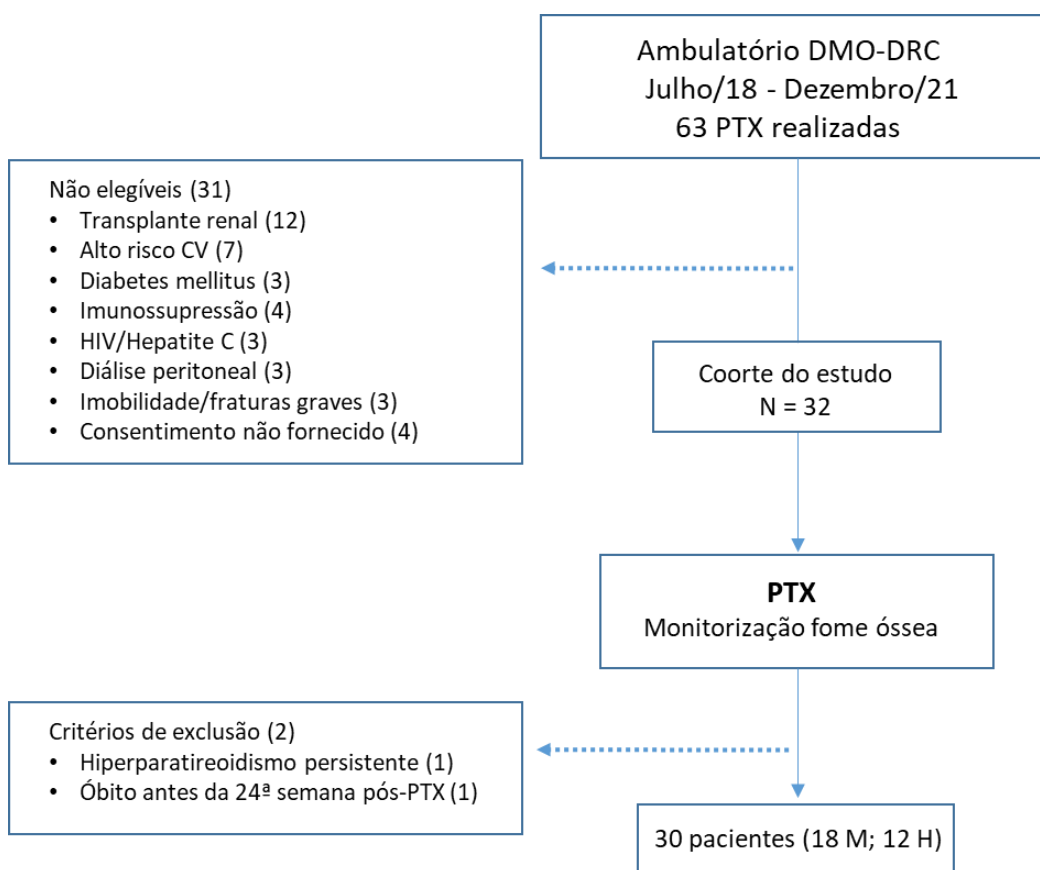
## **4. RESULTADOS**

---

---

## 4. RESULTADOS

No período de julho de 2018 a dezembro de 2021 foram realizadas 63 cirurgias de PTX de pacientes seguidos no ambulatório de DMO-DRC do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Destes, 31 pacientes apresentavam um ou mais critérios de não-elegibilidade, apresentados na figura 7. Foram incluídos 32 pacientes na coorte, sendo que um foi excluído devido hiperparatireoidismo persistente após PTX e um foi excluído por óbito antes da 24ª semana do pós-operatório. Dos 30 pacientes reavaliados após 6 meses, 20 foram submetidos a PTX subtotal.



**Figura 7.** Fluxograma do estudo. M: mulheres, H: homens, PTX: paratireoidectomia, CV: cardiovascular

#### 4.1. Características clínicas e laboratoriais basais dos pacientes e após 6 meses da PTX

Os dados clínicos e laboratoriais basais dos pacientes encontram-se na tabela 5. Os pacientes eram jovens, com idade média de  $39 \pm 12$  anos, 60% do sexo feminino e todos tinham indicação de tratamento cirúrgico do HPTS. Os pacientes apresentavam DRC em hemodiálise, sem função renal residual, com 12 horas semanais de tratamento, tendo como doenças de base principais: Glomerulonefrite Crônica (53%) e Hipertensão arterial (20%). A média de tempo em tratamento dialítico foi de 66 meses, com IMC médio que não era sugestivo de desnutrição.

**Tabela 5. Dados clínicos e laboratoriais basais e 6 meses após PTX (n = 30)**

	Pré-PTX	Pós-PTX	p
Idade, anos	$39 \pm 12$		
Tempo em diálise, meses	66 (56-95)		
Doença de base, %			
Glomerulonefrite	16 (53,3)		
Hipertensão Arterial	6 (20)		
Indefinida	4 (13,3)		
DRPAD	2 (6,6)		
Urológica	2 (6,6)		
Índice de massa corporal, kg/m <sup>2</sup>	$25,8 \pm 3,9$	$26,6 \pm 4$	<b>0,001</b>
Proteína C reativa, mg/dL	6,4 (4-12)	3,6 (2-8)	<b>0,01</b>
Albumina sérica, g/dL	$4,5 \pm 0,4$	$4,6 \pm 0,3$	0,08
Hemoglobina, g/dL	$11,3 \pm 1,6$	$12,6 \pm 1,7$	<b>0,001</b>
Glicemia, mg/dL	85 (73 – 90)	84 (72 – 90)	0,345
HbA1C, %	$5,1 \pm 0,48$	$5,3 \pm 0,53$	<b>0,008</b>
HOMA-Ir	1,74 (0,8 – 3,1)	2,29 (1,4 – 5,8)	<b>0,006</b>
Colesterol Total, mg/dL	150 (137 - 172)	167 (147 - 187)	0,2
Triglicérides, mg/dL	128 (98 - 162)	133 (99 - 186)	0,3
Bicarbonato, mmol/L	22,3 (21,6 - 24,2)	23 (21,2 - 24,9)	0,91
IGF-1, ng/mL	173 (139 – 218)	197 (151 - 260)	<b>0,04</b>
GH, ng/mL	0,36 (0,1 – 1,4)	0,56 (0,2 – 1,4)	0,3
Leptina, ng/mL	18,6 (7,8 – 81,1)	0,78 (0,6 – 1,1)	<b>0,0007</b>

PTX: paratireoidectomia; DRPAD: doença renal policística autossômica dominante; IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1, GH: hormônio do crescimento. Dados expressos em média±desvio-padrão ou mediana (IIQ)

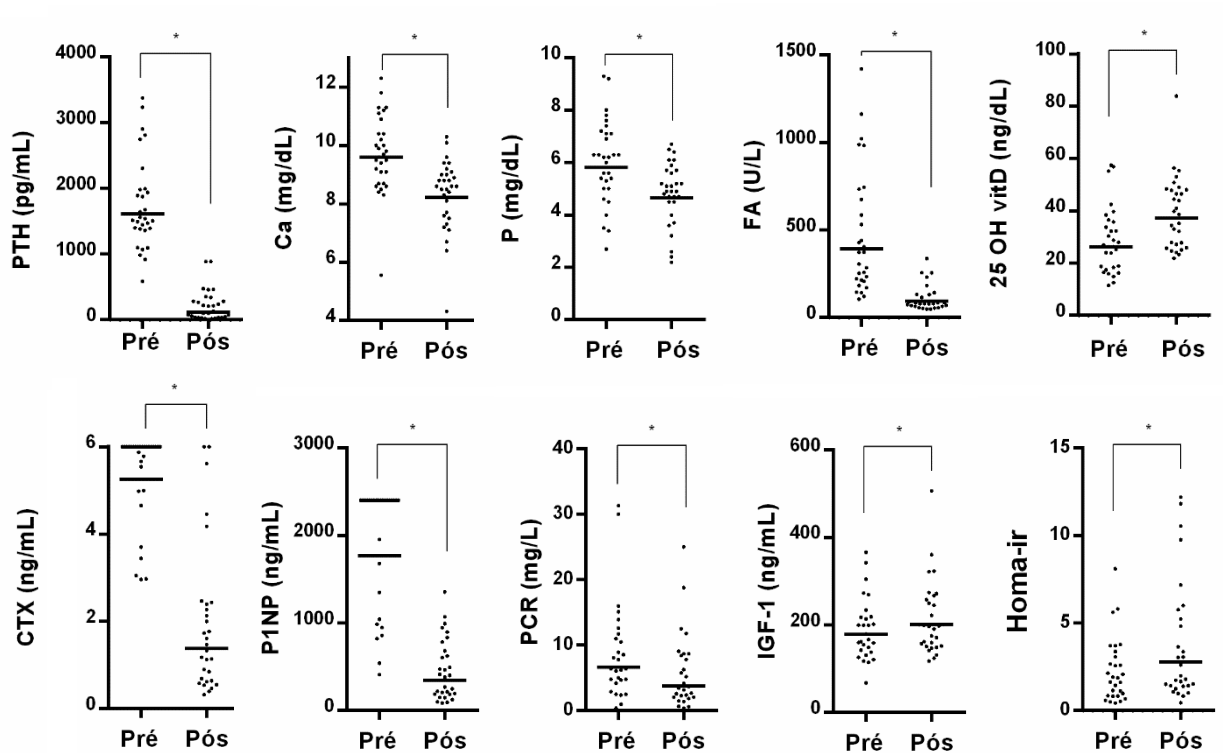
Com relação aos parâmetros relacionados ao DMO-DRC, 7 (23%) pacientes apresentavam hipercalcemia, enquanto a hiperfosfatemia estava presente em 25 (83%). Três pacientes (10%) apresentavam deficiência de 25-vitamina D (< 15 ng/ml), 15 (50%) insuficiência (15-30 ng/ml) e 12 (40%) suficiência (> 30 ng/ml). Os parâmetros bioquímicos estão detalhados na tabela 6 e figura 8.

Após a PTX, houve queda significativa de PTH, fosfatase alcalina, cálcio, fósforo e marcadores de remodelação óssea. Em relação às proteínas ósseas, houve redução de FGF-23, DKK1 e OPN, aumento dos níveis de esclerostina e manutenção dos níveis de RANKL e osteocalcina 6 meses após cirurgia (figura 9). Houve aumento significativo do IMC, do HOMA- Ir, dos níveis de IGF-1 e da hemoglobina glicada, e uma redução significativa dos níveis de leptina. Não encontramos alteração significativa nos níveis de glicemia de jejum, colesterol total ou triglicérides.

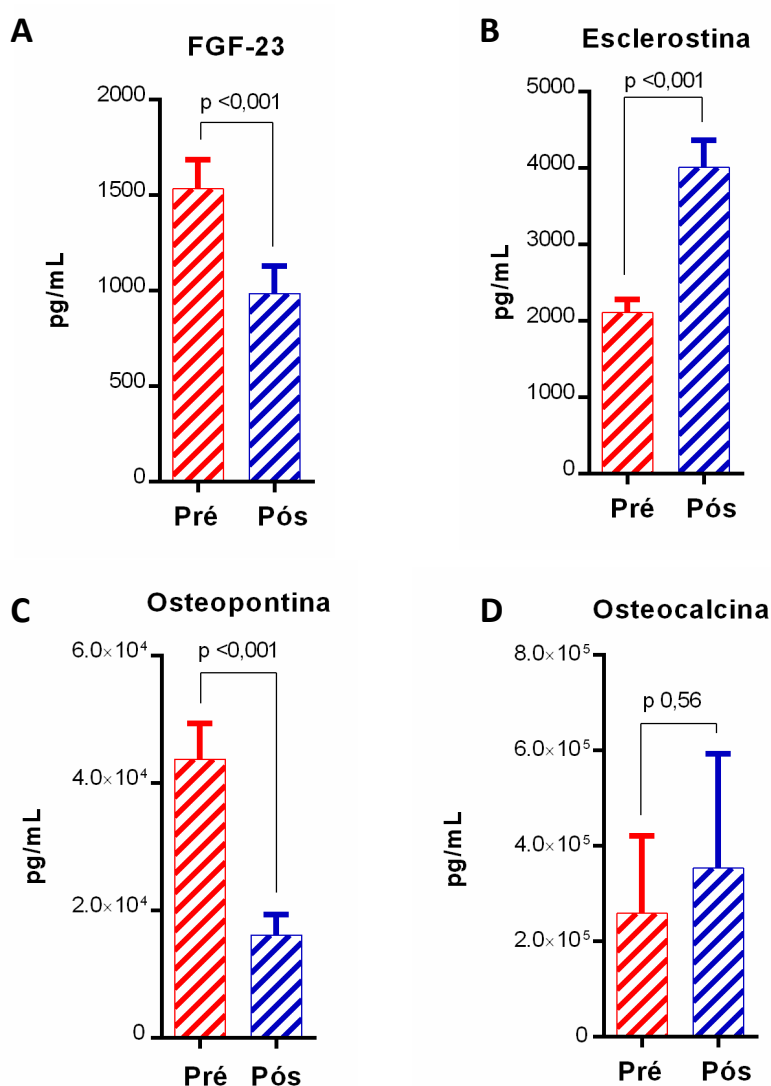
**Tabela 6. Dados laboratoriais relacionados ao metabolismo ósseo - *baseline* e 6 meses após PTX (n = 30)**

	Pré-PTX	Pós-PTX	p
Cálcio sérico, mg/dL	9,6 (8,7-10,5)	8,6 (7,5-9,0)	<b>0,002</b>
Fósforo sérico, mg/dL	6,0 ± 1,6	4,8 ± 1,1	<b>0,0001</b>
Fosfatase alcalina, U/L	373 (212-736)	83 (65-131)	<b>0,0001</b>
25(OH)D, ng/mL	27 (18-36)	39 (28-48)	<b>0,002</b>
PTH intacto, pg/mL	1.526 (1.380-1.959)	119 (36-297)	<b>0,0001</b>
FGF-23, pg/mL	1.451 (1.030-2.035)	799 (184 – 1.667)	<b>0,001</b>
DKK1, pg/mL	1.396 ± 541	1.003 ± 337	<b>0,001</b>
Esclerostina, ng/mL	2,16 (1,18-2,64)	4,15 (2,25 – 5,58)	<b>0,01</b>
CTX, ng/mL	6,0 (5-6)	1,4 (0,6-2,4)	<b>0,01</b>
P1NP, ng/mL	2.400 (1.262-2.400)	392 (189-707)	<b>0,01</b>
Osteocalcina, ng/mL	89 (63 - 133)	106 (55 - 150)	0,56
Osteopontina, ng/mL	37,8 (17 - 68)	12,5 (3,7 - 21)	<b>0,0001</b>
RANKL, pg/mL	14,8 (6,1-35)	18,3 (6,7 -32)	0,17
Osteoprotegerina, pg/mL	789 (642 - 1092)	739 (469 - 928)	<b>0,02</b>

PTX: paratireoidectomia; 25(OH)D: 25 hidroxivitamina D, PTH: paratormonio, FGF-23: fator de crescimento dos fibroblastos-23, DDK1: dickkopf related protein 1; CTX: telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo 1, P1NP: Propeptídeo aminoterminal do procolágeno tipo; RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B. Dados expressos em média±desvio-padrão ou mediana (IIQ)



**Figura 8.** Parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo ósseo e à resistência insulínica - *baseline* e 6 meses após PTX (n = 30) \* p < 0,05. . Dados expressos em valores individuais e mediana.



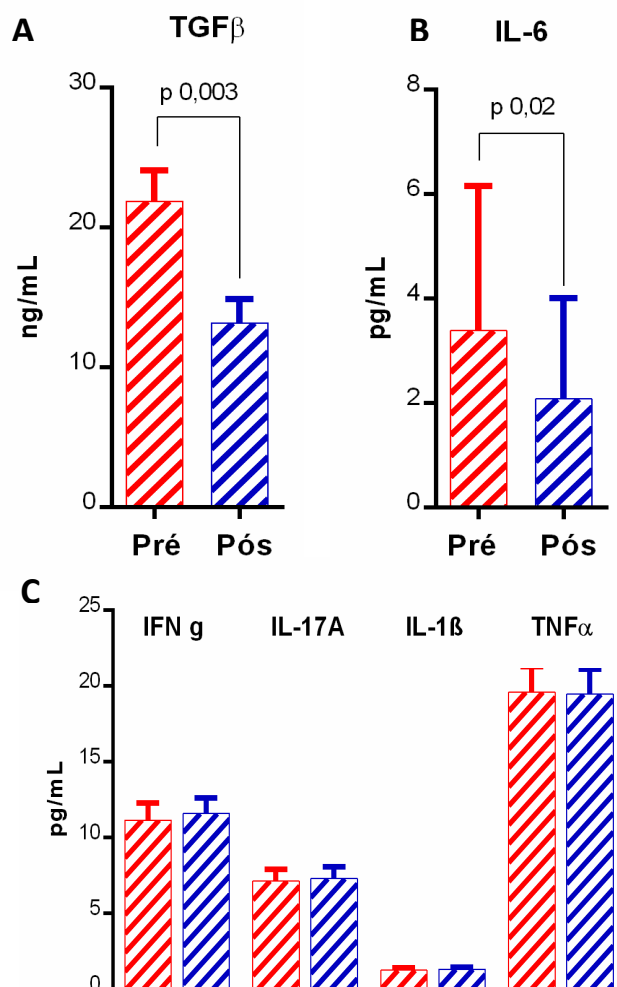
**Figura 9.** Avaliação laboratorial de proteínas ósseas antes e após PTX (n=30) **A.** FGF-23 (pg/mL) **B.** Esclerostina (pg/mL) **C.** Osteopontina (pg/mL) **D.** Osteocalcina (pg/mL)

Os níveis circulantes de irisina e FGF-21 não se alteraram na fase pós-PTX, mas houve aumento dos níveis sanguíneos de miostatina e redução significativa do TGF- $\beta$ . Com relação à dosagem de marcadores inflamatórios, houve redução de proteína C reativa e dos níveis de IL-6, sem mudança nos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-17A e TNF- $\alpha$  (tabelas 5 e 7 e figura 10).

**Tabela 7. Dados laboratoriais relacionados ao metabolismo muscular e inflamação – pré-PTX e 6 meses após PTX (n = 30)**

	Pré-PTX	Pós-PTX	p
Miostatina, pg/mL	519 (271-823)	653 (480-1173)	<b>0,02</b>
Irisina, pg/mL	109 (92-156)	128 (92-183)	0,1
FGF-21, pg/mL	447 (67-745)	227 (118-764)	0,7
TGF- $\beta$ , ng/mL	21,8 $\pm$ 12	13 $\pm$ 9	<b>0,003</b>
IFN $\gamma$ , pg/mL	11,1 $\pm$ 6,2	11,6 $\pm$ 5,5	0,47
IL-1 $\beta$ , pg/mL	1,16 (0,8 - 1,6)	1,11 (0,7 - 1,9)	0,62
IL-6, pg/mL	11,4 $\pm$ 25	8,7 $\pm$ 21	<b>0,02</b>
IL-17A, pg/mL	7 (3,7 - 10,4)	7 (3,9 - 10,5)	0,76
TNF- $\alpha$ , pg/ml	18 (13-23)	17 (12-24)	0,96

PTX: paratireoidectomia; FGF-21: fator de crescimento dos fibroblastos -21; TGF- $\beta$ : fator de transformação do crescimento beta; IFN  $\gamma$ : interferon gama; IL: interleucina; TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa. Dados expressos em média $\pm$ desvio-padrão ou mediana (IIQ)



**Figura 10.** Avaliação laboratorial dos níveis circulantes de marcadores de inflamação antes e após PTX (n=30) **A.** TGF- $\beta$  (ng/mL) **B.** IL-6 (pg/mL) **C.** IFN  $\gamma$ , IL-17A, IL1  $\beta$ , TNF- $\alpha$  (pg/mL)



## 4.2. Avaliação funcional

Todos os pacientes tinham rastreio positivo para sarcopenia pelo SARC-F. O teste de força de preensão manual com *Handgrip* mostrou perda de força de membro superior direito em 12 participantes, e em membro superior esquerdo em 13 participantes. Após a PTX, a perda de força permaneceu apenas em 4 participantes no membro superior direito ( $p = 0,034$ ) e em 12 participantes no membro superior esquerdo ( $p = 0,99$ ). A qualidade muscular, indicada pelos valores do *Handgrip* corrigidos pela massa muscular daquele membro, melhorou nos dois braços. Não houve relação entre variação no ganho de força e o tipo de PTX realizada.

Houve melhora da performance, com aumento de números de passos após PTX avaliados pelo acelerômetro, além de melhora no desempenho nos testes TUG e STS. Não houve diferença na avaliação de tempo diário de AFMV de acordo com dados de acelerometria ou de GER pela calorimetria após o procedimento cirúrgico.

**Tabela 8. Avaliação funcional e metabólica antes e após PTX (n=26)**

Questionário	Pré-PTX	Pós-PTX	p
<b>SARC F</b>			
Força	2 (1 – 2)	1 (0 – 2)	<b>&lt;0,0001</b>
Ajuda para caminhar	1 (1 – 1)	0 (0 – 1)	<b>&lt;0,0001</b>
Levantar da Cadeira	1 (1 – 2)	1 (0 – 1)	<b>&lt;0,0001</b>
Subir Escadas	1 (1 – 2)	1 (0 – 1)	<b>&lt;0,0001</b>
Quedas	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0,317
<b>Acelerômetro</b>			
Número de passos	5.221 ± 3.578	7.245 ± 3.370	<b>0,031</b>
AFMV, min/dia	7,50 (6,53 – 13,35)	9,83 (11,16 – 24,60)	0,096
Sedentário, min/dia	584 (555 – 718)	541 (526 – 679)	0,443
<b>Testes</b>			
Handgrip/massa			
apendicular D, kg/kg	9,86 ± 4	11,7 ± 3	<b>0,01</b>
TUG, seg	10 (8 – 1.25)	8 (7 – 9)	<b>0,001</b>
STS, n	8,8 ± 3,79	11 ± 2,66	<b>0,01</b>
<b>Gasto energético</b>			
Kcal/dia	1.675 (1.441 – 1.961)	1.540 (1.380 – 2.174)	0,69

AFMV: atividade física moderada e vigorosa; TUG: timed-up-and-go; STS: sit to stand to sit; min: minutos; seg: segundos. Dados expressos em média±desvio-padrão ou mediana (IIQ)

### 4.3. Composição corporal basal e após 6 meses da PTX

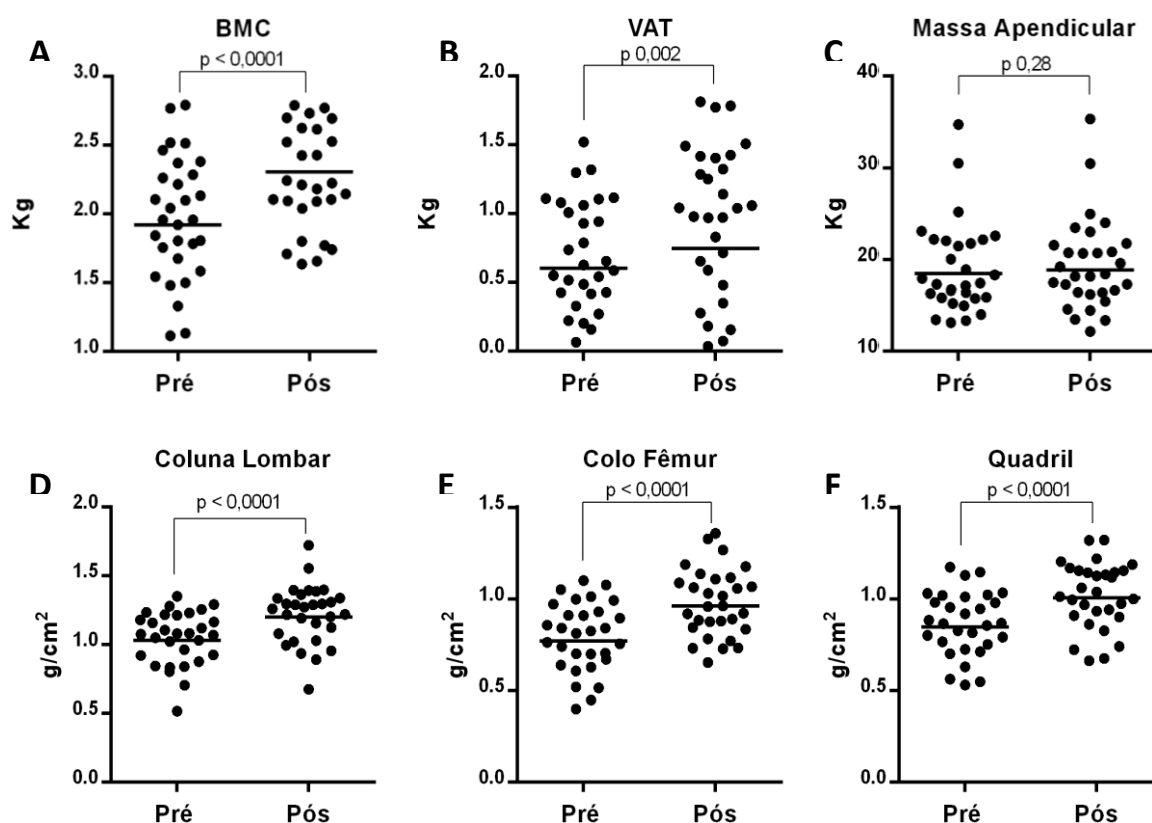
Os valores de DMO avaliada por DXA antes e após PTX estão dispostos na tabela 9 e figura 11. Na avaliação inicial, oito pacientes (26%) apresentaram baixo índice de massa apendicular e/ou massa apendicular total reduzida. Seis destes mantiveram-se com massa muscular reduzida após 6 meses da cirurgia ( $p = 0,5$ ).

Sete pacientes (23%) apresentavam T-escore  $\leq -2,5$  e 14 pacientes (46%) T- escore entre -1,1 e -2,4 em pelo menos um sítio ósseo. Houve ganho significativo de massa óssea em coluna lombar, fêmur (conforme demonstrado na figura 11 e tabela 9) e corpo total. Além do ganho de massa óssea, houve aumento significativo de massa gorda e percentual de gordura, às custas de ganho de tecido adiposo visceral, sem impacto sobre a massa apendicular.

**Tabela 9. Parâmetros relacionados à composição corporal e densidade mineral óssea avaliados por DXA antes e após a paratireoidectomia (n = 30)**

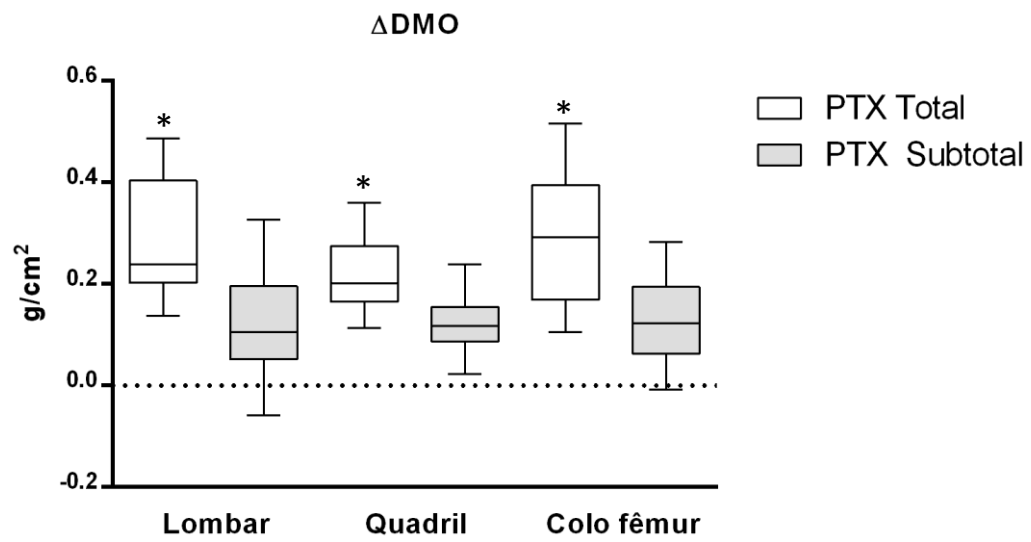
DMO	Pré-PTX	Pós-PTX	p
L1-L4, g/cm <sup>2</sup>	1,05 ± 0,19	1,22 ± 0,21	<0,001
Quadril total D, g/cm <sup>2</sup>	0,86 ± 0,17	1,02 ± 0,17	<0,001
Colo do fêmur D, g/cm <sup>2</sup>	0,79 ± 0,18	0,97 ± 0,18	<0,001
DMO normal (T > -1 DP)	9 (5 M; 4H)	16 (8 M; 8H)	
Osteopenia (T -1,1 – 2,4)	14 (7 M; 7 H)	12 (9 M; 3H)	0,002
Osteoporose (T ≤ -2,5 DP)	7 (6 M; 1H)	2 (1M; 1 H)	
<b>Composição corporal</b>			
BMC, g	1.958 (1.654 – 2.309)	2.236 (2.080 – 2.696)	<0,001
Massa magra, g	40.375 (37.717 – 48.213)	40.091 (37.552– 46.688)	0,17
Massa de gordura, g	23.521 ± 8.88	26.196 ± 9.34	0,001
Percentagem de gordura, %	34,1 ± 10,8	36,8 ± 9,5	0,001
IME, kg/m <sup>2</sup>	7,08 ± 1,2	7,22 ± 1,1	0,16
Massa apendicular total, g	17.397 (15.828-22.101)	18.312 (16.346-21.617)	0,28
Tecido adiposo visceral, g	753 ± 457	1.003 ± 556	0,002

DMO: densidade mineral óssea; BMC: conteúdo mineral ósseo; IME: Índice muscular esquelético; M: mulheres; H: homens. Dados expressos em média±desvio-padrão ou mediana (IIQ)

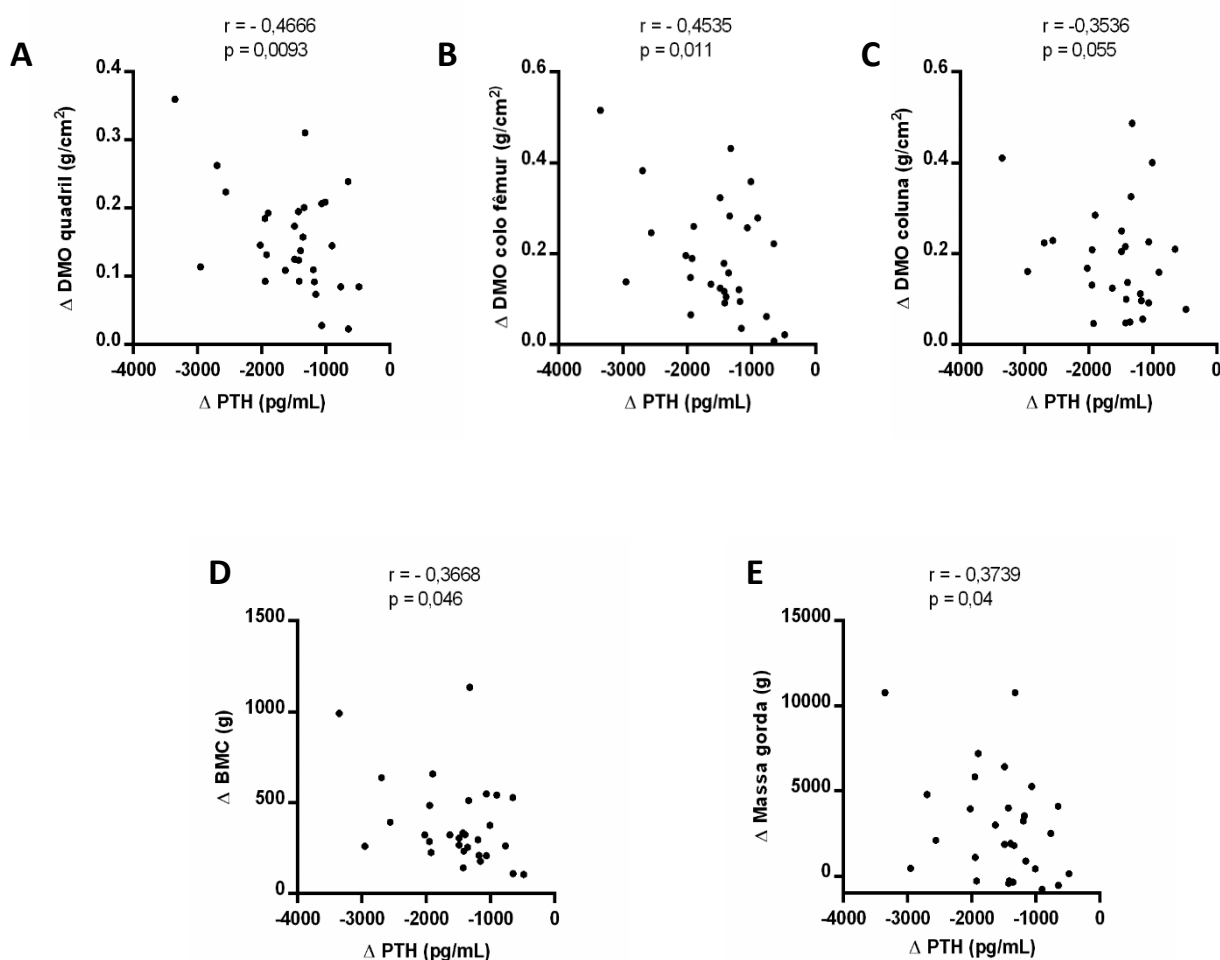


**Figura 11** . Avaliação da parâmetros da composição corporal e densidade mineral óssea avaliada por DXA antes e após PTX (n=30) **A.** Conteúdo mineral ósseo (kg) **B.** Tecido adiposo visceral - VAT (kg) **C.** Massa apendicular (kg) **D.** DMO coluna (g/cm<sup>2</sup>) **E.** DMO quadril (g/cm<sup>2</sup>) **F.** DMO colo fêmur (g/cm<sup>2</sup>). Dados expressos em valores individuais e mediana.

Houve ganho significativamente maior de densidade mineral óssea em todos os sítios avaliados nos pacientes submetidos à PTX total em relação à PTX subtotal (figura 12). A variação dos níveis de PTH se correlacionou com ganho de massa óssea ( $r = -0,36$ ,  $p = 0,04$ ) e de densidade mineral óssea. Houve também correlação negativa entre queda dos níveis de PTH e ganho de massa gorda ( $r = -0,37$ ,  $p = 0,04$ ) conforme demonstrado na figura 13.



**Figura 12 .** Variação da densidade mineral óssea ( $\Delta$  DMO) avaliada por DXA de coluna lombar, quadril e colo do fêmur de acordo com tipo de PTX. \*  $p < 0,01$



**Figura 13** . Correlações entre a variação de parâmetros avaliados pela DXA e variação dos níveis de PTH 6 meses após a PTX. **A**. DMO quadril (g/cm<sup>2</sup>) **B**. DMO colo do fêmur (g/cm<sup>2</sup>) **C**. DMO coluna (g/cm<sup>2</sup>) **D**. Conteúdo mineral ósseo (g) **E**. Massa gorda (g)

#### 4.4. Avaliação Histológica Basal e após 6 meses da PTX

##### 4.4.1. Expressão gênica

Conforme descrito nas tabelas 10 e 11 e figura 14, no *baseline*, encontramos aumento da expressão gênica de RANKL ( $p = 0,002$ ), IL-17A ( $p = 0,03$ ) e IL1  $\beta$  ( $p = 0,01$ ), tendência a aumento da expressão de FGF21 (6x,  $p = 0,06$ ) e redução da Akt ( $p = 0,058$ ) em relação aos controles, sem mudança na fase pós-PTX. Por outro lado, a expressão de FNDC5, proteína transmembrana precursora da irisina, estava reduzida antes da PTX (0,31,  $p = 0,03$ ) comparada aos pacientes saudáveis, e aumentou significativamente após a PTX, assim como a expressão

da atrogina ( $p = 0,03$ ). A expressão de FoxO3 estava reduzida em relação aos controles, e não houve diferença significativa em relação à expressão de IGF-1, VDR, miostatina, SPP1, FoxO1, TNF- $\alpha$ , IL-6, RANK, klotho ou FGF-23 no *baseline* e na fase pós-PTX.

**Tabela 10. Resultados de expressão gênica do grupo pré PTX comparado com o grupo controle**

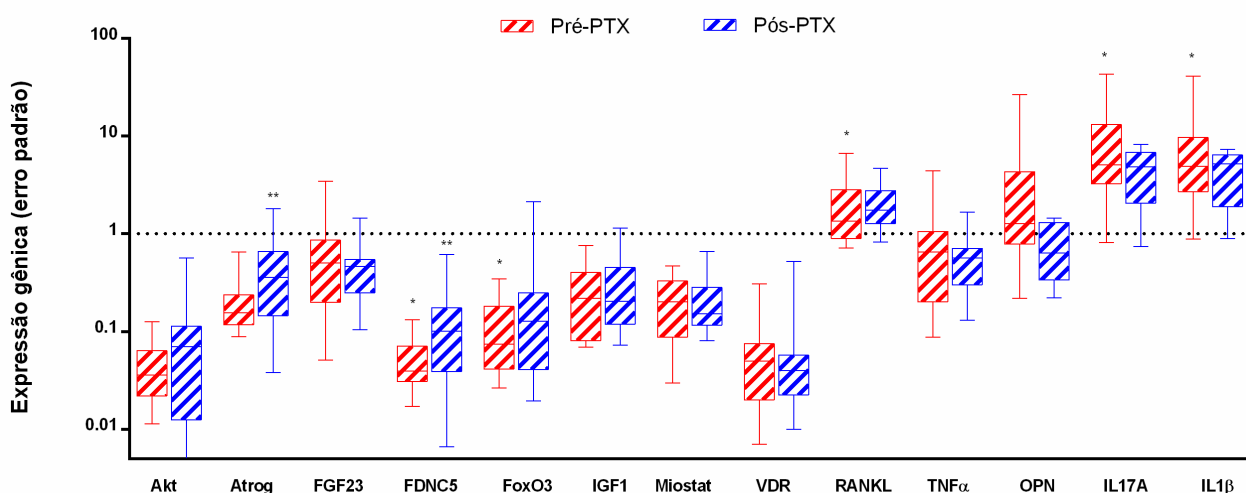
	Expressão Pré-PTX	p
GAPDH	1	
Miostatina	1,09 (0,29 - 3,24)	0,88
FNDC5	0,31 (0,13 -0,6)	<b>0,03</b>
FGF-21	6,10 (1,62 -17,1)	0,06
FGF-23	3,15 (0,65 – 12,9)	0,22
RANK	5,47 (1,4 – 21,1)	0,13
RANKL	16,8 (4,59 -42-2)	<b>0,002</b>
SPP1	2,32 (0,29 – 17,1)-	0,23
IL-17A	4,86 (0,78 – 26,8)	<b>0,03</b>
IL-1 $\beta$	6,46 (1,14 – 33)	<b>0,01</b>
TNF- $\alpha$	3,83 (0,93 – 10,5)	0,13
Akt	0,29 (0,11 -0,6)	0,05
Atrogina	1,19 (0,25 – 4,6)	0,74
FoxO1	1,65 (0,5 – 3,5)	0,42
FoxO3	0,11 (0,03 – 0,25)	<b>0,01</b>
IGF-1	1,24 (0,33 - 3,2)	0,73
Klotho	3,92 (1,10 - 9,2)	0,10
VDR	1,59 (1,35 – 4,9)	0,58

GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. Dados expressos em mediana (IIQ)

**Tabela 11. Comparação dos resultados de expressão gênica dos grupos pré e pós-PTX**

Exp relativa/GAPDH	Pré-PTX	Pós-PTX	p
Miostatina	0,20 (0,08-0,29)	0,15 (0,11-0,27)	0,52
FNDC5	0,03 (0,02-0,05)	0,08 (0,04-0,14)	<b>0,01</b>
FGF-21	0,33 (0,16-0,74)	0,45 (0,28-0,61)	0,87
FGF-23	0,41 (0,16-0,66)	0,46 (0,24-0,53)	0,48
RANK	0,83 (0,29-1,52)	0,99 (0,49-1,71)	0,62
RANKL	1,12 (0,84-2,0)	1,69 (1,20- 2,29)	0,27
SPP1	1,27 (0,78-4,33)	0,63 (0,33-1,30)	0,08
IL-17A	5,21 (3,48-14,1)	4,84 (2,04-6,81)	0,15
IL-1 $\beta$	4,94 (2,79-11,4)	5,19 (1,88-6,39)	0,30
Akt	0,03 (0,02-0,04)	0,06 (0,01-0,1)	0,14
Atrogina	0,14 (0,11-0,19)	0,29 (0,09-0,44)	<b>0,03</b>
FoxO1	0,18 (0,13-0,30)	0,24 (0,13-0,35)	0,38
FoxO3	0,07 (0,04-0,18)	0,12 (0,04-0,24)	0,12
IGF-1	0,16 (0,08-0,30)	0,15 (0,11-0,39)	0,97
Klotho	0,39 (0,18-0,68)	0,46 (0,39-0,62)	0,79
VDR	0,06 (0,02-0,06)	0,04 (0,02-0,05)	0,53

GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. Dados expressos em mediana (IIQ)



**Figura 14.** Comparação dos resultados de expressão gênica no baseline e após PTX em relação ao grupo controle. \*  $p < 0,05$  x controles \*\*  $p < 0,05$  x pré-PTX

#### 4.4.2. Imuno-histoquímica

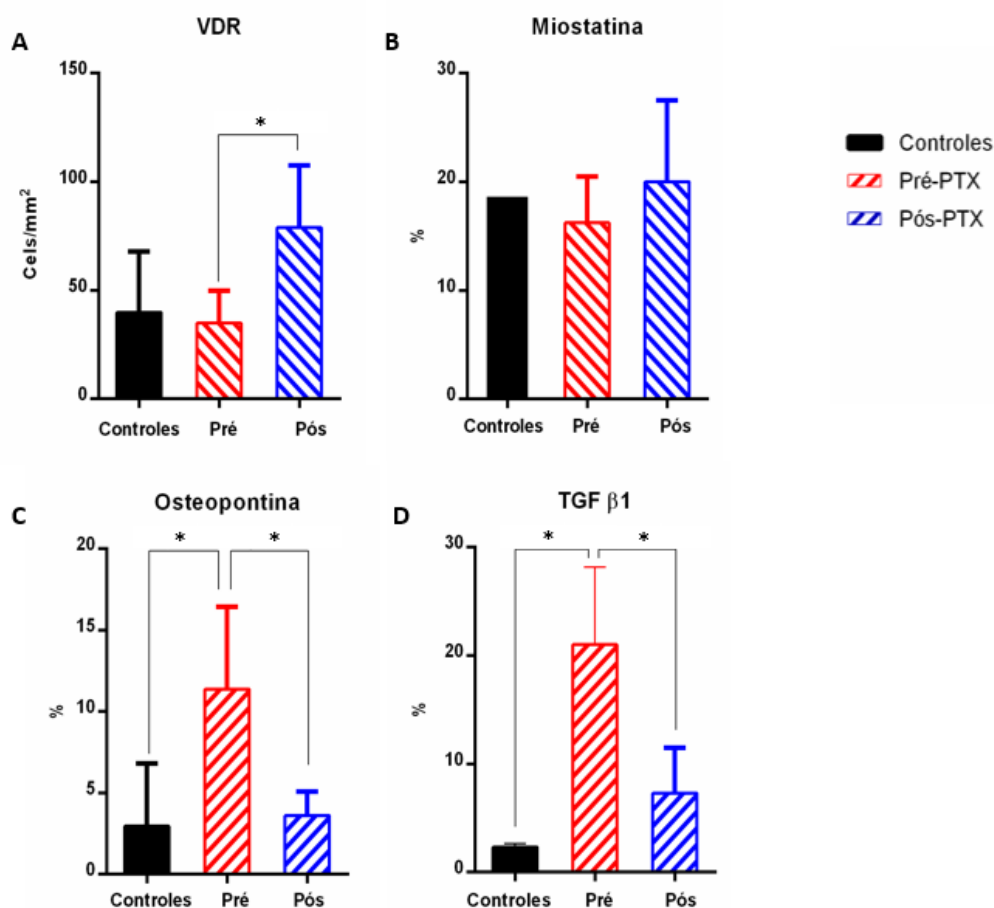
Os pacientes com HPTS apresentaram aumento significativo da expressão muscular de TGF- $\beta$  e OPN em relação aos pacientes saudáveis. Não houve diferença na expressão de atrogina, VDR e de miostatina no *baseline* em relação aos controles.

Após a PTX, houve uma redução significativa da expressão de TGF- $\beta$  e de OPN muscular, além de um aumento na expressão de VDR, sem mudança na expressão de miostatina e atrogina (tabela 12 e figuras 15 - 18).

**Tabela 12.** Expressão proteica muscular através de imunohistoquímica no grupo controle (n=7) e casos pré- e pós-PTX (n=20)

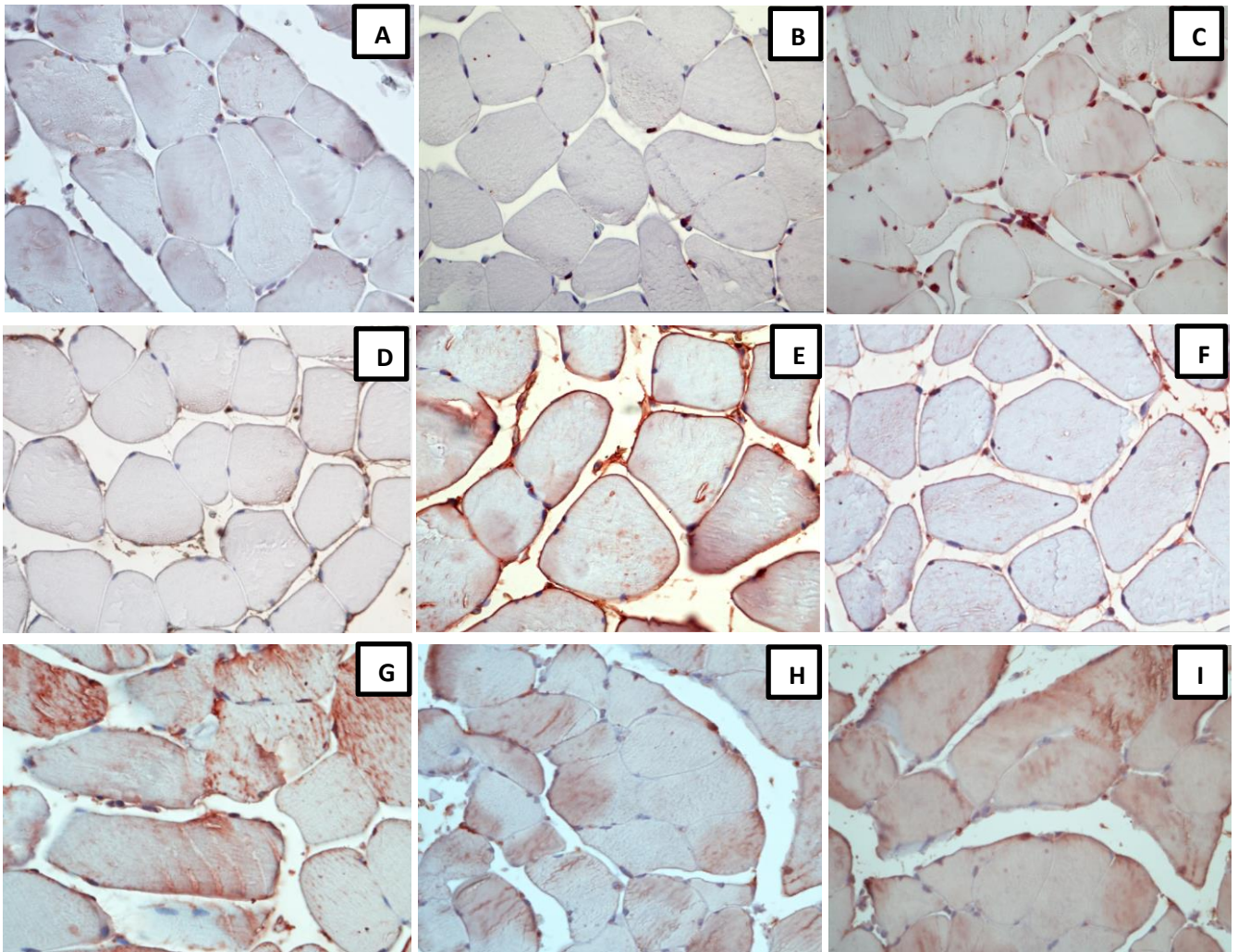
	Controles	Pré-PTX	Pós-PTX	p
VDR (célis/mm <sup>2</sup> )	39±28	34±14	78±28*	<b>0,002</b>
Miostatina (%)	18±2	16±4	20±7	0,12
TGF- $\beta$ (%)	2,3 (1,4 - 2,6)	21 (16 - 28)*	7 (6-11)	<b>0,002</b>
OPN (%)	2,9 (1 - 6,8)	11 (9 - 16) *	3 (1-5)	<b>0,007</b>
Atrogina (%)	6,39 (1,5 - 15)	3,08 (1,89 - 7,37)	2,91 (1,49 - 5,37)	0,39

VDR: receptor de vitamina D; TGF-  $\beta$ : fator de transformação do crescimento; OPN: osteopontina. \*p<0,05 (x controles); % = % de área marcada pela área total de tecido avaliada; Dados expressos em média±desvio-padrão ou mediana (IIQ)

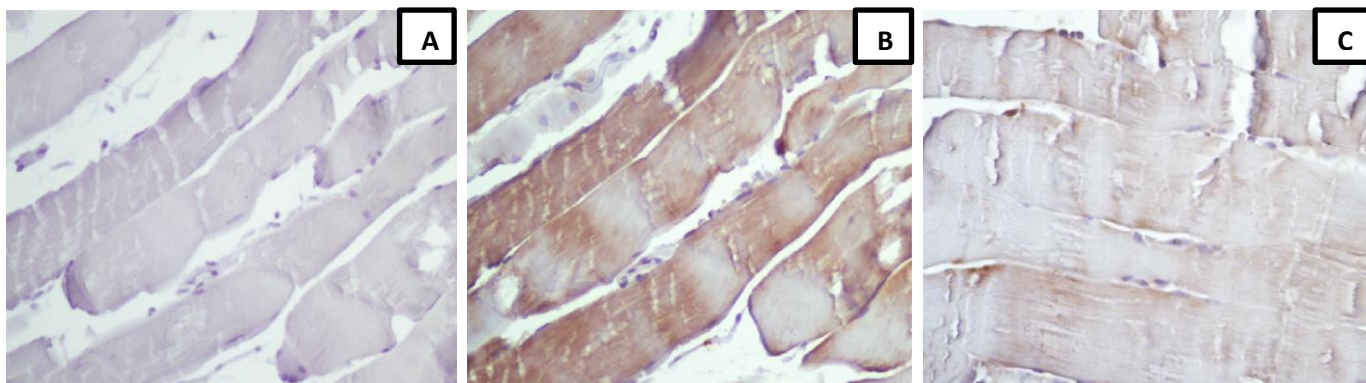


**Figura 15.** Avaliação da expressão de proteínas no tecido muscular pela técnica de imuno-histoquímica no grupo controle (n=7), antes e após PTX (n=20) **A.** VDR **B.** Miostatina **C.** Osteopontina **D.** TGF-  $\beta$  \*p<0,05

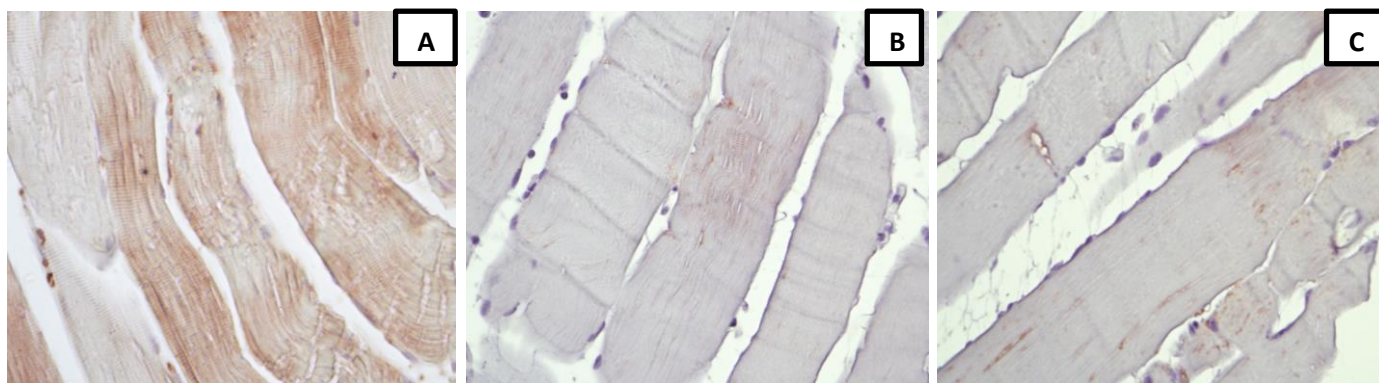




**Figura 16.** Padrão da expressão proteica do VDR (A,B,C), TGF- $\beta$  (D,E,F) e miostatina (G,H,I) pela imunohistoquímica em biópsia de músculo de pacientes saudáveis (A,D,G) e casos pré- (B,E,H) e pós-PTX (C,F,I). Aumento de 400x



**Figura 17.** Padrão da expressão proteica da osteopontina pela imuno-histoquímica em biópsia de músculo de pacientes saudáveis (A) e caso pré- (B) e pós-PTX (C). Aumento de 400x



**Figura 18.** Padrão da expressão proteica da atrogina pela imuno-histoquímica em biópsia de músculo de pacientes saudáveis (A) e caso pré- (B) e pós-PTX (C). Aumento de 400x

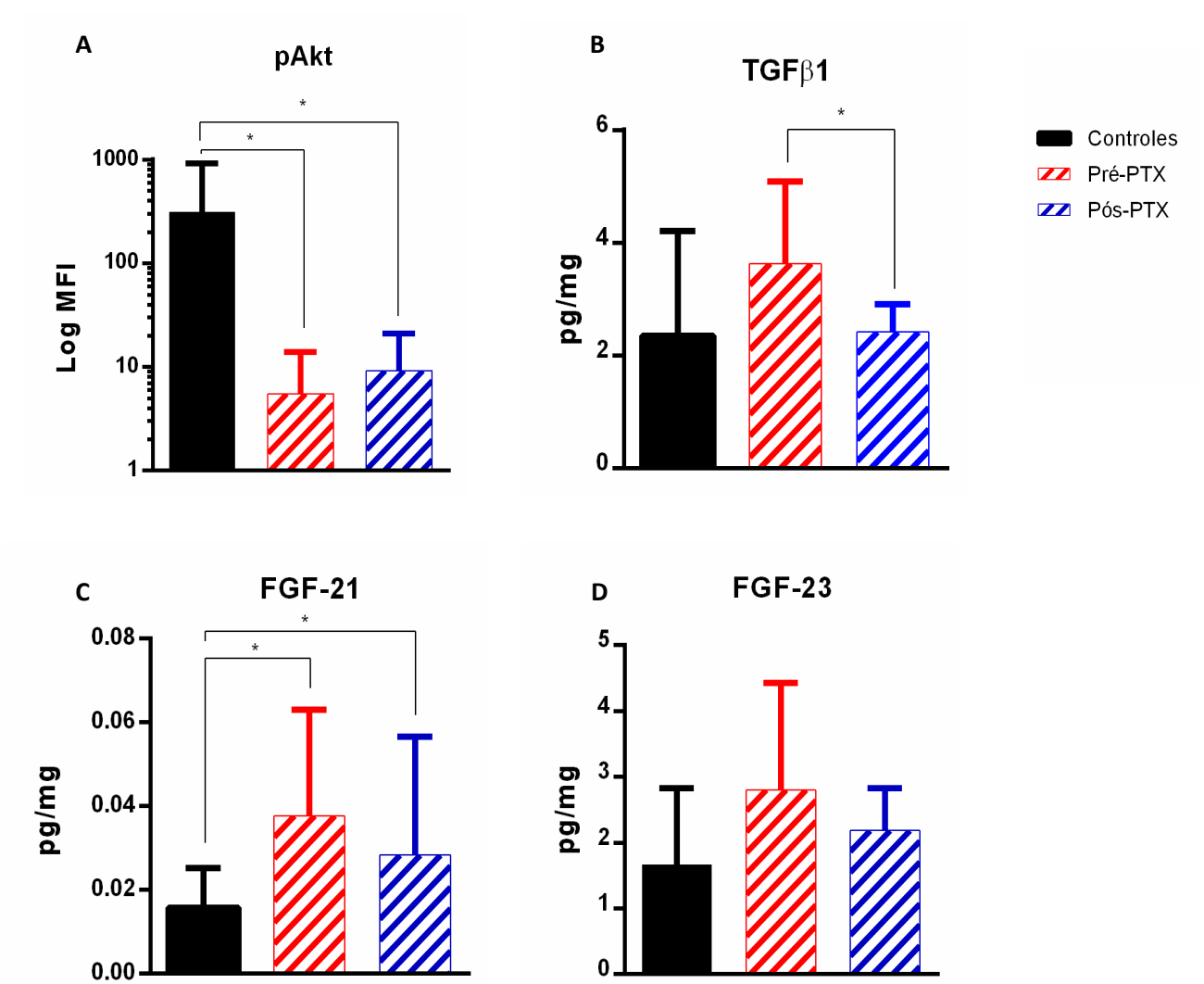
#### 4.4.3. Conteúdo proteico por multiplex

O conteúdo proteico avaliado pela técnica de multiplex mostrou aumento da concentração muscular de FGF-21, OPN e osteocalcina, e redução da pAkt em relação ao grupo controle (tabela 13 e figuras 19, 20 e 21). Na avaliação dos pacientes com HPTS, a PTX promoveu aumento significativo na concentração muscular de irisina, com variação superior no grupo submetido à PTX total em relação aos pacientes submetidos à subtotal (cerca de 12x,  $p=0,01$ ). Também houve aumento de pAkt e redução das concentrações de esclerostina, OPN, osteocalcina, TGF- $\beta$ , RANKL, IL-17A, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no tecido muscular após a PTX (tabela 13).

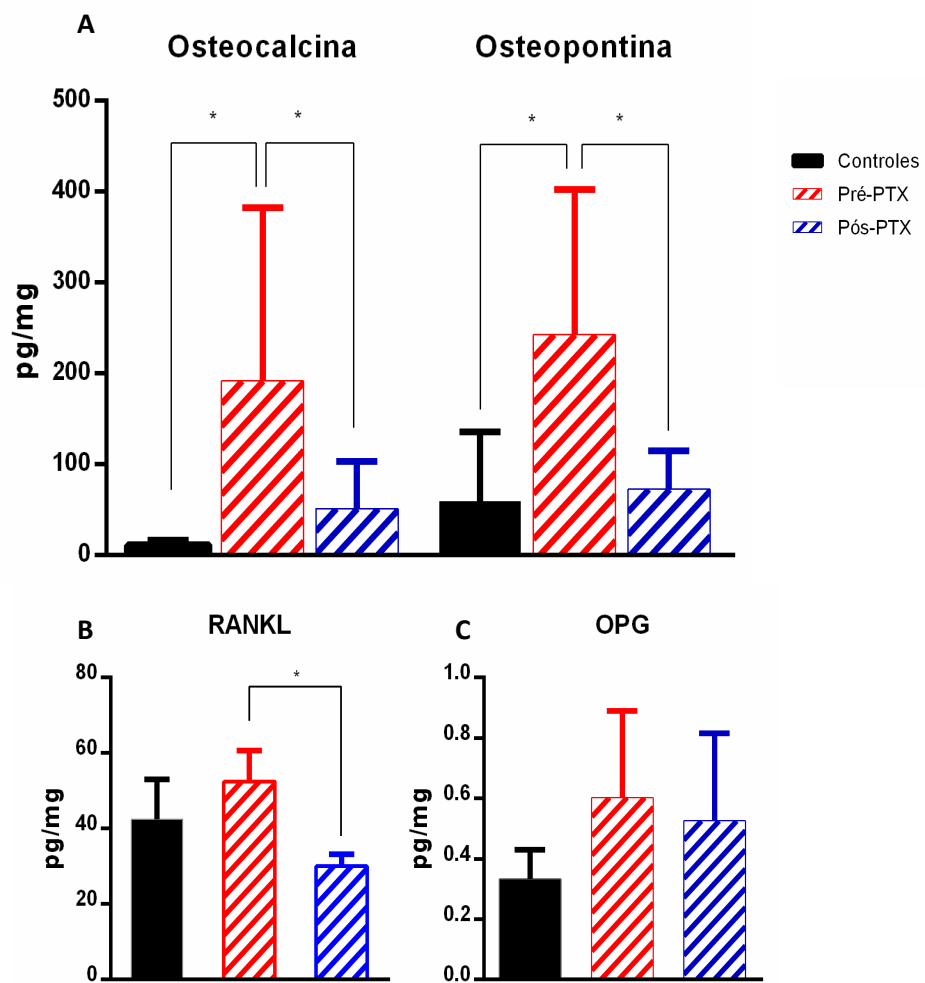
**Tabela 13.** Concentração proteica muscular através de multiplex no grupo controle (n=7) e casos pré- e pós-PTX (n=20)

	Controles	Pré-PTX	Pós-PTX	p
<b>pg/mg proteína total</b>				
TGF- $\beta$	2,5 (1,6-3,2)	2,84 (1,9-5,6)	2,72 (2,1-3)	<b>0,04</b>
Irisina	33 (26-35)	30 (22-48)	35 (29-152)	<b>0,02</b>
Miostatina	15 (12-20)	15 (12-24)	13,4 (12-27)	0,91
FGF-21	0,01 (0,01-0,02)	0,03 (0,02-0,06)*	0,02 (0,02-0,05)*	0,71
FGF-23	1,78 (1,23 - 2,45)	2,3 (1,3 - 4,1)	1,8 (1,5 - 2,4)	0,10
Esclerostina	2,06 (1,54 – 2,72)	2,01 (1,58 – 5,28)	1,82 (1,21 – 2,26)	<b>0,008</b>
DKK1	0,34 (0,11 – 0,43)	0,39 (0,27 – 1,07)	0,37 (0,18 – 0,72)	0,82
OPN	47,4 (35 - 119)	179 (103 - 505)*	54 (37 - 142)	<b>0,01</b>
OPG	0,34 (0,25 - 0,42)	0,43 (0,3 - 0,74)	0,35 (0,28 - 0,84)	0,83
Osteocalcina	9,99 (8,40 – 18,1)	262 (44 – 602)*	37 (22 – 72)	<b>0,01</b>
GM-CSF	1,07 (0,76 – 2,51)	2,14 (0,92 - 4,81)	1,04 (0,72 – 2,48)	0,05
RANKL	42 $\pm$ 25	52 $\pm$ 36	30 $\pm$ 13	<b>0,03</b>
IFN $\gamma$	0,22 (0,14-0,34)	0,3 (0,16-0,55)	0,24 (0,13-0,34)	0,12
IL1 $\beta$	0,32 (0,2-0,47)	0,2 (0,15-1,2)	0,18 (0,13-0,24)	<b>0,001</b>
IL6	0,01 (0,004-0,01)	0,01(0,007-0,02)	0,01 (0,006-0,01)	0,33
IL-17A	0,16 (0,14-0,27)	0,27 (0,16-1,66)	0,20 (0,11-0,52)	<b>0,03</b>
TNF- $\alpha$	0,05 (0,03-0,06)	0,04 (0,03-0,06)	0,03 (0,02-0,05)	<b>0,04</b>
<b>MFI</b>				
pAkt (Ser473)/tAkt	18,6 (9-764)	1,89 (1,12-5,68)*	4,13 (2,4-14,2)*	<b>0,01</b>

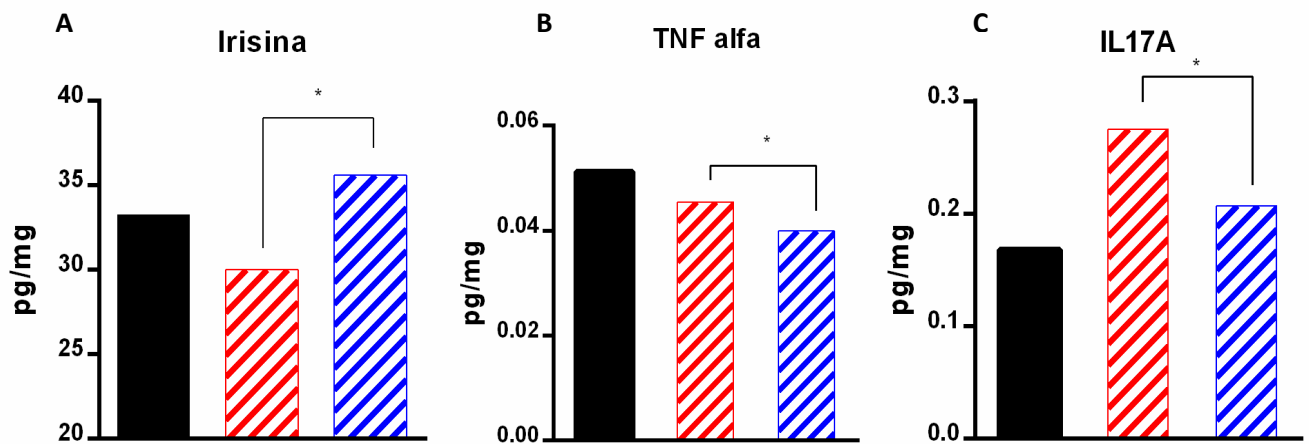
PTX: paratireoidectomia; TGF- $\beta$ : fator de transformação do crescimento beta; FGF: fator de crescimento dos fibroblastos; DKK1: dickkopf related protein 1; OPN: osteopontina; OPG: osteoprotegerina; GM-CSF: fator estimulador de colônia de macrófago; RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B; IFN  $\gamma$ : interferon gama; IL: interleucina; TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa; MFI: media de intensidade de fluorescência. Dados expressos em média $\pm$ desvio-padrão ou mediana (IIQ) \*p<0,05 (x controles);



**Figura 19.** Avaliação da conteúdo proteico no tecido muscular avaliado pela técnica de multiplex no grupo controle (n=7), antes e após PTX (n=20) **A.** pAkt1(Ser473)/tAkt1 (Log MFI) **B.** TGF- β (pg/mg) **C.** FGF-21 (pg/mg) **D.** FGF-23 (pg/mg) \*p<0,05



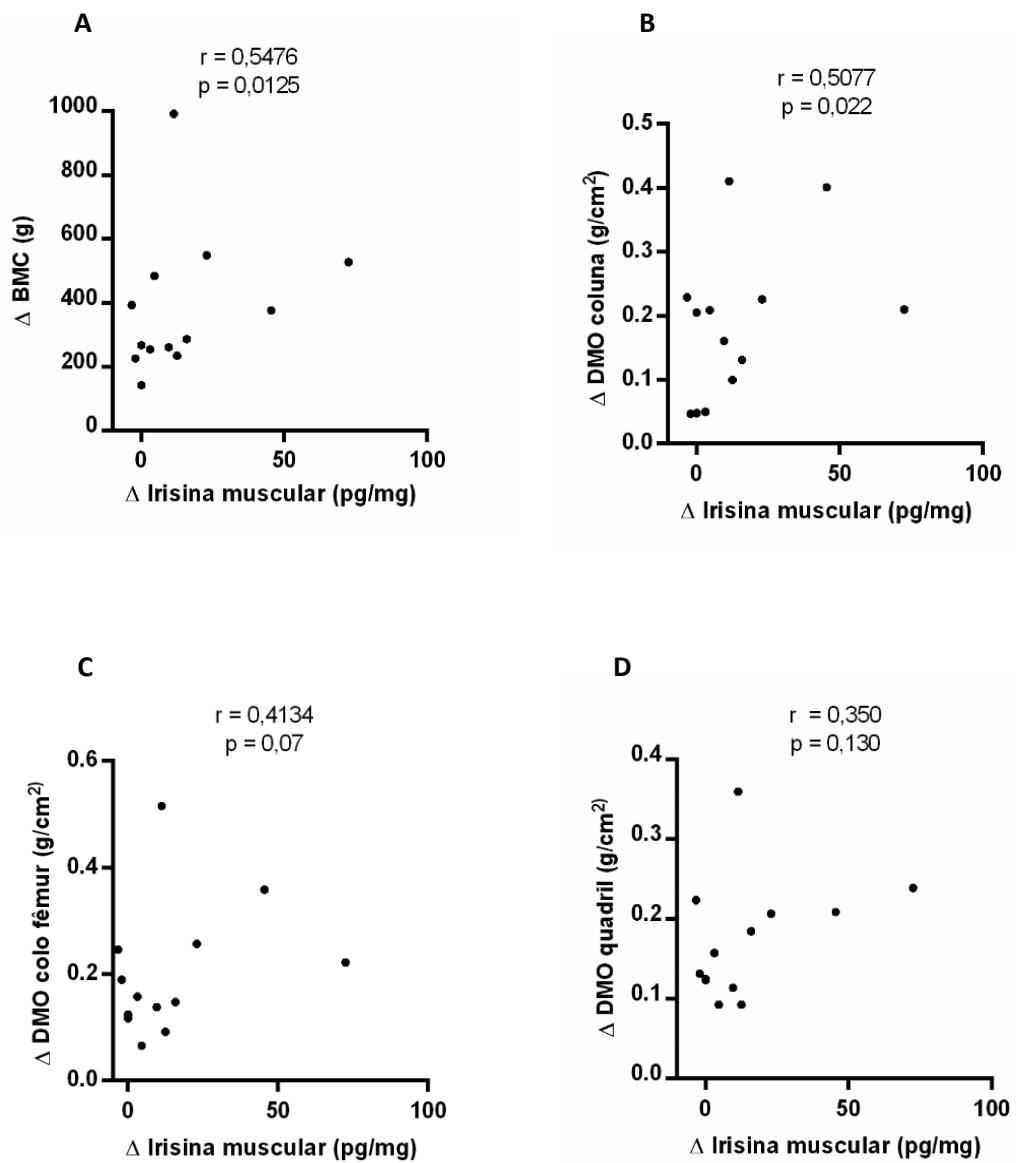
**Figura 20.** Avaliação do conteúdo proteico no tecido muscular avaliado pela técnica de multiplex no grupo controle (n=7), antes e após PTX (n=20) **A.** Osteocalcina e osteopontina (pg/mg) **B.** RANKL (pg/mg) **C.** OPG (pg/mg) \*p<0,05



**Figura 21.** Avaliação do conteúdo proteico no tecido muscular avaliado pela técnica de multiplex no grupo controle (n=7), antes e após PTX (n=20) **A.** Irisina (pg/mg) **B.** TNF alfa (pg/mg) **C.** IL-17A (pg/mg) \*p<0,05

Houve correlação significativa entre o aumento da expressão muscular de irisina com ganho de massa óssea ( $r = 0,547$   $p = 0,01$ ) e densidade mineral óssea da coluna ( $r = 0,507$ ,  $p = 0,02$ ). Houve correlação negativa entre as expressões teciduais de irisina e TGF- $\beta$  ( $r = - 0,446$ ,  $p = 0,04$ ).





**Figura 22.** Correlações entre a variação dos níveis da concentração muscular de irisina ( $\Delta$  irisina) e dos parâmetros de massa óssea avaliados pela DXA 6 meses após a PTX. **A.** Variação Conteúdo mineral ósseo -  $\Delta$ BMC (g) **B.** Variação densidade mineral óssea ( $\Delta$  DMO) coluna (g/cm<sup>2</sup>) **C.**  $\Delta$  DMO colo do fêmur (g/cm<sup>2</sup>) **D.**  $\Delta$  DMO quadril (g/cm<sup>2</sup>)

## **5. DISCUSSÃO**

---

---



## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo investigamos o efeito do HPTS e da PTX sobre o fenótipo muscular de pacientes com DRC em hemodiálise, o que incluiu avaliação funcional, análise de composição corporal e investigação de expressão gênica e proteica do tecido muscular. Nosso objetivo foi avaliar o papel dos níveis excessivos de PTH no desenvolvimento da sarcopenia característica da DRC avançada. O HPTS promoveu alterações histológicas relacionadas à disfunção mitocondrial, à redução do *turnover* proteico muscular e da concentração muscular de irisina. Além do ganho de massa óssea e melhora de funcionalidade nos pacientes, a PTX também gerou alterações em expressão gênica e de proteínas musculares relacionadas a inflamação e fibrose tecidual, apesar de não modificar a massa muscular após 6 meses.

O efeito positivo da PTX sobre força muscular já havia sido demonstrado em estudo com população com hiperparatireoidismo primário e função renal preservada (45, 101). Nossos resultados corroboram a ação benéfica da redução significativa do PTH sobre a funcionalidade e capacidade contrátil da fibra muscular dos pacientes com DRC em diálise, independente do tipo de PTX realizada. Houve melhora da percepção subjetiva, através da aplicação de questionário SARC-F e da avaliação objetiva, através do ganho em força de preensão manual e testes físicos, como TUG e STS. Além disso, houve aumento do número de passos dados por dia na avaliação através da acelerometria. O aumento da força muscular pode estar relacionado a melhora da capacidade do músculo de responder a estímulos neuromotores (102), ou seja, apesar de não haver ganho de massa muscular, o tratamento do HPTS parece promover adaptações neuromusculares facilitando a capacidade de resposta do músculo. Dentre as justificativas para a melhora da qualidade muscular, além da melhora da dor óssea, estão os efeitos sobre a redução de fósforo e o aumento da vitamina D. Há evidências tanto em modelos experimentais (103, 104), quanto em estudos clínicos (105), de efeito negativo da sobrecarga

de fósforo sobre força muscular. Nossos pacientes apresentaram redução significativa da fosfatemia, o que pode ter efeito benéfico sobre a função muscular. Os pacientes também receberam suplementação de colecalciferol, o que gerou aumento nos níveis séricos de 25-OHD, e de calcitriol no pós-operatório. Há evidências experimentais da influência da vitamina D sobre os miócitos, tanto por efeitos genômicos envolvendo a ativação do VDR no núcleo da célula para conduzir a diferenciação e proliferação celular, como por efeitos não-genômicos relacionados ao influxo de cálcio nas células (106). A avaliação tecidual através de imunohistoquímica demonstrou um aumento expressivo de VDR no músculo após a PTX. Embora os estudos clínicos mostrem resultados conflitantes sobre a ação muscular da vitamina D (107-109), há correntes de pesquisa que defendem seu efeito benéfico sobre a performance física, através da restauração de status adequado deste hormônio.

Apesar do ganho de força, os pacientes não apresentaram ganho de massa muscular, o que pode ser resultado de um período curto do seguimento. Outra interpretação deste resultado seria a de que o tratamento do HPTS grave levou a uma estabilização da massa muscular, impedindo a progressão da perda de massa decorrente da manutenção do estado de hipercatabolismo induzido pelo excesso de PTH. No apêndice C, demonstramos a evolução da composição corporal de uma paciente cujo tratamento com PTX foi atrasado, o que gerou uma perda de aproximadamente 10% de sua massa magra apendicular (110). Após a PTX, houve atenuação dessa perda.

Este estado de hipercatabolismo induzido pelo hiperparatireoidismo grave já foi descrito, com aumento do gasto energético basal (111), ativação de tecido adiposo marrom regulador da termogênese (96), e possivelmente perda de massa magra. A massa livre de gordura, da qual faz parte o tecido músculo-esquelético, possui alta atividade metabólica e, por isso, é um componente determinante do metabolismo energético. Estudos que compararam o gasto energético de repouso (GER) de pacientes estáveis com DRC em tratamento conservador

com o de indivíduos saudáveis mostram que o GER desses pacientes encontra-se significativamente reduzido (112). Por outro lado, a presença de comorbidades como doença cardiovascular, inflamação, caquexia, diabetes e diversas condições relacionadas à uremia e ao tratamento dialítico podem contribuir para um aumento do GER nos pacientes com DRC. Por exemplo, acidose metabólica, resistência insulínica e HPTS estão associados a um aumento do catabolismo proteico (113). Cuppari *et al.* (111) demonstraram o efeito do HPTS sobre o GER, avaliado por calorimetria indireta, de pacientes em hemodiálise. O PTH apresentou correlação positiva com o GER dos pacientes em tratamento dialítico, e a análise de regressão múltipla mostrou que, além da massa magra, o PTH foi uma variável determinante para alteração do GER. De acordo com os nossos resultados, não houve mudança no GER após a PTX em nossa população. Entretanto, o efeito do PTH sobre *browning* de tecido adiposo já foi demonstrado em modelo experimental (96), e em alguns pacientes observamos aumento da expressão de tecido adiposo marrom em região cervical através da cintilografia de paratireoides realizada na rotina pré-operatória. Como a imagem não foi repetida no pós-operatório, não conseguimos analisar o impacto da PTX sobre a gordura marrom. Pesquisas futuras podem ser direcionadas para investigar o efeito do PTH sobre tecido adiposo marrom no contexto clínico.

A ação do tratamento do HPTS sobre esqueleto já foi demonstrada (114). Houve uma variação significativa de massa óssea, com ganho de 14% no conteúdo mineral em 6 meses, melhora de DMO em todos os sítios avaliados com redução da proporção de pacientes com diagnóstico de osteoporose. Não houve diferenças entre as variações de ganho de DMO entre os sítios (quadril x coluna); porém, ao comparar o tipo de PTX aos quais os pacientes foram submetidos, notamos um ganho de massa óssea cerca de 90% maior naqueles submetidos à PTX total quando comparados à PTX subtotal. Esse achado ressalta o impacto do controle efetivo do PTH sobre a melhora da massa óssea, uma vez que aqueles submetidos à PTX total atingem níveis de PTH significativamente mais baixos em relação aos submetidos à subtotal

em 6 meses (54 x 231 pg/mL,  $p = 0,02$ ).

Embora não tenha havido um ganho de massa magra apendicular, observamos um aumento expressivo da massa gorda, às custas de gordura visceral, e marcadores de resistência insulínica após a cirurgia. Apesar de os pacientes apresentarem aumento de IMC, os níveis sanguíneos de leptina reduziram significativamente, o que poderia estar associado a uma alteração na regulação do apetite após a PTX. A leptina é um hormônio peptídico conhecidamente produzido pelos adipócitos com capacidade de atuar sobre modulação da saciedade e gasto energético. Além disso, a produção de leptina por adipócitos da medula óssea tem capacidade de atuar sobre osteoblastogênese e regulação da expressão de FGF-23 (115). Uma inter-relação entre leptina e PTH já foi sugerida. Hoang *et al.* observaram que em pacientes com hiperparatireoidismo os níveis séricos de leptina caíram após a PTX, e que a presença de polimorfismos no gene do receptor da leptina se associou ao tamanho aumentado da glândula paratireoide (116). O mesmo grupo identificou a expressão de receptor de leptina em células principais das paratireoides, bem como uma correlação entre secreção do PTH com exposição a níveis aumentados de leptina (117). Portanto, diante de evidências experimentais de existência do eixo PTH-leptina, a remoção das glândulas paratireoides e consequente queda dos níveis de PTH seriam fatores envolvidos na queda dos níveis de leptina no pós-PTX em nossa coorte.

Apesar de haver melhora da dor óssea após a PTX e isso se associar a uma melhor qualidade de vida e aumento de apetite, não parece existir uma razão isolada para o ganho significativo de massa gorda e de gordura visceral nesses pacientes. Como já mencionado, os níveis suprafisiológicos de PTH podem induzir a um estado catabólico, aumentando a demanda energética através do estímulo à atividade do tecido adiposo marrom. Ao reduzir drasticamente os níveis do PTH após PTX, o estímulo sobre metabolismo energético e atividade mitocondrial dos adipócitos reduziria e isso poderia acarretar acúmulo de massa gorda. Fatores relacionados ao *turnover* ósseo alterado também poderiam justificar esse efeito sobre composição corporal.

A fração descarboxilada da osteocalcina, cujos níveis aumentam na circulação no processo de remodelação óssea, tem efeitos endócrinos sobre o metabolismo da glicose e resistência insulínica (118). Tal achado já foi encontrado em estudo prévio (119), que demonstrou uma correlação entre a variação dos níveis de osteocalcina circulante com a melhora de parâmetros nutricionais após a PTX. De acordo com nossos resultados, não houve mudança nos níveis de osteocalcina. Embora não tenhamos realizado a dosagem da fração descarboxilada da osteocalcina, sua redução após a PTX já foi demonstrada em uma análise de 10 casos operados, ocorrendo após a fase de fome óssea (120).

Apesar de não causar repercussão nos níveis circulantes de osteocalcina, a supressão dos níveis de PTH após a cirurgia levou a uma queda dos marcadores de remodelação óssea (CTX e P1NP). Diante da retirada do efeito inibitório do PTH, os níveis de esclerostina aumentaram, enquanto os níveis de OPN, que possui efeitos sobre mineralização e reabsorção óssea mediada pelo PTH (78), acompanharam a redução da taxa de remodelação óssea.

Diferente da esclerostina, o DKK1 (Dickkopf Related Protein 1), outro antagonista da via Wnt, apresentou redução após a PTX. Em modelos experimentais, já foi demonstrado que a inibição da esclerostina promove aumento da expressão de DKK1 (121) e que o bloqueio de DKK1 também é capaz de aumentar a expressão de esclerostina, sugerindo um mecanismo compensatório de feedback negativo, o que pode explicar o motivo de a supressão de DKK1 não gerar uma resposta anabólica efetiva para o tecido ósseo (122). Além disso, essa proteína também tem papel na osteoimunologia, atuando no *crosstalk* entre células de linhagens diferentes na medula óssea. Himburg *et al.* (123) demonstraram que a secreção de DKK1 por células osteoprogenitoras da medula óssea foi capaz de atuar de forma parácrina promovendo regeneração de células da linhagem hematopoiética. Portanto, a redução dos níveis circulantes de DKK1 após a PTX pode ser explicada tanto por uma resposta ao aumento dos níveis

de esclerostina quanto pela atenuação do estresse inflamatório gerado pelo excesso de PTH na medula óssea.

Dentre diversas causas, altos níveis de esclerostina estão associados à doença óssea de baixa remodelação. Embora tenha havido um aumento nos níveis sanguíneos devido à redução do PTH, houve redução na concentração muscular da esclerostina, o que sugere um possível papel negativo desta proteína sobre a função muscular. Não houve mudança em relação à concentração tecidual de DKK1, enquanto os níveis de osteocalcina no tecido muscular apresentaram uma redução significativa, acompanhando a mudança no perfil de remodelação óssea induzida pela PTX.

A análise tecidual através de biópsias permitiu identificar alterações em *turnover* proteico muscular nas fases pré e pós-PTX. De acordo com dados publicados por Verzola *et al* (53), foi realizada análise histológica de tecido muscular de 22 pacientes com DRC estágio 5 e demonstrado que a expressão tecidual de Akt é reduzida, enquanto a IL-6 muscular está aumentada nesses pacientes, atuando como fator preditor da apoptose muscular (53). Nesta mesma população, o mRNA do IGF-1 foi significativamente menor do que nos controles saudáveis. Em nossos pacientes, o hiperparatireoidismo associou-se à redução da expressão gênica da Akt e FoxO3 no baseline. Quando analisada a concentração muscular de Akt fosforilada/total, notamos uma redução da atividade da Akt no baseline, que foi atenuada após a PTX. Tal fato aponta para o efeito do HPTS sobre a capacidade de síntese proteica e seu efeito deletério sobre desenvolvimento muscular. Apesar de ocorrer aumento nos níveis sanguíneos de IGF-1, não encontramos efeito sobre a sua expressão no tecido muscular. O FoxO3 é um fator de transcrição regulador da autofagia muscular, processo necessário para renovação mitocondrial e reparo do tecido muscular após atividade física intensa por exemplo (124). Sua expressão diminuída, associada à redução na capacidade de síntese proteica, podem estar relacionados a uma desregulação na capacidade de reparo do tecido muscular por limitação do

processo de autofagia.

Também avaliamos a expressão de miocinas, como a miostatina, um importante regulador no desenvolvimento muscular. Existe descrição de que seus níveis estejam elevados já nos estágios iniciais da DRC, devido a redução do *clearance* renal e/ou aumento da sua produção (125). Entretanto, há evidência de que a dosagem de miostatina não seja um biomarcador eficaz de sarcopenia na população com DRC em diálise, uma vez que seus níveis não diferem dos pacientes controles sem DRC e não se correlacionam com testes de força e performance (126). De fato, apesar da melhora da funcionalidade, os níveis de miostatina aumentaram em nossos pacientes, indicando que ela não pode ser utilizada como marcador fidedigno de sarcopenia nesses casos. Num contexto experimental, a superexpressão de miostatina em camundongos machos foi associada à redução da massa muscular e aumento da massa gorda (127). Em estudo clínico prévio, seus níveis aumentados já foram positivamente associados a um maior risco de obesidade abdominal em mulheres com síndrome de ovários policísticos (128). Como a miostatina também é expressa no tecido adiposo, o aumento da massa gorda após a PTX pode explicar a elevação desta proteína.

Em relação à análise da miostatina no tecido muscular, uma publicação anterior mostrou que sua expressão gênica está aumentada em pacientes com DRC, em relação aos saudáveis (53). Em nossa população, não houve mudança de expressão gênica, assim como na expressão por imuno-histoquímica ou na concentração proteica de miostatina muscular em relação aos pacientes saudáveis e nem após a PTX quando comparados ao *baseline*.

Outra miocina avaliada foi a irisina, que é secretada a partir da clivagem da FNDC5 durante o exercício. Desempenha um papel importante na regulação do metabolismo energético, atuando em diversos órgãos incluindo o tecido ósseo. Camundongos *knockout* para FNDC5 apresentam massa óssea reduzida em relação aos selvagens (129), mas os estudos com

modelos de DRC ainda são escassos. Kawao *et al.* (130) demonstraram que camundongos submetidos a nefrectomia 5/6 evoluíram com diminuição na expressão de FNDC5 e aumento na expressão gênica de miostatina. Além disso, também apresentaram uma redução na concentração proteica de irisina no músculo gastrocnêmio associada a perda de osso cortical, que melhorou após reposição de irisina.

Em um estudo clínico com 38 pacientes com DRC estágio 5, os níveis de irisina circulantes foram significativamente mais baixos quando comparados a uma população saudável pareada para sexo e idade (131). Em nossa amostra, a expressão gênica de FNDC5 no músculo dos pacientes com DRC e HPTS estava reduzida em relação aos indivíduos saudáveis. Após a PTX, houve aumento significativo da expressão gênica de FNDC5 e da concentração proteica muscular de irisina. Assim como foi observado com o ganho de massa óssea mais expressivo naqueles pacientes submetidos à PTX total, foi notada uma variação significativamente maior na concentração de irisina muscular após PTX total em relação à subtotal, bem como uma correlação entre o aumento da irisina muscular, ganho de massa óssea e redução na expressão muscular de TGF- $\beta$ . Tal achado ratifica a melhor condição muscular após tratamento do HPTS, principalmente com controle mais rigoroso do PTH, apesar de não ter havido mudança nos níveis sistêmicos de irisina após 6 meses.

O HPTS também está associado a inflamação sistêmica e do tecido ósseo, induzindo fibrose medular. A PTX atenua esse efeito e é capaz de reduzir a expressão de citocinas com efeitos sobre IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e FGF em medula óssea (32). A interação entre PTH e citocinas inflamatórias tem efeito não só sobre a remodelação óssea (132, 133), mas também sobre o tecido muscular. Após 6 meses da PTX, nossa coorte apresentou uma redução da PCR e dos níveis circulantes de IL-6. Na avaliação histológica do tecido muscular, foi notável a diminuição na expressão e concentração muscular de TGF- $\beta$  e OPN.



O TGF- $\beta$  é produzido principalmente pelos osteócitos, armazenado na matriz óssea e tem papel na remodelação óssea, regulando o recrutamento de osteoclastos e osteoblastos. Uma expressão mais alta de TGF- $\beta$  já foi observada na medula óssea de pacientes com HPTS, e isso reverteu após a PTX. Também desempenha um papel direto na fraqueza do músculo esquelético em condições patológicas. Já foi demonstrado que o aumento no TGF- $\beta$  circulante após a reabsorção óssea induzida por metástases ósseas promove oxidação de proteínas musculares e receptores de cálcio, contribuindo para a fraqueza muscular (74). Em nossa avaliação, tanto os níveis no sangue quanto a expressão muscular de TGF- $\beta$  reduziram após PTX, o que pode explicar a mudança na capacidade de resposta do músculo, uma vez que esta proteína atua como importante fator de fibrose tecidual.

Além do seu efeito sobre reabsorção e mineralização ósseas, a OPN também aumenta a resposta inflamatória através da atração de macrófagos para sítios inflamatórios em resposta a diferentes estímulos patológicos (81), aumentando a síntese de citocinas pró-inflamatórias (80). Estudos em modelos animais de distrofia muscular comprovaram a ação da OPN sobre a modulação de células inflamatórias e sobre a expressão de TGF- $\beta$  intramuscular (82), e a sua ablação gerou um fenótipo pró-regenerativo, capaz de retardar a progressão da doença e melhorar a função muscular (134). Os níveis elevados de OPN também correlacionaram-se significativamente com a resposta Th17 e produção de IL-17 no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (135).

A IL-17 está envolvida na inflamação crônica em várias doenças autoimunes. A análise de biópsias musculares de paciente com distrofia muscular de Duchenne revelou uma expressão aumentada de IL-17 no tecido muscular (136), que se correlacionou com expressão de outras citocinas inflamatórias, além de ter impacto na funcionalidade.

A expressão muscular aumentada de IL-1 $\beta$  já foi associada a um acúmulo de proteína

$\beta$ -amilóide presente em doenças inflamatórias neuromusculares, e, assim como o TNF- $\alpha$ , já foi relacionada ao desenvolvimento de atrofia muscular em modelos de camundongos com doença de Parkinson (137). A expressão dessas citocinas nesse mesmo modelo foi atenuada com a atividade física (138).

Na avaliação dos casos com HPTS grave em comparação com os saudáveis, notamos uma expressão gênica aumentada de IL 17A e IL-1  $\beta$  no tecido muscular. Na fase pós-PTX, houve redução dos níveis circulantes, da expressão muscular e da concentração de OPN, acompanhada da redução de concentração muscular de IL-17A, IL-1 $\beta$ , e TNF- $\alpha$ . Esses dados reforçam a hipótese de que a OPN também atua como agente inflamatório no tecido muscular no contexto do HPTS.

Evidências apontam que a via RANK/RANKL/OPG, componente da remodelação óssea e da resposta inflamatória (139), também está envolvida na função muscular. Um estudo clínico com pacientes saudáveis mostrou que o dano muscular induzido por exercícios intensos aumenta a OPG e diminui as concentrações de RANKL no sangue, sugerindo que estão envolvidos na inflamação muscular e nos processos de reparo em resposta ao dano (140). A ação do RANKL depende de sua ligação ao seu receptor, RANK, que está presente na membrana das células musculares, e cuja deleção específica no músculo modula a regulação do armazenamento de cálcio e a atividade da cálcio-ATPase do retículo sarcoendoplasmático no músculo esquelético (141).

A inibição desta interação RANKL/RANK com um anticorpo direcionado especificamente para RANKL melhora a força muscular em modelos de camundongos com distrofia muscular (142). A ação deste eixo também foi avaliada em outros modelos de doença crônica, como a doença pulmonar obstrutiva crônica. Camundongos expostos a partículas de fumaça de tabaco aumentam as concentrações de RANK e RANKL em fibras musculares

esqueléticas (143), e a neutralização do RANKL foi capaz de restaurar a força e a função muscular. Em modelos animais de câncer de ovário não-metastáticos, o tratamento anti-RANKL promoveu melhora da função muscular e atenuou a perda de massa óssea (144).

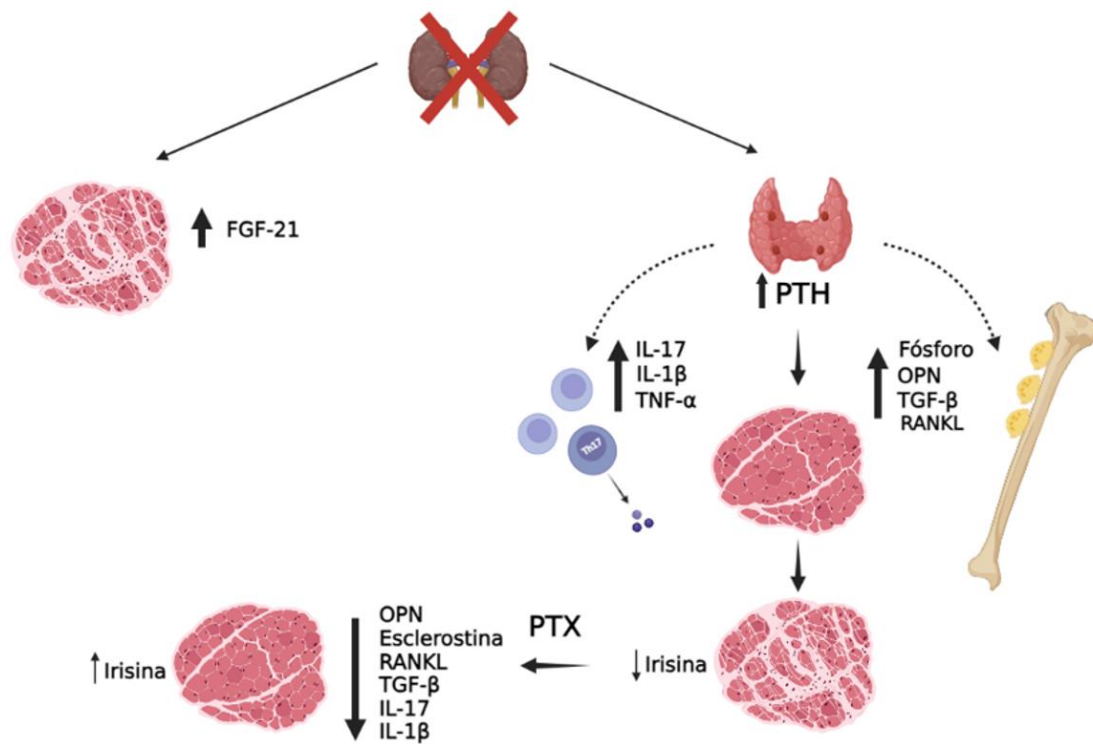
Além dos estudos experimentais, também existe evidência clínica do efeito do RANKL sobre músculo. Em estudo com mulheres menopausadas, a terapia com anti-RANKL ao longo de 3 anos, diferente do uso de bisfosfonatos, melhorou a massa magra apendicular e a força de preensão manual em comparação a nenhum tratamento (145). Nossa população apresentou uma redução dos níveis de OPG e manutenção dos níveis de RANKL circulantes. Na avaliação histológica, percebemos um aumento considerável na expressão gênica do RANKL no *baseline*, quando comparado aos controles, que se manteve elevada após PTX. A concentração proteica de RANKL apresentou uma queda significativa após a PTX, enquanto que a OPG não sofreu variações. Esse achado sugere que o RANKL local do tecido muscular tem papel no desenvolvimento de miopatia induzida pelo HPTS.

A partir de estudos experimentais, sabe-se que o FGF-21 atua como um marcador de disfunção mitocondrial e é um mediador de atrofia e fraqueza muscular, aumentando o fluxo de autofagia e mitofagia (146). Camundongos *knockout* para FGF-21 no músculo não experimentaram perda de massa muscular ou força em resposta ao jejum, enquanto a expressão aumentada de FGF-21 foi suficiente para induzir autofagia e atrofia muscular. Na nossa coorte, a expressão gênica de FGF-21 muscular mostrou uma tendência de aumento (cerca de 6x) em relação aos saudáveis. Na análise da concentração da proteína, houve diferença dos níveis de FGF21 no músculo de pacientes com DRC e uma tendência a redução após a PTX. Isto corrobora a hipótese, já demonstrada através de exames de imagem (88), de que a disfunção mitocondrial é um dos mecanismos envolvidos na miopatia da DRC. Não encontramos diferença na expressão gênica ou proteica de FGF-23; portanto, os efeitos do FGF-23 no músculo esquelético permanecem desconhecidos.

Dentre as limitações deste estudo, consideramos que o diagnóstico de sarcopenia em população com DRC não é contemplado com critérios bem definidos. Por isso, tomamos a decisão de empregar os critérios utilizados na maior parte das publicações prévias, porém validados em outro perfil populacional. A análise histológica de tecido ósseo poderia trazer informações relevantes, ajudando a identificar com mais detalhes os mecanismos relacionados à interação bioquímica entre tecido ósseo e muscular, porém isso poderia reduzir a inclusão de novos casos diante da maior complexidade para realização de biópsias ósseas em relação a biópsia muscular. Neste estudo não foi possível isolar efeitos dos agentes envolvidos no DMO-DRC, sendo impossível diferenciar o que seria uma ação isolada, por exemplo, do PTH, fósforo, FGF-23 ou do próprio *turnover* ósseo sobre tecido muscular. Além disso, o período de pandemia pelo coronavírus limitou a realização de cirurgias, pois o centro cirúrgico do Hospital das Clínicas foi fechado, o que inviabilizou a inclusão de mais participantes para esta análise.

Como pontos fortes, este é um estudo prospectivo com avaliação de diferentes aspectos relacionados ao sistema músculo-esquelético, e os pacientes foram seus próprios controles evolutivos, excluindo o viés de comparar com outra população. Também é o primeiro estudo com objetivo de relacionar os parâmetros do DMO-DRC e o efeito da PTX com dosagem de miocinas, bem como com a dinâmica de diversas proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo e muscular. Além de dosagem sanguínea, as proteínas também foram analisadas no compartimento muscular, e por três métodos diferentes: expressão gênica, multiplex e imunohistoquímica.

A hipótese levantada por esse estudo é de que o HPTS pode ter papel na miopatia urêmica através de um efeito direto dos níveis suprafisiológicos de PTH ou outros componentes do DMO-DRC, como o fósforo, sobre tecido muscular esquelético. Além disso, efeitos indiretos através da inflamação e produtos da remodelação óssea alterada também podem estar envolvidos nesta patogênese (figura 23).



**Figura 23** - Mecanismos propostos para a ação do hiperparatireoidismo secundário e da paratireoidectomia sobre tecido muscular. PTX: paratireoidectomia; FGF-21: fator de crescimento dos fibroblastos -21; TGF-β: fator de transformação do crescimento beta; RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B; IL: interleucina; TNF-α – fator de necrose tumoral alfa. Edição: Biorender.com

## **6. CONCLUSÃO**

---

---

## 6. CONCLUSÃO

O PTH é uma toxina urêmica com efeitos sistêmicos e capaz de afetar também o tecido muscular. O HPTS grave tem repercussões negativas causando, além da perda de massa óssea, redução da funcionalidade e alteração na homeostase do tecido muscular. Neste estudo, o HPTS promoveu mudanças na expressão gênica e proteica do tecido muscular, resultando em redução de *turnover* proteico, aumento de inflamação e fibrose tecidual, que foram parcialmente revertidos após a PTX. Além disso, o tratamento cirúrgico promoveu alteração em composição corporal dos pacientes, que apresentaram ganho significativo de massa óssea e massa gorda. Apesar de não haver ganho em massa muscular ou alteração em gasto energético de repouso após a PTX, houve efeitos positivos sobre a qualidade do músculo, identificados através da melhora da força muscular e da performance, acompanhadas de um aumento na concentração muscular de irisina.

## **7. ANEXOS**

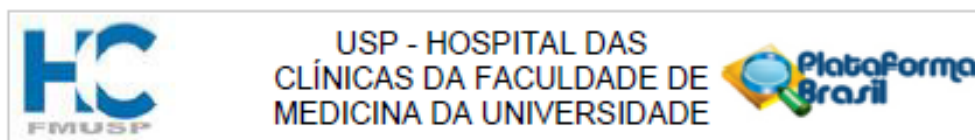
---

---



## 7. ANEXOS

### Anexo A - Parecer consubstanciado do CEP - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** IMPACTO DA PARATIREOIDECTOMIA SOBRE SARCOPENIA E METABOLISMO ENERGÉTICO EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA EM DIÁLISE E HIPERPARATIREOIDISMO SECUNDÁRIO

**Pesquisador:** Rosa Maria Affonso Moyses

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 87886218.7.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

##### DADOS DO PARECER

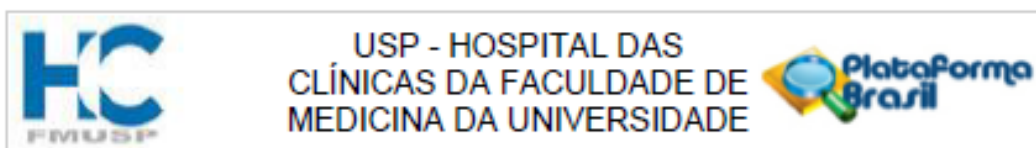
**Número do Parecer:** 2.778.915

##### Apresentação do Projeto:

O hiperparatireoidismo secundário (HPTS) é caracterizado por níveis elevados de paratormônio, sendo considerado uma complicação comum em pacientes com doença renal crônica (DRC), com risco elevado de fratura do quadril, levando a incapacidade física. Nosso objetivo é avaliar o impacto da Paratireoidectomia na Miopatia Urêmica e Metabolismo energético em Pacientes com HPTS através de biópsia muscular, calorimetria indireta e densitometria de dupla emissão com fontes de raio X (DEXA). Metodologia: O estudo será realizado no Hospital das Clínicas, no Laboratório de Fisiopatologia Renal (LIM 16) da Faculdade de Medicina da USP. Serão incluídos 20 pacientes com DRC estágio 5 em hemodiálise e HPTS com indicação de paratireoidectomia, ambos os sexos, de 18 a 75 anos. Avaliaremos o impacto da paratireoidectomia em pacientes com DRC e HPTS sobre tecido muscular e gasto energético em repouso.

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

Obs.: O título “IMPACTO DA PARATIREOIDECTOMIA SOBRE SARCOPENIA E METABOLISMO ENERGÉTICO EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA EM DIÁLISE E HIPERPARATIREOIDISMO SECUNDÁRIO” foi posteriormente alterado, com autorização da Pós-graduação, para “O HIPERPARATIREOIDISMO SECUNDÁRIO GRAVE ALTERA A EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DO TECIDO MUSCULAR: O PAPEL DA PARATIREOIDECTOMIA SOBRE A MIOPATIA URÊMICA”.



Continuação do Parecer: 2.778.915

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:** Estudar impacto da PTx sobre a performance muscular e gasto energético basal em pacientes com DRC **Objetivo Secundário:** Avaliar a associação entre hiperparatireoidismo secundário e miopatia urêmica.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

1. A biópsia muscular é de risco baixo para complicações, podendo raramente ocorrer sangramento ou dor no local da retirada do fragmento do tecido muscular
2. A coleta de sangue oferece o risco de dor, inchaço ou formação de manchas escuras (hematomas) na coleta.
3. A densitometria óssea e a calorimetria indireta são exames não invasivos. O primeiro envolve exposição a radiação ionizante em uma dose segura e bem abaixo dos limites estabelecidos pelas normas de radioproteção.

**Benefícios:**

1. Estudo sobre relação do hiperparatireoidismo na fisiopatologia da miopatia urêmica
2. Avaliação do efeito do tratamento do HPTS grave nos pacientes com doença renal crônica que fazem hemodiálise sobre sarcopenia, gasto energético e composição corporal.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O estudo é bem desenhado e responde a uma pergunta de pesquisa importante. Porém, no projeto inicial não ficava claro a real importância da biópsia muscular, exame invasivo que será realizado em duas ocasiões. Os pesquisadores responderam pendência de forma adequada, ressaltando a importância do procedimento.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O TCLE é bem escrito e adequado para a população alvo. Foi incluída a descrição do procedimento.

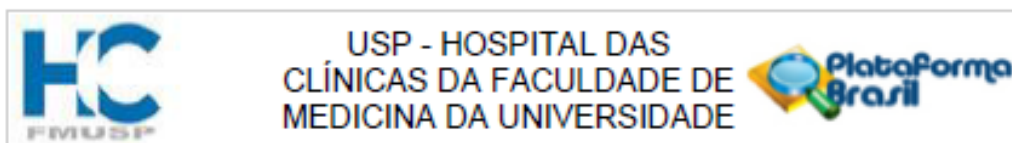
**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto adequado para início.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto

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: cappelq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 2.778.915

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.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1099379.pdf	08/08/2018 22:02:03		Aceito
Outros	resposta_CEP_BIOPSIAMUSCULAR.docx	08/08/2018 22:01:25	Rosa Maria Affonso Moyses	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PTXSarcopenia.docx	08/08/2018 21:58:31	Rosa Maria Affonso Moyses	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	17/04/2018 14:38:52	Rosa Maria Affonso Moyses	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_PTXSarcopenia.docx	17/04/2018 14:30:41	Rosa Maria Affonso Moyses	Aceito
Folha de Rosto	folharosto_PTXSarcopenia.pdf	16/04/2018 14:20:33	Rosa Maria Affonso Moyses	Aceito
Outros	Aprovacaodepartamento.pdf	05/04/2018 12:16:43	Rosa Maria Affonso Moyses	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 20 de Julho de 2018

Assinado por:  
ALFREDO JOSE MANSUR  
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5ª andar  
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

**Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – HCFMUSP  
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

---

**DADOS DA PESQUISA**

**TÍTULO DO PROTOCOLO DE ESTUDO DE PESQUISA:**

**IMPACTO DA PARATIREOIDECTOMIA SOBRE SARCOPENIA E  
METABOLISMO ENERGÉTICO EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL  
CRÔNICA EM DIÁLISE E HIPERPARATIREOIDISMO SECUNDÁRIO**

PESQUISADOR PRINCIPAL: Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup> Rosa Maria Affonso Moysés

PESQUISADOR EXECUTANTE: Eduardo Jorge Duque de Sá Carneiro Filho

CARGO/FUNÇÃO: Médico Nefrologista

NÚMERO INSCRIÇÃO NO CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA : Nº 152.284

**Convite à participação**

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que tem como objetivo avaliar os efeitos da paratireoidectomia sobre tecido muscular e gasto de energia do organismo (gasto energético basal) após 6 meses do procedimento cirúrgico.

**Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros:**

Caso o (a) senhor (a) aceite participar de tal estudo, será submetido a coletas de exames de sangue (serão retirados cerca de 20 mL além dos exames feitos habitualmente), além de exame para avaliação do gasto de energia do organismo em repouso (calorimetria indireta), densitometria para avaliação da composição corporal (gordura e massa magra) e biópsia muscular (retirada de pequeno fragmento do músculo da coxa) para entendimento do efeito de sua doença sobre o músculo antes e 6 meses após a cirurgia de paratireoidectomia, a qual será submetido. A biópsia muscular é um procedimento realizado por punção da coxa com anestesia local através de uma pequena incisão, após a qual o (a) senhor (a) estará apto (a) a realizar as atividades cotidianas normalmente. Como o procedimento é realizado por meio de punção, não há necessidade de sutura (pontos na pele).

As consultas médicas serão realizadas no ambulatório de distúrbio mineral e ósseo da Nefrologia (quinto andar do Prédio dos Ambulatórios - PAMB), as coletas

Obs.: O título “IMPACTO DA PARATIREOIDECTOMIA SOBRE SARCOPENIA E METABOLISMO ENERGÉTICO EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA EM DIÁLISE E HIPERPARATIREOIDISMO SECUNDÁRIO” foi posteriormente alterado, com autorização da Pós-graduação, para “O HIPERPARATIREOIDISMO SECUNDÁRIO GRAVE ALTERA A EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DO TECIDO MUSCULAR: O PAPEL DA PARATIREOIDECTOMIA SOBRE A MIOPATIA URÊMICA”.



de sangue serão realizadas no laboratório do mesmo serviço, a calorimetria indireta no Laboratório de Avaliação e Condicionamento em Reumatologia (LACRE), a densitometria no Laboratório da disciplina de Reumatologia (terceiro andar do prédio da Faculdade de Medicina da USP) e a biópsia muscular na enfermaria da Reumatologia (oitavo andar do Instituto Central do Hospital das Clínicas).

#### **Explicitação de possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa:**

Poderá ter desconforto na punção para coleta de sangue, o que é semelhante ao que o senhor (a) sente quando colhe exames de sangue para as consultas médicas. O único procedimento considerado de risco para o senhor (a) é a biópsia muscular, considerado de baixo risco de complicações, podendo raramente ocorrer complicações como sangramento ou dor no local da retirada do fragmento do músculo. No entanto este procedimento é necessário para avaliação do efeito da cirurgia sobre tecido muscular.

#### **Benefícios para o participante**

Ao participar deste estudo você permitirá que utilizemos os dados da sua saúde e descobrir se a cirurgia de paratireoidectomia tem efeito sobre ganho de condicionamento muscular e gasto de energia no repouso. Ao participar desta pesquisa, não temos certeza se o senhor (a) terá algum benefício direto. Trata-se de um estudo que poderá beneficiar no futuro os pacientes em hemodiálise.

#### **Esclarecimentos sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa**

Você será acompanhado no ambulatório de nefrologia durante e após o encerramento e/ou interrupção da pesquisa. Após o procedimento cirúrgico, as avaliações médicas serão semanais ou quinzenais de acordo com os resultado de exames de sangue, já que os níveis de cálcio tendem a ficar baixos após a cirurgia de paratireoidectomia. O (a) senhor (a) será submetido a densitometria para avaliação de massa magra e distribuição de gordura, calorimetria indireta para estudo do gasto de energia no repouso, assim como coletas de exames laboratoriais antes da cirurgia e 6 meses após a cirurgia. Serão realizadas 2 biópsias musculares, a primeira antes da paratireoidectomia e a segunda 6 meses após.

#### **Garantia de liberdade**

Em qualquer etapa do estudo, você terá liberdade de recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem penalização alguma, além de liberdade de sigilo e privacidade.

**Explicação das garantias de ressarcimento por despesas decorrentes da pesquisa e explicação da garantia de indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa**

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir, qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade são garantidos pela Normas e Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa envolvendo Seres Humanos – Res. CNS nº 466/12.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsável pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é o Dr. Eduardo Jorge Duque, que pode ser encontrado no 5º andar do Ambulatório Central do HCFMUSP - Serviço de Nefrologia ou no LIM 16 – telefone (11) 3061-8353 na Faculdade de Medicina da USP ou pelo telefone (11) 985445795 e e-mail [eduardojorgeduque@gmail.com](mailto:eduardojorgeduque@gmail.com). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: comitê de Ética em Pesquisa (CEP), rua Ovídeo Pires de Campos 225, 5º andar, tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: [cappesq.adm@hc.fm.usp.br](mailto:cappesq.adm@hc.fm.usp.br).

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – HCFMUSP

Fui suficientemente informado a respeito do estudo **"IMPACTO DA PARATIREOIDECTOMIA SOBRE SARCOPENIA E METABOLISMO ENERGÉTICO EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA EM DIÁLISE E HIPERPARATIREOIDISMO SECUNDÁRIO"**

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável (Dr Eduardo Duque) ou pessoa(s) por ele delegada(s) (\_\_\_\_\_) sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço. Assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante /representante legal

Data \_\_/\_\_/\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha (Para casos de pacientes analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual)

Data \_\_/\_\_/\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo estudo

Data \_\_/\_\_/\_\_

Obs.: O título "IMPACTO DA PARATIREOIDECTOMIA SOBRE SARCOPENIA E METABOLISMO ENERGÉTICO EM PACIENTES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA EM DIÁLISE E HIPERPARATIREOIDISMO SECUNDÁRIO" foi posteriormente alterado, com autorização da Pós-graduação, para "O HIPERPARATIREOIDISMO SECUNDÁRIO GRAVE ALTERA A EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEÍCA DO TECIDO MUSCULAR: O PAPEL DA PARATIREOIDECTOMIA SOBRE A MIOPATIA URÊMICA".

## Anexo C – Questionário SARC-F

Avaliação	Pergunta	Pontuação
Força	O quanto de dificuldade você tem para levantar e carregar 5 kg?	Nenhuma ----- 0 Alguma ----- 1 Muita /não consegue -----2
Ajuda para caminhar	O quanto de dificuldade você tem para atravessar um cômodo?	Nenhuma ----- 0 Alguma ----- 1 Muita /não consegue -----2
Levantar da cadeira	O quanto de dificuldade você tem para levantar de uma cama ou cadeira?	Nenhuma ----- 0 Alguma ----- 1 Muita /não consegue -----2
Subir escadas	O quanto de dificuldade você tem para subir um lance de escadas de 10 degraus?	Nenhuma ----- 0 Alguma ----- 1 Muita /não consegue -----2
Queda	Quantas vezes você caiu no último ano?	Nenhuma ----- 0 1 a 3 vezes ----- 1 4 ou mais ----- 2
Interpretação ≥4 pontos: indica risco de sarcopenia		



## **8. REFERÊNCIAS**

---

---

## 8. REFERÊNCIAS

1. Conigrave AD. The Calcium-Sensing Receptor and the Parathyroid: Past, Present, Future. *Front Physiol.* 2016;7:563.
2. D'Amour P. Circulating PTH molecular forms: what we know and what we don't. *Kidney Int Suppl.* 2006(102):S29-33.
3. Mannstadt M, Jüppner H, Gardella TJ. Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. *Am J Physiol.* 1999;277(5):F665-75.
4. Rubin DA, Jüppner H. Zebrafish express the common parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor (PTH1R) and a novel receptor (PTH3R) that is preferentially activated by mammalian and fugu fish parathyroid hormone-related peptide. *J Biol Chem.* 1999;274(40):28185-90.
5. Martin KJ, González EA. Metabolic bone disease in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(3):875-85.
6. Gonzalez EA. The role of cytokines in skeletal remodelling: possible consequences for renal osteodystrophy. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15(7):945-50.
7. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med.* 2013;19(2):179-92.
8. Baron R, Rawadi G. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. *Endocrinology.* 2007;148(6):2635-43.
9. Moyses RM, Schiavi SC. Sclerostin, Osteocytes, and Chronic Kidney Disease - Mineral Bone Disorder. *Semin Dial.* 2015;28(6):578-86.
10. Keller H, Kneissel M. SOST is a target gene for PTH in bone. *Bone.* 2005;37(2):148-58.
11. Carrillo-López N, Martínez-Arias L, Fernández-Villabrille S, Ruiz-Torres MP, Dusso A, Cannata-Andía JB, et al. Role of the RANK/RANKL/OPG and Wnt/ $\beta$ -Catenin Systems in CKD Bone and Cardiovascular Disorders. *Calcif Tissue Int.* 2021;108(4):439-51.
12. Jilka RL. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone.* 2007;40(6):1434-46.
13. Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2006;69(11):1945-53.
14. Silver J, Naveh-Manly T. FGF-23 and secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9(11):641-9.
15. Duque EJ, Elias RM, Moysés RMA. Phosphate balance during dialysis and after kidney transplantation in patients with chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2022;31(4):326-31.
16. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quiñones H, Griffith C, Kuro-o M, et al. Klotho deficiency causes

- vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(1):124-36.
17. Centeno PP, Herberger A, Mun HC, Tu C, Nemeth EF, Chang W, et al. Phosphate acts directly on the calcium-sensing receptor to stimulate parathyroid hormone secretion. *Nat Commun.* 2019;10(1):4693.
  18. Martin A, David V, Quarles LD. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. *Physiol Rev.* 2012;92(1):131-55.
  19. Olauson H, Lindberg K, Amin R, Sato T, Jia T, Goetz R, et al. Parathyroid-specific deletion of Klotho unravels a novel calcineurin-dependent FGF23 signaling pathway that regulates PTH secretion. *PLoS Genet.* 2013;9(12):e1003975.
  20. Duque EJ, Elias RM, Moysés RMA. Parathyroid Hormone: A Uremic Toxin. *Toxins (Basel).* 2020;12(3).
  21. Nickolas TL, Cremers S, Zhang A, Thomas V, Stein E, Cohen A, et al. Discriminants of prevalent fractures in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(8):1560-72.
  22. Duan Y, De Luca V, Seeman E. Parathyroid hormone deficiency and excess: similar effects on trabecular bone but differing effects on cortical bone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(2):718-22.
  23. Araujo MJ, Karohl C, Elias RM, Barreto FC, Barreto DV, Canziani ME, et al. The pitfall of treating low bone turnover: Effects on cortical porosity. *Bone.* 2016;91:75-80.
  24. Moe SM, Chen NX, Newman CL, Gattone VH, 2nd, Organ JM, Chen X, et al. A comparison of calcium to zoledronic acid for improvement of cortical bone in an animal model of CKD. *J Bone Miner Res.* 2014;29(4):902-10.
  25. 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.
  26. Bonewald LF, Dallas SL. Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation. *J Cell Biochem.* 1994;55(3):350-7.
  27. Noda M, Camilliere JJ. In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. *Endocrinology.* 1989;124(6):2991-4.
  28. Qiu T, Wu X, Zhang F, Clemens TL, Wan M, Cao X. TGF-beta type II receptor phosphorylates PTH receptor to integrate bone remodelling signalling. *Nat Cell Biol.* 2010;12(3):224-34.
  29. Mace ML, Gravesen E, Nordholm A, Hofman-Bang J, Secher T, Olgaard K, et al. Kidney fibroblast growth factor 23 does not contribute to elevation of its circulating levels in uremia. *Kidney Int.* 2017;92(1):165-78.
  30. Jiang X, Kanai H, Shigehara T, Maezawa A, Yano S, Naruse T. Metabolism of transforming growth factor-beta in patients receiving hemodialysis especially those with renal osteodystrophy. *Ren Fail.* 1998;20(1):135-45.
  31. Iwasaki Y, Yamato H, Fukagawa M. TGF-Beta Signaling in Bone with Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8).

32. Santos FR, Moysés RM, Montenegro FL, Jorgetti V, Noronha IL. IL-1beta, TNF-alpha, TGF-beta, and bFGF expression in bone biopsies before and after parathyroidectomy. *Kidney Int.* 2003;63(3):899-907.
33. Crane JL, Cao X. Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- $\beta$  signaling in bone remodeling. *J Clin Invest.* 2014;124(2):466-72.
34. Hernandez FR, Barreto FC, Rocha LA, Draibe SA, Canziani ME, Carvalho AB. Evaluation of the role of severe hyperparathyroidism on coronary artery calcification in dialysis patients. *Clin Nephrol.* 2007;67(2):89-95.
35. Saleh FN, Schirmer H, Sundsfjord J, Jorde R. Parathyroid hormone and left ventricular hypertrophy. *Eur Heart J.* 2003;24(22):2054-60.
36. Block GA, Klassen PS, Lazarus JM, Ofsthun N, Lowrie EG, Chertow GM. Mineral metabolism, mortality, and morbidity in maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(8):2208-18.
37. Scialla JJ, Wolf M. Roles of phosphate and fibroblast growth factor 23 in cardiovascular disease. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10(5):268-78.
38. Lee YJ, Okuda Y, Sy J, Obi Y, Kang DH, Nguyen S, et al. Association of Mineral Bone Disorder With Decline in Residual Kidney Function in Incident Hemodialysis Patients. *J Bone Miner Res.* 2019.
39. Da J, Xie X, Wolf M, Disthabanchong S, Wang J, Zha Y, et al. Serum Phosphorus and Progression of CKD and Mortality: A Meta-analysis of Cohort Studies. *Am J Kidney Dis.* 2015;66(2):258-65.
40. Schumock GT, Andress DL, Marx SE, Sterz R, Joyce AT, Kalantar-Zadeh K. Association of secondary hyperparathyroidism with CKD progression, health care costs and survival in diabetic predialysis CKD patients. *Nephron Clin Pract.* 2009;113(1):c54-61.
41. Sampaio EeA, Moysés RM, Nefrologia SBd. [Parathyroidectomy in CKD]. *J Bras Nefrol.* 2011;33(2):221-4.
42. Isaksson E, Ivarsson K, Akaberi S, Muth A, Sterner G, Karl-Göran P, et al. The Effect of Parathyroidectomy on Risk of Hip Fracture in Secondary Hyperparathyroidism. *World J Surg.* 2017;41(9):2304-11.
43. Valente-Da-Silva HG, Maya MCA, Moreira AS. Parathyroidectomy in chronic kidney disease: effects on weight gain and on quality of life improvement. *Rev Col Bras Cir.* 2017;44(3):263-9.
44. Khajehdehi P, Ali M, Al-Gebory F, Henry G, Bastani B. The effects of parathyroidectomy on nutritional and biochemical status of hemodialysis patients with severe secondary hyperparathyroidism. *J Ren Nutr.* 1999;9(4):186-91.
45. Kristoffersson A, Boström A, Söderberg T. Muscle strength is improved after parathyroidectomy in patients with primary hyperparathyroidism. *Br J Surg.* 1992;79(2):165-8.
46. Ritz E, Stefanski A, Rambašek M. The role of the parathyroid glands in the uremic syndrome. *Am J Kidney Dis.* 1995;26(5):808-13.
47. Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, Boirie Y, Bruyère O, Cederholm T, et al. Sarcopenia: revised

European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing*. 2019;48(1):16-31.

48. Bian A, Ma Y, Zhou X, Guo Y, Wang W, Zhang Y, et al. Association between sarcopenia and levels of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in the elderly. *BMC Musculoskelet Disord*. 2020;21(1):214.
49. Holmes SJ, Economou G, Whitehouse RW, Adams JE, Shalet SM. Reduced bone mineral density in patients with adult onset growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;78(3):669-74.
50. Rosen CJ, Pollak M. Circulating IGF-I: New Perspectives for a New Century. *Trends Endocrinol Metab*. 1999;10(4):136-41.
51. Trobec K, von Haehling S, Anker SD, Lainscak M. Growth hormone, insulin-like growth factor 1, and insulin signaling-a pharmacological target in body wasting and cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2011;2(4):191-200.
52. Terracciano C, Celi M, Lecce D, Baldi J, Rastelli E, Lena E, et al. Differential features of muscle fiber atrophy in osteoporosis and osteoarthritis. *Osteoporos Int*. 2013;24(3):1095-100.
53. Verzola D, Procopio V, Sofia A, Villaggio B, Tarroni A, Bonanni A, et al. Apoptosis and myostatin mRNA are upregulated in the skeletal muscle of patients with chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2011;79(7):773-82.
54. Sanchez AM, Candau RB, Bernardi H. FoxO transcription factors: their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71(9):1657-71.
55. McLoughlin TJ, Smith SM, DeLong AD, Wang H, Unterman TG, Esser KA. FoxO1 induces apoptosis in skeletal myotubes in a DNA-binding-dependent manner. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009;297(3):C548-55.
56. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. 2007;129(7):1261-74.
57. Workeneh BT, Mitch WE. Review of muscle wasting associated with chronic kidney disease. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(4):1128S-32S.
58. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 2001;294(5547):1704-8.
59. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*. 2004;117(3):399-412.
60. Edstrom E, Altun M, Hagglund M, Ulfhake B. Atrogin-1/MAFbx and MuRF1 are downregulated in aging-related loss of skeletal muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2006;61(7):663-74.
61. Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyeva Y, Kline WO, et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell*. 2004;14(3):395-403.

62. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*. 1997;387(6628):83-90.
63. Qin Y, Peng Y, Zhao W, Pan J, Ksiezak-Reding H, Cardozo C, et al. Myostatin inhibits osteoblastic differentiation by suppressing osteocyte-derived exosomal microRNA-218: A novel mechanism in muscle-bone communication. *J Biol Chem*. 2017;292(26):11021-33.
64. Dankbar B, Fennen M, Brunert D, Hayer S, Frank S, Wehmeyer C, et al. Myostatin is a direct regulator of osteoclast differentiation and its inhibition reduces inflammatory joint destruction in mice. *Nat Med*. 2015;21(9):1085-90.
65. Mera P, Laue K, Wei J, Berger JM, Karsenty G. Osteocalcin is necessary and sufficient to maintain muscle mass in older mice. *Mol Metab*. 2016;5(10):1042-7.
66. Mera P, Laue K, Ferron M, Confavreux C, Wei J, Galán-Díez M, et al. Osteocalcin Signaling in Myofibers Is Necessary and Sufficient for Optimum Adaptation to Exercise. *Cell Metab*. 2016;23(6):1078-92.
67. Kim JA, Roh E, Hong SH, Lee YB, Kim NH, Yoo HJ, et al. Association of serum sclerostin levels with low skeletal muscle mass: The Korean Sarcopenic Obesity Study (KSOS). *Bone*. 2019;128:115053.
68. Faul C, Amaral AP, Oskouei B, Hu MC, Sloan A, Isakova T, et al. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest*. 2011;121(11):4393-408.
69. Pawlikowski B, Vogler TO, Gadek K, Olwin BB. Regulation of skeletal muscle stem cells by fibroblast growth factors. *Dev Dyn*. 2017;246(5):359-67.
70. Benoit B, Meugnier E, Castelli M, Chanon S, Vieille-Marchiset A, Durand C, et al. Fibroblast growth factor 19 regulates skeletal muscle mass and ameliorates muscle wasting in mice. *Nat Med*. 2017;23(8):990-6.
71. Morovat A, Weerasinghe G, Nesbitt V, Hofer M, Agnew T, Quaghebeur G, et al. Use of FGF-21 as a Biomarker of Mitochondrial Disease in Clinical Practice. *J Clin Med*. 2017;6(8).
72. Ribas F, Villarroya J, Hondares E, Giralt M, Villarroya F. FGF21 expression and release in muscle cells: involvement of MyoD and regulation by mitochondria-driven signalling. *Biochem J*. 2014;463(2):191-9.
73. Massague J, Cheifetz S, Endo T, Nadal-Ginard B. Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(21):8206-10.
74. Waning DL, Mohammad KS, Reiken S, Xie W, Andersson DC, John S, et al. Excess TGF-beta mediates muscle weakness associated with bone metastases in mice. *Nat Med*. 2015;21(11):1262-71.
75. Bernasconi P, Torchiana E, Confalonieri P, Brugnoli R, Barresi R, Mora M, et al. Expression of transforming growth factor-beta 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. *J Clin Invest*. 1995;96(2):1137-44.
76. Ishitobi M, Haginoya K, Zhao Y, Ohnuma A, Minato J, Yanagisawa T, et al. Elevated plasma levels of transforming growth factor beta1 in patients with muscular dystrophy. *Neuroreport*.

2000;11(18):4033-5.

77. Burks TN, Cohn RD. Role of TGF- $\beta$  signaling in inherited and acquired myopathies. *Skelet Muscle*. 2011;1(1):19.
78. Ihara H, Denhardt DT, Furuya K, Yamashita T, Muguruma Y, Tsuji K, et al. Parathyroid hormone-induced bone resorption does not occur in the absence of osteopontin. *J Biol Chem*. 2001;276(16):13065-71.
79. Ono N, Nakashima K, Rittling SR, Schipani E, Hayata T, Soma K, et al. Osteopontin negatively regulates parathyroid hormone receptor signaling in osteoblasts. *J Biol Chem*. 2008;283(28):19400-9.
80. Kahles F, Findeisen HM, Bruemmer D. Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. *Mol Metab*. 2014;3(4):384-93.
81. Zheng W, Li R, Pan H, He D, Xu R, Guo TB, et al. Role of osteopontin in induction of monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage inflammatory protein 1beta through the NF-kappaB and MAPK pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;60(7):1957-65.
82. Vetrone SA, Montecino-Rodriguez E, Kudryashova E, Kramerova I, Hoffman EP, Liu SD, et al. Osteopontin promotes fibrosis in dystrophic mouse muscle by modulating immune cell subsets and intramuscular TGF-beta. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1583-94.
83. Kim H, Wrann CD, Jedrychowski M, Vidoni S, Kitase Y, Nagano K, et al. Irisin Mediates Effects on Bone and Fat via  $\alpha$ V Integrin Receptors. *Cell*. 2018;175(7):1756-68.e17.
84. Colaianni G, Cuscito C, Mongelli T, Pignataro P, Buccoliero C, Liu P, et al. The myokine irisin increases cortical bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(39):12157-62.
85. Zhang J, Valverde P, Zhu X, Murray D, Wu Y, Yu L, et al. Exercise-induced irisin in bone and systemic irisin administration reveal new regulatory mechanisms of bone metabolism. *Bone Res*. 2017;5:16056.
86. Palermo A, Sanesi L, Colaianni G, Tabacco G, Naciu AM, Cesareo R, et al. A Novel Interplay Between Irisin and PTH: From Basic Studies to Clinical Evidence in Hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(8):3088-96.
87. Fahal IH. Uraemic sarcopenia: aetiology and implications. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(9):1655-65.
88. Gamboa JL, Roshanravan B, Towse T, Keller CA, Falck AM, Yu C, et al. Skeletal Muscle Mitochondrial Dysfunction Is Present in Patients with CKD before Initiation of Maintenance Hemodialysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2020;15(7):926-36.
89. McIntyre CW, Selby NM, Sigrist M, Pearce LE, Mercer TH, Naish PF. Patients receiving maintenance dialysis have more severe functionally significant skeletal muscle wasting than patients with dialysis-independent chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(8):2210-6.
90. Zhang L, Chen Q, Chen Z, Wang Y, Gamboa JL, Ikizler TA, et al. Mechanisms Regulating Muscle Protein Synthesis in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2020;31(11):2573-87.
91. Molina P, Carrero JJ, Bover J, Chauveau P, Mazzaferro S, Torres PU, et al. Vitamin D, a

- modulator of musculoskeletal health in chronic kidney disease. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2017;8(5):686-701.
92. Heiwe S, Jacobson SH. Exercise training in adults with CKD: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis*. 2014;64(3):383-93.
93. Kopple JD, Wang H, Casaburi R, Fournier M, Lewis MI, Taylor W, et al. Exercise in maintenance hemodialysis patients induces transcriptional changes in genes favoring anabolic muscle. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(11):2975-86.
94. Bhasin S, Apovian CM, Travison TG, Pencina K, Moore LL, Huang G, et al. Effect of Protein Intake on Lean Body Mass in Functionally Limited Older Men: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med*. 2018;178(4):530-41.
95. Fujii M, Ando A, Mikami H, Okada A, Imai E, Kokuba Y, et al. Effect of the restriction of nitrogen intake on muscle protein synthesis in experimental uremic rats. *Kidney Int Suppl*. 1987;22:S153-8.
96. Kir S, Komaba H, Garcia AP, Economopoulos KP, Liu W, Lanske B, et al. PTH/PTHrP Receptor Mediates Cachexia in Models of Kidney Failure and Cancer. *Cell Metab*. 2016;23(2):315-23.
97. Hernandez FR, Canziani ME, Barreto FC, Santos RO, Moreira VM, Rochitte CE, et al. The shift from high to low turnover bone disease after parathyroidectomy is associated with the progression of vascular calcification in hemodialysis patients: A 12-month follow-up study. *PLoS One*. 2017;12(4):e0174811.
98. Freedson PS, Melanson E, Sirard J. Calibration of the Computer Science and Applications, Inc. accelerometer. *Med Sci Sports Exerc*. 1998;30(5):777-81.
99. Schlüssel MM, dos Anjos LA, de Vasconcellos MT, Kac G. Reference values of handgrip dynamometry of healthy adults: a population-based study. *Clin Nutr*. 2008;27(4):601-7.
100. WEIR JB. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J Physiol*. 1949;109(1-2):1-9.
101. De Martino V, Pepe J, Biamonte F, Colangelo L, Di Giuseppe L, Nieddu L, et al. Impairment in muscle strength and its determinants in primary hyperparathyroidism: A study in postmenopausal women. *Bone*. 2023;166:116604.
102. Del Vecchio A, Casolo A, Negro F, Scorcelletti M, Bazzucchi I, Enoka R, et al. The increase in muscle force after 4 weeks of strength training is mediated by adaptations in motor unit recruitment and rate coding. *J Physiol*. 2019;597(7):1873-87.
103. Alcalde-Estévez E, Sosa P, Asenjo-Bueno A, Plaza P, Valenzuela PL, Naves-Díaz M, et al. Dietary phosphate restriction prevents the appearance of sarcopenia signs in old mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2023;14(2):1060-74.
104. Czaya B, Heitman K, Campos I, Yanucil C, Kentrup D, Westbrook D, et al. Hyperphosphatemia increases inflammation to exacerbate anemia and skeletal muscle wasting independently of FGF23-FGFR4 signaling. *Elife*. 2022;11.



105. Chen YY, Kao TW, Chou CW, Wu CJ, Yang HF, Lai CH, et al. Exploring the Link between Serum Phosphate Levels and Low Muscle Strength, Dynapenia, and Sarcopenia. *Sci Rep*. 2018;8(1):3573.
106. Halfon M, Phan O, Teta D. Vitamin D: a review on its effects on muscle strength, the risk of fall, and frailty. *Biomed Res Int*. 2015;2015:953241.
107. Glendenning P, Zhu K, Inderjeeth C, Howat P, Lewis JR, Prince RL. Effects of three-monthly oral 150,000 IU cholecalciferol supplementation on falls, mobility, and muscle strength in older postmenopausal women: a randomized controlled trial. *J Bone Miner Res*. 2012;27(1):170-6.
108. Faulkner KA, Cauley JA, Zmuda JM, Landsittel DP, Newman AB, Studenski SA, et al. Higher 1,25-dihydroxyvitamin D3 concentrations associated with lower fall rates in older community-dwelling women. *Osteoporos Int*. 2006;17(9):1318-28.
109. Kenny AM, Biskup B, Robbins B, Marcella G, Burleson JA. Effects of vitamin D supplementation on strength, physical function, and health perception in older, community-dwelling men. *J Am Geriatr Soc*. 2003;51(12):1762-7.
110. Duque EJ, Elias RM, Jorgetti V, Moysés RMA. Nephrology picture: bone loss due to absence of adequate therapy for severe secondary hyperparathyroidism. *J Nephrol*. 2022;35(9):2445-7.
111. Cuppari L, de Carvalho AB, Avesani CM, Kamimura MA, Dos Santos Lobão RR, Draibe SA. Increased resting energy expenditure in hemodialysis patients with severe hyperparathyroidism. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(11):2933-9.
112. O'Sullivan AJ, Lawson JA, Chan M, Kelly JJ. Body composition and energy metabolism in chronic renal insufficiency. *Am J Kidney Dis*. 2002;39(2):369-75.
113. Mitch WE, Du J, Bailey JL, Price SR. Mechanisms causing muscle proteolysis in uremia: the influence of insulin and cytokines. *Miner Electrolyte Metab*. 1999;25(4-6):216-9.
114. Okada M, Tominaga Y, Tomosugi T, Hiramitsu T, Ichimori T, Sato T. Predictors of Bone Mineral Density Improvement after Parathyroidectomy for Secondary Hyperparathyroidism: A Retrospective Single-Center Analysis. *World J Surg*. 2021;45(9):2777-84.
115. Tsuji K, Maeda T, Kawane T, Matsunuma A, Horiuchi N. Leptin stimulates fibroblast growth factor 23 expression in bone and suppresses renal 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 synthesis in leptin-deficient mice. *J Bone Miner Res*. 2010;25(8):1711-23.
116. Hoang D, Broer N, Roman SA, Yao X, Abitbol N, Li F, et al. Leptin signaling and hyperparathyroidism: clinical and genetic associations. *J Am Coll Surg*. 2014;218(6):1239-50.e4.
117. Hoang D, Broer N, Sosa JA, Abitbol N, Yao X, Li F, et al. Leptin Is Produced by Parathyroid Glands and Stimulates Parathyroid Hormone Secretion. *Ann Surg*. 2017;266(6):1075-83.
118. Ferron M, Lacombe J. Regulation of energy metabolism by the skeleton: osteocalcin and beyond. *Arch Biochem Biophys*. 2014;561:137-46.
119. Siqueira FR, Oliveira KC, Dominguez WV, Truys CAM, Moysés RMA, Dos Reis LM, et al. Effect of parathyroidectomy on bone tissue biomarkers and body composition in patients with chronic

- kidney disease and secondary hyperparathyroidism. *Eur J Clin Nutr.* 2021;75(7):1126-33.
120. Goldenstein PT, Gracioli FG, Antunes GL, Dominguez WV, Dos Reis LM, Moe S, et al. A prospective study of the influence of the skeleton on calcium mass transfer during hemodialysis. *PLoS One.* 2018;13(7):e0198946.
121. Florio M, Gunasekaran K, Stolina M, Li X, Liu L, Tipton B, et al. A bispecific antibody targeting sclerostin and DKK-1 promotes bone mass accrual and fracture repair. *Nat Commun.* 2016;7:11505.
122. Witcher PC, Miner SE, Horan DJ, Bullock WA, Lim KE, Kang KS, et al. Sclerostin neutralization unleashes the osteoanabolic effects of Dkk1 inhibition. *JCI Insight.* 2018;3(11).
123. Himburg HA, Doan PL, Quarmyne M, Yan X, Sasine J, Zhao L, et al. Dickkopf-1 promotes hematopoietic regeneration via direct and niche-mediated mechanisms. *Nat Med.* 2017;23(1):91-9.
124. Chatzinikita E, Maridaki M, Palikaras K, Koutsilieris M, Philippou A. The Role of Mitophagy in Skeletal Muscle Damage and Regeneration. *Cells.* 2023;12(5).
125. Yano S, Nagai A, Isomura M, Yamasaki M, Kijima T, Takeda M, et al. Relationship between Blood Myostatin Levels and Kidney Function:Shimane CoHRE Study. *PLoS One.* 2015;10(10):e0141035.
126. Esposito P, Battaglia Y, La Porta E, Grignano MA, Caramella E, Avella A, et al. Significance of serum Myostatin in hemodialysis patients. *BMC Nephrol.* 2019;20(1):462.
127. Reisz-Porszasz S, Bhasin S, Artaza JN, Shen R, Sinha-Hikim I, Hogue A, et al. Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285(4):E876-88.
128. Chen MJ, Han DS, Yang JH, Yang YS, Ho HN, Yang WS. Myostatin and its association with abdominal obesity, androgen and follistatin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2012;27(8):2476-83.
129. Luo Y, Qiao X, Ma Y, Deng H, Xu CC, Xu L. Disordered metabolism in mice lacking irisin. *Sci Rep.* 2020;10(1):17368.
130. Kawao N, Kawaguchi M, Ohira T, Ehara H, Mizukami Y, Takafuji Y, et al. Renal failure suppresses muscle irisin expression, and irisin blunts cortical bone loss in mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2022;13(1):758-71.
131. Wen MS, Wang CY, Lin SL, Hung KC. Decrease in irisin in patients with chronic kidney disease. *PLoS One.* 2013;8(5):e64025.
132. Nguyen L, Dewhirst FE, Hauschka PV, Stashenko P. Interleukin-1 beta stimulates bone resorption and inhibits bone formation in vivo. *Lymphokine Cytokine Res.* 1991;10(1-2):15-21.
133. Stashenko P, Dewhirst FE, Peros WJ, Kent RL, Ago JM. Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol.* 1987;138(5):1464-8.
134. Capote J, Kramerova I, Martinez L, Vetrone S, Barton ER, Sweeney HL, et al. Osteopontin

ablation ameliorates muscular dystrophy by shifting macrophages to a pro-regenerative phenotype. *J Cell Biol.* 2016;213(2):275-88.

135. Chen G, Zhang X, Li R, Fang L, Niu X, Zheng Y, et al. Role of osteopontin in synovial Th17 differentiation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(10):2900-8.

136. De Pasquale L, D'Amico A, Verardo M, Petrini S, Bertini E, De Benedetti F. Increased muscle expression of interleukin-17 in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 2012;78(17):1309-14.

137. Erekat N, Al-Jarrah MD. Interleukin-1 Beta and Tumor Necrosis Factor Alpha Upregulation and Nuclear Factor Kappa B Activation in Skeletal Muscle from a Mouse Model of Chronic/Progressive Parkinson Disease. *Med Sci Monit.* 2018;24:7524-31.

138. Al-Jarrah MD, Erekat NS. Treadmill exercise training could attenuate the upregulation of Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha in the skeletal muscle of mouse model of chronic/progressive Parkinson disease. *NeuroRehabilitation.* 2018;43(4):501-7.

139. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;423(6937):337-42.

140. Philippou A, Bogdanis G, Maridaki M, Halapas A, Sourla A, Koutsilieris M. Systemic cytokine response following exercise-induced muscle damage in humans. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(6):777-82.

141. Dufresne SS, Dumont NA, Boulanger-Piette A, Fajardo VA, Gamu D, Kake-Guena SA, et al. Muscle RANK is a key regulator of Ca<sup>2+</sup> storage, SERCA activity, and function of fast-twitch skeletal muscles. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016;310(8):C663-72.

142. Hamoudi D, Marcadet L, Piette Boulanger A, Yagita H, Bouredji Z, Argaw A, et al. An anti-RANKL treatment reduces muscle inflammation and dysfunction and strengthens bone in dystrophic mice. *Hum Mol Genet.* 2019;28(18):3101-12.

143. Xiong J, Le Y, Rao Y, Zhou L, Hu Y, Guo S, et al. RANKL Mediates Muscle Atrophy and Dysfunction in a Cigarette Smoke-induced Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2021;64(5):617-28.

144. Pin F, Jones AJ, Huot JR, Narasimhan A, Zimmers TA, Bonewald LF, et al. RANKL Blockade Reduces Cachexia and Bone Loss Induced by Non-Metastatic Ovarian Cancer in Mice. *J Bone Miner Res.* 2022;37(3):381-96.

145. Bonnet N, Bourgoin L, Biver E, Douni E, Ferrari S. RANKL inhibition improves muscle strength and insulin sensitivity and restores bone mass. *J Clin Invest.* 2019;129(8):3214-23.

146. Oost LJ, Kustermann M, Armani A, Blaauw B, Romanello V. Fibroblast growth factor 21 controls mitophagy and muscle mass. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2019;10(3):630-42.

## **9. APÊNDICES**

---

---

## 9. APÊNDICES

**Apêndice A** - Phosphate balance during dialysis and after kidney transplantation in patients with chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2022



# Phosphate balance during dialysis and after kidney transplantation in patients with chronic kidney disease

Eduardo J. Duque<sup>a</sup>, Rosilene M. Elias<sup>a,b</sup>, and Rosa M.A. Moysés<sup>a</sup>

## Purpose of review

In patients with chronic kidney disease (CKD), hyperphosphatemia is associated with several adverse outcomes, including bone fragility and progression of kidney and cardiovascular disease. However, there is a knowledge gap regarding phosphate balance in CKD. This review explores its current state, depending on the stage of CKD, dialysis modalities, and the influence of kidney transplantation.

## Recent findings

Adequate phosphate control is one of the goals of treatment for CKD-mineral and bone disorder. However, ongoing studies are challenging the benefits of phosphate-lowering treatment. Nevertheless, the current therapy is based on dietary restriction, phosphate binders, and optimal removal by dialysis. In the face of limited adherence, due to the high pill burden, adjuvant options are under investigation. The recent discovery that intestinal absorption of phosphate is mostly paracellular when the intraluminal concentration is adequate might help explain why phosphate is still well absorbed in CKD, despite the lower levels of calcitriol.

## Summary

Future studies could confirm the benefits of phosphate control. Greater understanding of the complex distribution of phosphate among the body compartments will help us define a better therapeutic strategy in patients with CKD.

## Keywords

chronic kidney disease-mineral and bone disorder, dialysis, hyperphosphatemia, mineral balance, phosphate

## INTRODUCTION

In the human body, phosphate is the second most abundant mineral and is mainly found in its inorganic form; approximately 85% is bound to the bone matrix in the form of hydroxyapatite crystals, the remaining 15% being found in soft tissues and extracellular fluids, including plasma, which accounts for 0.02% of the total phosphate. Phosphate also plays a fundamental role in basic cellular processes. It is a constituent of the phospholipid cell membrane and of nucleic acids, as well as being involved in cell signalling, synthesis of adenosine triphosphate (energy storage and release) and acid-base regulation (urinary and intracellular buffering) [1].

Because phosphate is widely distributed among different compartments, blood samples are of limited utility for assessing its storage. There is evidence of physiological fluctuations in phosphate levels, even in healthy individuals. Typically, those levels peak between 2:00 and 4:00 a.m., apparently not

driven by calcium or parathormone (PTH), and are lowest between 8:00 and 10:00 a.m., after which there is a small peak and drop during the remaining daylight hours [2,3]. That fluctuation might be explained by an altered balance between the phosphate pools, especially those in the blood and bone.

A normal diet contains 800–1400 mg of phosphate, of which 40–80% is absorbed in the intestine, mainly in the small intestine, via a transcellular pathway (active sodium-dependent transport) or a paracellular pathway (passive diffusion), favoured by the

<sup>a</sup>Laboratório de Fisiopatologia Renal LIM16, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo and

<sup>b</sup>Postgraduate Program in Medicine, Nove de Julho University, São Paulo, SP, Brazil

Correspondence to Rosa M.A. Moysés, MD, PhD, Av. Dr Arnaldo, 455, 3° andar, sala 3342, CEP 01246-903, São Paulo, SP, Brazil.

Tel: +55 11 3061 8353; e-mail: rosa.moyses@uol.com.br

**Curr Opin Nephrol Hypertens** 2022, 31:326–331

DOI:10.1097/MNH.0000000000000802

## KEY POINTS

- Assessing phosphate storage is a challenge in CKD patients, because phosphate balance is regulated by renal handling and intestinal absorption, as well as by transfer among the skeletal, extracellular and intracellular compartments.
- In dialysis patients, phosphate balance is regulated not only by the phosphate gradient but also by bone remodelling.
- Recent adjuvant strategies to control dietary phosphate absorption are under investigation in CKD models.
- Phosphate mass transfer varies according to the stage of CKD.

electrical and chemical gradients. Sodium-dependent inorganic phosphate (NaPi) cotransporters are divided into three subgroups [4]. The type I NaPi cotransporter belongs to the SLC17 transporter family, and its exact role in phosphate homeostasis is still unknown. The type II cotransporters, NaPi-IIa (encoded by *SLC34A1*) and NaPi-IIc (encoded by *SLC34A3*), are found on the brush border of proximal tubule cells, the target of phosphaturic hormones such as PTH and fibroblast growth factor 23 (FGF-23). The NaPi-IIb cotransporter (encoded by *SLC34A2*) is responsible for intestinal phosphate absorption, modulated by calcitriol. The type III NaPi cotransporters (PiT-1 and PiT-2), which belong to the SLC20 family, are expressed in several organs, including the intestine, contributing to increased intestinal absorption of phosphate. Until recently, there have been few studies evaluating paracellular transport of phosphate.

Phosphate homeostasis is regulated by the kidneys, intestinal absorption, and transfer among the skeletal, extracellular and intracellular compartments. That complex regulatory mechanism is mediated by calcitriol, PTH and FGF-23. The expression of NaPi-IIa and NaPi-IIc is decreased by PTH and FGF-23, causing phosphaturia by inhibiting tubular reabsorption. In addition, FGF-23 inhibits renal expression of 1- $\alpha$ -hydroxylase, the enzyme responsible for converting 25-hydroxyvitamin D into calcitriol, which promotes intestinal absorption of calcium and phosphate by increasing expression of PiT-2 and NaPi-IIb.

## HYPERPHOSPHATEMIA IN CHRONIC KIDNEY DISEASE

A progressive loss of kidney function can result in CKD-mineral and bone disorder (CKD-MBD). The consequent increase in FGF-23 could be explained

by a decrease in renal expression of klotho and other recently proposed mechanisms, such as increases in lipocalin-2 [5] and glycerol 3-phosphate [6]. The increase in FGF-23 stimulates phosphaturia and inhibits calcitriol production. In end-stage kidney disease (ESKD), CKD-MBD increases the risk for morbidity, fracture, cardiovascular events and mortality, by provoking a syndrome that includes vascular calcification, bone fragility and biochemical abnormalities, such as hyperphosphatemia [7]. In addition to inducing FGF-23 production and decreasing calcitriol synthesis, hyperphosphatemia has been associated with the development of hyperparathyroidism by direct or indirect mechanisms [8].

Phosphate accumulation, independent of calcium or calcitriol, causes parathyroid cell hyperplasia by activating the transforming growth factor- $\alpha$  receptor [9]. Hyperphosphatemia decreases the expression of vitamin D receptors, directly inhibits the parathyroid calcium-sensing receptor, decreases parathyroid sensitivity to calcium [10], and decreases calcitriol production (through FGF-23), thus stimulating PTH synthesis and secretion. Stabilizing the PTH mRNA molecule accelerates the synthesis process through posttranscriptional mechanisms [11].

The Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) guidelines recommend monitoring of mineral metabolism parameters, such as phosphate levels [7,12], and suggest implementing phosphate-lowering treatment to reduce phosphate levels towards the normal range in patients with advanced (stage 3–5) CKD. However, there is no evidence that treating hyperphosphatemia can prevent adverse outcomes. In fact, a recent meta-analysis involving 2498 participants [13] explored the effects of phosphate-lowering agents in CKD patients not on dialysis. Despite a reduction in serum phosphate and urinary phosphate excretion, the effects of such agents on all-cause mortality and cardiovascular events were unclear. Most of the studies analysed followed patients for 12 months or less, which may have compromised the assessment of relevant outcomes. However, there are two ongoing prospective studies – Clinical Trial #NCT03573089 and the HiLo trial [14<sup>\*</sup>] – designed to evaluate the effects of two different serum phosphate targets on mortality and hospitalization. Importantly, before recommending serum phosphate targets, we should better understand the phosphate balance in CKD. Misconceptions regarding that topic might compromise the clinical management of CKD.

## PHOSPHATE BALANCE IN CHRONIC KIDNEY DISEASE

The idea that CKD-related phosphate retention leads to adverse outcomes was based on the concept

that the phosphate balance becomes positive as CKD progresses. However, two important studies changed that dogma [15,16]. The authors of both studies evaluated patients in conservative CKD management and observed a neutral phosphate balance, which they posited to be associated with increased PTH and FGF-23. That was confirmed by experimental studies in which phosphate overload was shown to increase phosphaturia through PTH-dependent mechanisms and to decrease renal phosphate transporters, regardless of the phosphate content in the gastrointestinal tract [17]. Therefore, adequate serum phosphate or even a neutral balance is maintained at the expense of an increase in phosphaturic hormones, which could lead to adverse events.

The influence of calcitriol on intestinal absorption of phosphate in CKD patients has also been reviewed. Stremke *et al.* [18<sup>\*\*\*</sup>] showed that a phosphate-rich diet does not reduce intestinal absorption of dietary phosphate in patients with stage 3–4 CKD, despite lower calcitriol levels and higher levels of PTH and FGF-23. That is in accordance with the novel concept that transcellular absorption is greater when luminal phosphate concentrations are low [19], and that the calcitriol-independent paracellular pathway is responsible for most of the intestinal absorption of phosphate, especially when luminal phosphate concentrations are high. Recent studies have investigated the role of the sodium/hydrogen exchanger isoform 3 in paracellular phosphate absorption [20]. Tenapanor, an inhibitor of the isoform in the gastrointestinal tract, is used in the treatment of irritable bowel syndrome with constipation and reduces paracellular phosphate permeability in the intestine by decreasing intracellular pH, thus inducing conformational changes in tight junction proteins [21]. Tenapanor has also been investigated as part of a dual-mechanism approach to phosphate lowering [22<sup>■</sup>], mainly in patients on a typical (high-phosphate) western diet. Conversely, clinical studies focused on NaPi-IIb inhibition have produced disappointing results. A specific NPT-IIb inhibitor, ASP3325, was not effective in reducing serum phosphate levels or FGF-23 in hyperphosphatemic ESKD patients on dialysis [23]. In a placebo-controlled trial involving patients with stage 3–4 CKD, nicotinamide, with or without lanthanum carbonate, failed to decrease levels of phosphate or FGF-23 significantly [24]. In dialysis patients, nicotinamide and sevelamer have been shown to be equally effective in lowering serum phosphate, although patient tolerance to nicotinamide was lower after 24 weeks [25]. Nevertheless, modified-release nicotinamide administered once daily in combination with phosphate binders might be a valid option for patients on maintenance

haemodialysis [26], mainly for those already on a low-phosphate diet or phosphate binder therapy. In an animal model of CKD, a pan-phosphate transporter inhibitor that interacts with NaPi-IIb, PiT-1 and PiT-2 was shown to decrease phosphate, FGF-23 and PTH markedly [27]. In another such study, NaPi-IIa inhibition resulted in a dose-dependent increase in phosphate excretion [28]. If those effects are confirmed in a clinical setting, such options might benefit patients in whom phosphate binder treatment is ineffective.

## PHOSPHATE BALANCE IN DIALYSIS

In addition to inhibition of gastrointestinal phosphate absorption, in patients on dialysis, the lack of renal clearance requires that phosphate, a less than 500-Da molecule, be removed by dialysis. The kinetics of plasma phosphate concentration during dialysis involves the transference of phosphate among multiple compartments. At first, it was thought that dialysis removed phosphate exclusively from the intravascular compartment. However, the intracellular phosphate pool is also depleted, as depicted in a prospective study of 11 patients submitted to magnetic resonance spectroscopy during a 4-h dialysis session [29<sup>\*\*\*</sup>]. During the first half of the session, there was a reduction in phosphate levels, indicative of plasma compartment outflow. In the second half, the extracellular compartment was refilled from the intracellular and skeletal compartments. Phosphate removal appears to be continuous during conventional haemodialysis [30].

The mean phosphate removal during dialysis is 700–1200 mg/session (2.1–3.6 g/week). The significant drop in serum phosphate in the first hour of haemodialysis represents only a quarter of the total removal [30]. Potential strategies to optimize phosphate mass transfer during dialysis include increasing the surface area of the dialyzers, increasing the blood flow rate, and improving vascular access [31]. However, the most important strategy for phosphate clearance during dialysis is increasing the overall dialysis time [32], the effectiveness of which varies according to the dialysis modality [33]. A more effective dialysis regimen, involving short daily sessions [34,35] or extended overnight sessions [36], optimizes the removal of uremic toxins, including phosphate [37]. An evaluation of 455 dialysis sessions showed that at least 38 h of dialysis weekly are required to maintain normal phosphate levels in patients with a phosphate intake of 0.7 g/day not treated with binders [37]. The predialysis serum phosphate concentration also influences phosphate removal [38], and restricting dietary



phosphate may blunt postdialysis rebound [39]. Hemodiafiltration has been shown to remove higher amounts of phosphate in patients with predialysis levels below 7 mg/dl [40].

The current belief that phosphate returns to the basal level a few hours after dialysis was not confirmed in a recent study of haemodialysis patients on a low-phosphate diet with no binders [39]. In that study, phosphate returned to basal levels within the first 24 h after dialysis in less than 40% of the individuals. This is another piece of the puzzle that suggests that phosphate distribution among body compartments is complex and heterogeneous. A better understanding of that could allow us to improve treatments.

There are circadian fluctuations in phosphate levels in patients with CKD, even those on dialysis [41]. In a study of 147 haemodialysis patients [42], hyperphosphatemia was more common during the morning shift and phosphate levels were higher in the fasting state than in the postprandial state. The assessment of serum phosphate is challenging not only because of such fluctuations [43] but also because biochemical assays measure only a small proportion of the total phosphate [44].

Bone remodelling also affects phosphate balance during dialysis. In a study of 28 haemodialysis patients [45], PTH/serum osteoprotegerin ratio was shown to correlate with phosphate removal. Another study showed that high bone turnover increases calcium and phosphate mass transfer during dialysis [46<sup>\*</sup>]. Although the current concept is that phosphate removal is not affected by calcium concentration in the dialysate after a single session of dialysis [47], low calcium dialysate, in a long-term evaluation, stimulates PTH [48,49], which enhances bone remodelling and, consequently, phosphate efflux during dialysis. In contrast, higher dialysate calcium content chronically could inhibit PTH, suppress turnover and reduce phosphate removal.

In peritoneal dialysis, phosphate clearance depends on residual renal function and the peritoneal dialysis modality. Residual renal function plays a key role, accounting for more than 60% of the total phosphate clearance. In a study of 67 patients on peritoneal dialysis, reduced residual renal function was associated with higher levels of FGF-23, which was shown to be a more stable marker of phosphate metabolism than is phosphate or PTH [50]. A cross-sectional study involving 154 peritoneal dialysis patients showed that phosphate removal was greater in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) than in those undergoing continuous cyclic peritoneal dialysis (CCPD) or automated peritoneal dialysis [51]. The authors found that higher dialysate volume was associated

with higher phosphate removal, and that there was a significant correlation between peritoneal phosphate and creatinine clearances, even when patients with and without anuria were analysed separately. Another study, involving 129 peritoneal dialysis patients, demonstrated that higher peritoneal creatinine clearance and membrane transport were independently associated with peritoneal phosphate clearance [52]. The authors found that, among patients categorized as high-average transporters and low-average-low transporters, phosphate clearance was greater when CAPD was employed than when CCPD was employed. However, the two modalities were comparable in the patients considered high transporters. Peritoneal phosphate removal could be optimized by using longer dwell times and higher dialysate volumes.

## PHOSPHATE BALANCE AFTER KIDNEY TRANSPLANTATION

Although underrecognized, changes in mineral metabolism tend to persist over the first year after kidney transplantation [53] and increase the long-term risk of graft failure [54]. The 2017 KDIGO guidelines recommend that phosphate and calcium levels be measured weekly, at least in the immediate postoperative period.

Although hypophosphatemia is common in kidney transplant recipients [55], it usually resolves by the third postoperative month. Recovery of glomerular filtration rate (GFR) after kidney transplantation is accompanied by increased renal phosphate excretion. Therefore, lower phosphate levels are usually associated with favourable graft outcomes. In a multivariate analysis of 957 kidney transplant recipients followed for 9 years, severe hypophosphatemia was associated with a lower risk of death-censored graft failure and cardiovascular mortality [56]. Conversely, excessive phosphate excretion is associated with muscle weakness, and the calcium phosphate deposition in the kidney might lead to graft dysfunction [57]. If renal phosphate wasting persists despite normal phosphate levels, hyperparathyroidism may persist [58]. Although GFR improves markedly in parallel with improving graft function, patients continue to present enhanced fractional excretion of phosphate caused by elevated PTH and FGF-23. Low phosphate levels do not usually require specific treatment, although nutritional guidance is recommended. Oral phosphate salts should be prescribed with care, given that they can increase serum PTH, thus potentially decreasing tubular reabsorption of phosphate and exacerbating persistent hyperparathyroidism, in a vicious circle.

Immunosuppressive therapy might affect bone turnover by impairing osteoblasts, enhancing apoptosis, and increasing osteoclast activity. Specific drugs used in kidney transplantation, such as rapamycin and glucocorticoids, are involved in dysregulated phosphate homeostasis [59], independent of PTH. The effects of such drugs include restricted absorption of dietary phosphate [60], reduced expression of NaPi cotransporters [61], modulation of klotho expression [62], and vitamin D resistance through direct down-regulation of vitamin D receptors [63].

A prospective study of 50 kidney transplant recipients, compared with a group of GFR-matched CKD patients, indicated that FGF-23 and renal phosphate wasting improved 1 year after successful transplantation [64]. However, evidence suggests that despite the drop in FGF-23 concentration after transplantation, its levels may remain increased over the long term in kidney transplant recipients [65], in whom they are slightly higher than in the general population [66]. A study of 984 stable kidney transplant recipients demonstrated that higher FGF-23 levels correlated significantly with the rates of all-cause mortality and graft loss [67].

## CONCLUSION

Phosphate control involves a multitissue axis, being influenced by renal handling, intestinal absorption, skeletal remodelling and parathyroid function. Pending the results of ongoing studies, maintaining phosphate levels near the normal range is still a goal of the treatment of CKD patients, given the consequences of hyperphosphatemia and inadequate phosphate excretion.

Because phosphate is widely distributed throughout the body, serum levels represent a minor proportion of the total stores. Therefore, biochemical assays of blood samples might be of limited utility for predicting relevant clinical outcomes. Future studies should focus on phosphate mass transfer, which is associated with the quality of dialysis procedures. There is no evidence that the phosphate balance is altered after kidney transplantation. These studies are needed to better explain the association between dysregulated phosphate homeostasis and posttransplant outcomes.

## Acknowledgements

The authors would like to thank *Precise Editing* for translating and editing this manuscript.

## Financial support and sponsorship

R.M.A.M. and R.M.E. are the recipients of grants from the Brazilian Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq, National Council for Scientific and Technological Development). The sponsor had no role in writing this review.

## Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

## REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Khoshniat S, Bourguine A, Julien M, *et al.* The emergence of phosphate as a specific signaling molecule in bone and other cell types in mammals. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68:205–218.
2. Jubiz W, Canterbury JM, Reiss E, Tyler FH. Circadian rhythm in serum parathyroid hormone concentration in human subjects: correlation with serum calcium, phosphate, albumin, and growth hormone levels. *J Clin Invest* 1972; 51:2040–2046.
3. Portale AA, Halloran BP, Morris RC Jr. Dietary intake of phosphorus modulates the circadian rhythm in serum concentration of phosphorus. Implications for the renal production of 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Clin Invest* 1987; 80:1147–1154.
4. Werner A, Kinne RK. Evolution of the Na-P(i) cotransport systems. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280:R301–R312.
5. Courbon G, Francis C, Gerber C, *et al.* Lipocalin 2 stimulates bone fibroblast growth factor 23 production in chronic kidney disease. *Bone Res* 2021; 9:35.
6. Simic P, Kim W, Zhou W, *et al.* Glycerol-3-phosphate is an FGF23 regulator derived from the injured kidney. *J Clin Invest* 2020; 130:1513–1526.
7. 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; S1–S130.
8. Duque EJ, Elias RM, Moyses RMA. Parathyroid hormone: a uremic toxin. *Toxins (Basel)* 2020; 12:189; Published online 2020 Mar 17. doi:10.3390/toxins12030189.
9. Dusso AS, Pavlopoulos T, Naumovich L, *et al.* p21(WAF1) and transforming growth factor- $\alpha$  mediate dietary phosphate regulation of parathyroid cell growth. *Kidney Int* 2001; 59:855–865.
10. Centeno PP, Herberger A, Mun HC, *et al.* Phosphate acts directly on the calcium-sensing receptor to stimulate parathyroid hormone secretion. *Nat Commun* 2019; 10:4693.
11. Rodriguez M, Nemeth E, Martin D. The calcium-sensing receptor: a key factor in the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 288:F253–F264.
12. Kidney Disease: Improving Global Outcomes CKD-MBDWG. KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl* 2017; 7:1–59.
13. Lioufas N, Pascoe E, Hawley C, *et al.* Systematic review and meta-analyses of effects of phosphate-lowering agents in nondialysis chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2022; 33:59–76.
14. Edmonston DL, Isakova T, Dember LM, *et al.* Design and rationale of HiLo: a pragmatic, randomized trial of phosphate management for patients receiving maintenance hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 2021; 77:920–930.e1. This is a pragmatic, multicentre, open-label, cluster-randomized study that is currently enrolling patients and aims to compare clinical outcomes in response to two phosphate management strategies.
15. Hill KM, Martin BR, Wastney ME, *et al.* Oral calcium carbonate affects calcium but not phosphorus balance in stage 3-4 chronic kidney disease. *Kidney Int* 2013; 83:959–966.
16. Spiegel DM, Brady K. Calcium balance in normal individuals and in patients with chronic kidney disease on low- and high-calcium diets. *Kidney Int* 2012; 81:1116–1122.
17. Thomas L, Bettoni C, Knopfel T, *et al.* Acute adaptation to oral or intravenous phosphate requires parathyroid hormone. *J Am Soc Nephrol* 2017; 28:903–914.
18. Stremke ER, Wiese GN, Moe SM, *et al.* Intestinal phosphorus absorption in moderate CKD and healthy adults determined using a radioisotopic tracer. *J Am Soc Nephrol* 2021; 32:2057–2069. This study demonstrates that fractional intestinal absorption of phosphate is not lower in patients with moderate CKD than in healthy controls, despite lower calcitriol levels in the former.
19. Davis GR, Zerwekh JE, Parker TF, *et al.* Absorption of phosphate in the jejunum of patients with chronic renal failure before and after correction of vitamin D deficiency. *Gastroenterology* 1983; 85:908–916.

20. Saurette M, Alexander RT. Intestinal phosphate absorption: the paracellular pathway predominates? *Exp Biol Med* (Maywood) 2019; 244:646–654.
21. King AJ, Siegel M, He Y, *et al.* Inhibition of sodium/hydrogen exchanger 3 in the gastrointestinal tract by tenapanor reduces paracellular phosphate permeability. *Sci Transl Med* 2018; 10:eaa6474.
22. Pergola PE, Rosenbaum DP, Yang Y, Chertow GM. A randomized trial of tenapanor and phosphate binders as a dual-mechanism treatment for hyperphosphatemia in patients on maintenance dialysis (AMPLIFY). *J Am Soc Nephrol* 2021; 32:1465–1473.
- This double-blind phase 3 trial showed better control of hyperphosphatemia with a dual-mechanism treatment including phosphate binders and tenapanor.
23. Larsson TE, Kameoka C, Nakajo I, *et al.* NPT-11b inhibition does not improve hyperphosphatemia in CKD. *Kidney Int Rep* 2018; 3:73–80.
24. Ix JH, Isakova T, Larive B, *et al.* Effects of nicotinamide and lanthanum carbonate on serum phosphate and fibroblast growth factor-23 in CKD: the COMBINE Trial. *J Am Soc Nephrol* 2019; 30:1096–1108.
25. Lenglet A, Liabeuf S, El Esper N, *et al.* Efficacy and safety of nicotinamide in haemodialysis patients: the NICOREN study. *Nephrol Dial Transplant* 2017; 32:870–879.
26. Ketteler M, Wiecek A, Rosenkranz AR, *et al.* Efficacy and safety of a novel nicotinamide modified-release formulation in the treatment of refractory hyperphosphatemia in patients receiving hemodialysis: a randomized clinical trial. *Kidney Int Rep* 2021; 6:594–604.
27. Tsuboi Y, Ohtomo S, Ichida Y, *et al.* EOS789, a novel pan-phosphate transporter inhibitor, is effective for the treatment of chronic kidney disease-mineral bone disorder. *Kidney Int* 2020; 98:343–354.
28. Thomas L, Xue J, Murali SK, *et al.* Pharmacological Npt2a inhibition causes phosphaturia and reduces plasma phosphate in mice with normal and reduced kidney function. *J Am Soc Nephrol* 2019; 30:2128–2139.
29. Chazot G, Lemoine S, Kocevar G, *et al.* Intracellular phosphate and ATP depletion measured by magnetic resonance spectroscopy in patients receiving maintenance hemodialysis. *J Am Soc Nephrol* 2021; 32:229–237.
- This pilot prospective trial focused on phosphate removal during dialysis sessions, revealing that it is also released by the intracellular compartment, as confirmed by magnetic resonance spectroscopy.
30. Elias RM, Alvares VRC, Moyses RMA. Phosphate removal during conventional hemodialysis: a decades-old misconception. *Kidney Blood Press Res* 2018; 43:110–114.
31. Kuhlmann MK. Management of hyperphosphatemia. *Hemodial Int* 2006; 10:338–345.
32. Daugirdas JT. Removal of phosphorus by hemodialysis. *Semin Dial* 2015; 28:620–623.
33. Kuhlmann MK. Phosphate elimination in modalities of hemodialysis and peritoneal dialysis. *Blood Purif* 2010; 29:137–144.
34. Maduell F, Navarro V, Torregrosa E, *et al.* Change from three times a week on-line hemodiafiltration to short daily on-line hemodiafiltration. *Kidney Int* 2003; 64:305–313.
35. Achinger SG, Ayus JC. The role of daily dialysis in the control of hyperphosphatemia. *Kidney Int Suppl* 2005; S28–S32.
36. Lindsay RM, Alhejaili F, Nesrallah G, *et al.* Calcium and phosphate balance with quotidian hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 2003; 42(Suppl 1):24–29.
37. Kjellstrand CM, Ing TS, Kjellstrand PT, *et al.* Phosphorus dynamics during hemodialysis. *Hemodial Int* 2011; 15:226–233.
38. Leyboldt JK, Agar BU, Akonur A, *et al.* Determinants of phosphorus mobilization during hemodialysis. *Kidney Int* 2013; 84:841–848.
39. Stremke ER, Trevino L, Doshi S, *et al.* Postdialysis serum phosphate equilibrium in hemodialysis patients on a controlled diet and no binders. *Hemodial Int* 2022; 26:255–263.
40. Lornoy W, De Meester J, Becaus I, *et al.* Impact of convective flow on phosphorus removal in maintenance hemodialysis patients. *J Ren Nutr* 2006; 16:47–53.
41. Becker GJ, Walker RG, Hewitson TD, Pedagogos E. Phosphate levels: time for a rethink? *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24:2321–2324.
42. Dario KA, Dalboni MA, da Silva BC, *et al.* Predialysis serum phosphate levels according to hemodialysis shift: Circadian rhythm matters. *Hemodial Int* 2021; 25:134–136.
43. Viaene L, Meijers B, Vanrenterghem Y, Evenepoel P. Daytime rhythm and treatment-related fluctuations of serum phosphorus concentration in dialysis patients. *Am J Nephrol* 2012; 35:242–248.
44. Moorthi RN, Moe SM. CKD-mineral and bone disorder: core curriculum. *Am J Kidney Dis* 2011; 58:1022–1036.
45. Albalade M, de la Piedra C, Fernandez C, *et al.* Association between phosphate removal and markers of bone turnover in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21:1626–1632.
46. Debowska M, Dai L, Wojcik-Zaluska A, *et al.* Association between biomarkers of mineral and bone metabolism and removal of calcium and phosphate in hemodialysis. *Blood Purif* 2020; 49:71–78.
- This study shows the influence of bone turnover on calcium and phosphate balance during dialysis. Calcium removal was influenced by serum osteocalcin and osteopontin, whereas phosphate removal was associated with PTH levels.
47. Hou SH, Zhao J, Ellman CF, *et al.* Calcium and phosphorus fluxes during hemodialysis with low calcium dialysate. *Am J Kidney Dis* 1991; 18:217–224.
48. Karohl C, de Paiva Paschoal J, de Castro MC, *et al.* Effects of bone remodelling on calcium mass transfer during haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25:1244–1251.
49. Goldenstein PT, Gracioli FG, Antunes GL, *et al.* A prospective study of the influence of the skeleton on calcium mass transfer during hemodialysis. *PLoS One* 2018; 13:e0198946.
50. Isakova T, Xie H, Barchi-Chung A, *et al.* Fibroblast growth factor 23 in patients undergoing peritoneal dialysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011; 6:2688–2695.
51. Debowska M, Gomez R, Pinto J, *et al.* Phosphate clearance in peritoneal dialysis. *Sci Rep* 2020; 10:17504.
52. Badve SV, Zimmerman DL, Knoll GA, *et al.* Peritoneal phosphate clearance is influenced by peritoneal dialysis modality, independent of peritoneal transport characteristics. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3:1711–1717.
53. Malyszko J, Koc-Zorawska E, Kozminski P, *et al.* Underrecognition and underestimation of disturbances in calcium-phosphate balance in kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 2018; 50:1790–1793.
54. Araujo M, Ramalho JAM, Elias RM, *et al.* Persistent hyperparathyroidism as a risk factor for long-term graft failure: the need to discuss indication for parathyroidectomy. *Surgery* 2018; 163:1144–1150.
55. Evenepoel P, Naesens M, Claes K, *et al.* Tertiary hyperphosphatonism accentuates hypophosphatemia and suppresses calcitriol levels in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2007; 7:1193–1200.
56. van Londen M, Aarts BM, Deetman PE, *et al.* Post-transplant hypophosphatemia and the risk of death-censored graft failure and mortality after kidney transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2017; 12:1301–1310.
57. Evenepoel P, Lerut E, Naesens M, *et al.* Localization, etiology and impact of calcium phosphate deposits in renal allografts. *Am J Transplant* 2009; 9:2470–2478.
58. Tomida K, Hamano T, Ichimaru N, *et al.* Dialysis vintage and parathyroid hormone level, not fibroblast growth factor-23, determines chronic-phase phosphate wasting after renal transplantation. *Bone* 2012; 51:729–736.
59. Schwarz C, Bohmig GA, Steininger R, *et al.* Impaired phosphate handling of renal allografts is aggravated under rapamycin-based immunosuppression. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:378–382.
60. Yeh JK, Aloia JF. Effect of glucocorticoids on the passive transport of phosphate in different segments of the intestine in the rat. *Bone Miner* 1987; 2:11–19.
61. Turner ST, Kiebzak GM, Dousa TP. Mechanism of glucocorticoid effect on renal transport of phosphate. *Am J Physiol* 1982; 243:C227–C236.
62. Tataranni T, Biondi G, Cariello M, *et al.* Rapamycin-induced hypophosphatemia and insulin resistance are associated with mTORC2 activation and Klotho expression. *Am J Transplant* 2011; 11:1656–1664.
63. Lee CT, Ng HY, Lien YH, *et al.* Effects of cyclosporine, tacrolimus and rapamycin on renal calcium transport and vitamin D metabolism. *Am J Nephrol* 2011; 34:87–94.
64. Evenepoel P, Meijers BK, de Jonge H, *et al.* Recovery of hyperphosphatonism and renal phosphorus wasting one year after successful renal transplantation. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3:1829–1836.
65. Sanchez Fructuoso AI, Maestro ML, Perez-Flores I, *et al.* Serum level of fibroblast growth factor 23 in maintenance renal transplant patients. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27:4227–4235.
66. Bleskestad IH, Thorsen IS, Jonsson G, *et al.* Soluble Klotho and intact fibroblast growth factor 23 in long-term kidney transplant patients. *Eur J Endocrinol* 2015; 172:343–350.
67. Wolf M, Molnar MZ, Amaral AP, *et al.* Elevated fibroblast growth factor 23 is a risk factor for kidney transplant loss and mortality. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22:956–966.

**Apêndice B** - Parathyroid Hormone: A Uremic Toxin. *Toxins (Basel)*. 2020



Review

# Parathyroid Hormone: A Uremic Toxin

Eduardo J. Duque <sup>1</sup>, Rosilene M. Elias <sup>1,2</sup> and Rosa M. A. Moysés <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> LIM 16, Nephrology Department, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo 05403-000, Brazil; eduardojorgeduque@gmail.com (E.J.D.); rosilenemotta@hotmail.com (R.M.E.)

<sup>2</sup> Post-Graduation, Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo 01525-000, Brazil

\* Correspondence: rosa.moyses@uol.com.br

Received: 31 January 2020; Accepted: 8 March 2020; Published: 17 March 2020



**Abstract:** Parathyroid hormone (PTH) has an important role in the maintenance of serum calcium levels. It activates renal  $1\alpha$ -hydroxylase and increases the synthesis of the active form of vitamin D ( $1,25[\text{OH}]_2\text{D}_3$ ). PTH promotes calcium release from the bone and enhances tubular calcium resorption through direct action on these sites. Hallmarks of secondary hyperparathyroidism associated with chronic kidney disease (CKD) include increase in serum fibroblast growth factor 23 (FGF-23), reduction in renal  $1,25[\text{OH}]_2\text{D}_3$  production with a decline in its serum levels, decrease in intestinal calcium absorption, and, at later stages, hyperphosphatemia and high levels of PTH. In this paper, we aim to critically discuss severe CKD-related hyperparathyroidism, in which PTH, through calcium-dependent and -independent mechanisms, leads to harmful effects and manifestations of the uremic syndrome, such as bone loss, skin and soft tissue calcification, cardiomyopathy, immunodeficiency, impairment of erythropoiesis, increase of energy expenditure, and muscle weakness.

**Keywords:** parathyroid hormone; secondary hyperparathyroidism; uremic toxin

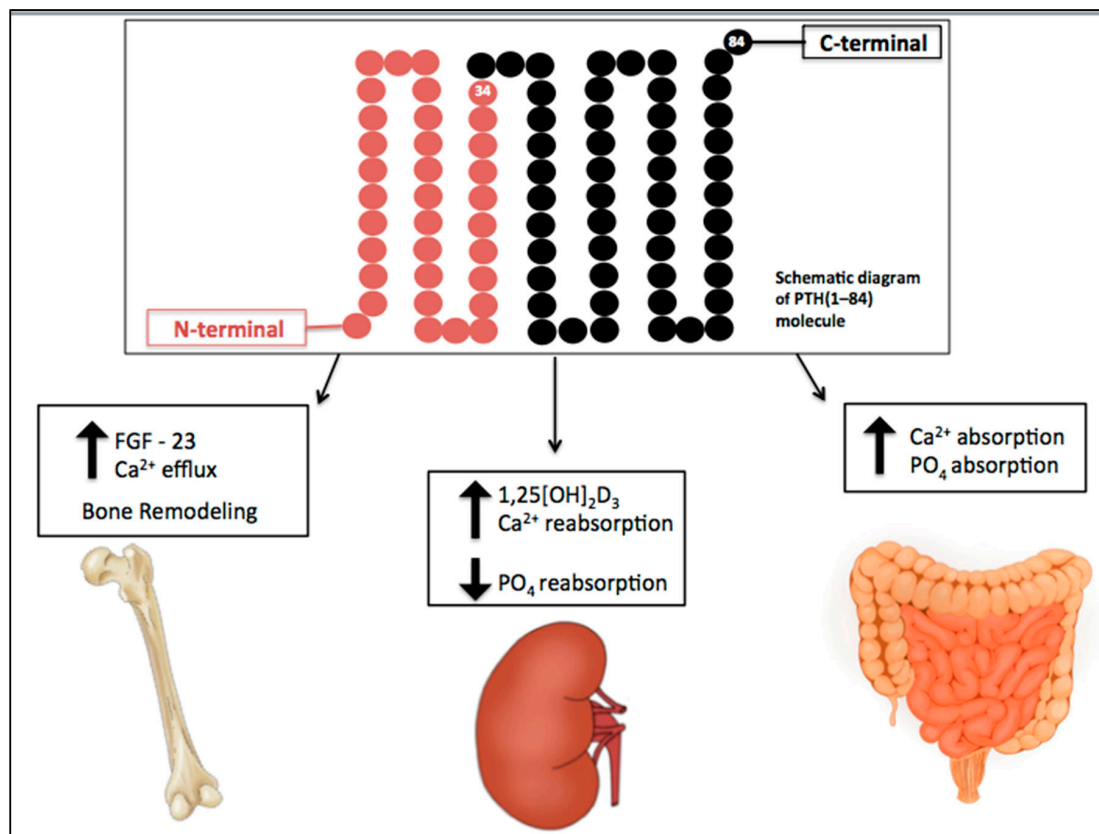
**Key Contribution:** Secondary hyperparathyroidism is a serious and common complication of CKD; with a negative impact on morbidity and mortality of patients on dialysis. Persistent high levels of PTH cause abnormalities in the cellular function of different target organs; contributing to several findings of the uremic syndrome.

## 1. Introduction

Parathyroid hormone (PTH) is a 9400 D molecular weight peptide, containing 84 amino acids that are secreted after cleavage from preproparathyroid hormone (115 amino acids) to parathyroid hormone (90 amino acids). The active biological form is the intact PTH (1–84), whose half-life in the circulation is less than three minutes, and which clearance occurs mainly in the liver (60%–70%) and kidney (20%–30%) [1].

The secretion of PTH is regulated by changes of extracellular calcium through a feedback mainly mediated by the calcium-sensing receptor (CaSR). This receptor, a G protein-coupled receptor on parathyroid cells, regulates calcium-influenced PTH secretion [2]. A reduction of ionized calcium stimulates the PTH secretion, whereas high levels suppress the PTH release and enhance calcitonin secretion.

The effects of PTH are summarized in Figure 1. In renal proximal tubular cells, PTH inhibits phosphate reabsorption and upregulates the  $1\alpha$ -hydroxylase gene, responsible for conversion of 25-hydroxyvitamin D to the active metabolite  $1,25$ -dihydroxyvitamin D ( $1,25[\text{OH}]_2\text{D}_3$ ). It also increases calcium reabsorption by inserting calcium channels in the apical membrane of distal tubules and stimulating basolateral sodium-calcium transporters [3].



**Figure 1.** Physiological actions of parathyroid hormone (PTH). PTH plays a key role in the maintenance of calcium levels. It stimulates bone turnover and calcium release from the skeleton. In renal tubular cells, PTH increases calcium reabsorption, inhibits phosphate reabsorption, and upregulates the  $1\alpha$ -hydroxylase gene, responsible for conversion of 25-hydroxyvitamin D to the active metabolite,  $1,25[\text{OH}]_2\text{D}_3$ . It also enhances calcium and phosphate intestinal absorption by increasing the production of activated vitamin D. Down arrow = decrease, Up arrow = increase.

In bone tissue, PTH influences gene expression in osteoblasts, supporting the synthesis of proteins required for bone formation and osteoclast differentiation. Intermittent exposure to PTH is antiosteoporotic and osteoanabolic via stimulation of bone formation, which is mediated by Wnt signaling activation. Upon binding to the frizzled receptor and co-receptors, LRP5 and LRP6, Wnt activates a signaling pathway, leading to translocation of beta-catenin into the nucleus, specific gene expression, protein synthesis, and bone formation. Extracellular regulators of Wnt signaling include dickkopf 1 and sclerostin, a product of the *SOST* gene expressed by osteocytes that inhibits Wnt signaling [4,5]. PTH inhibits sclerostin and, therefore, stimulates bone formation.

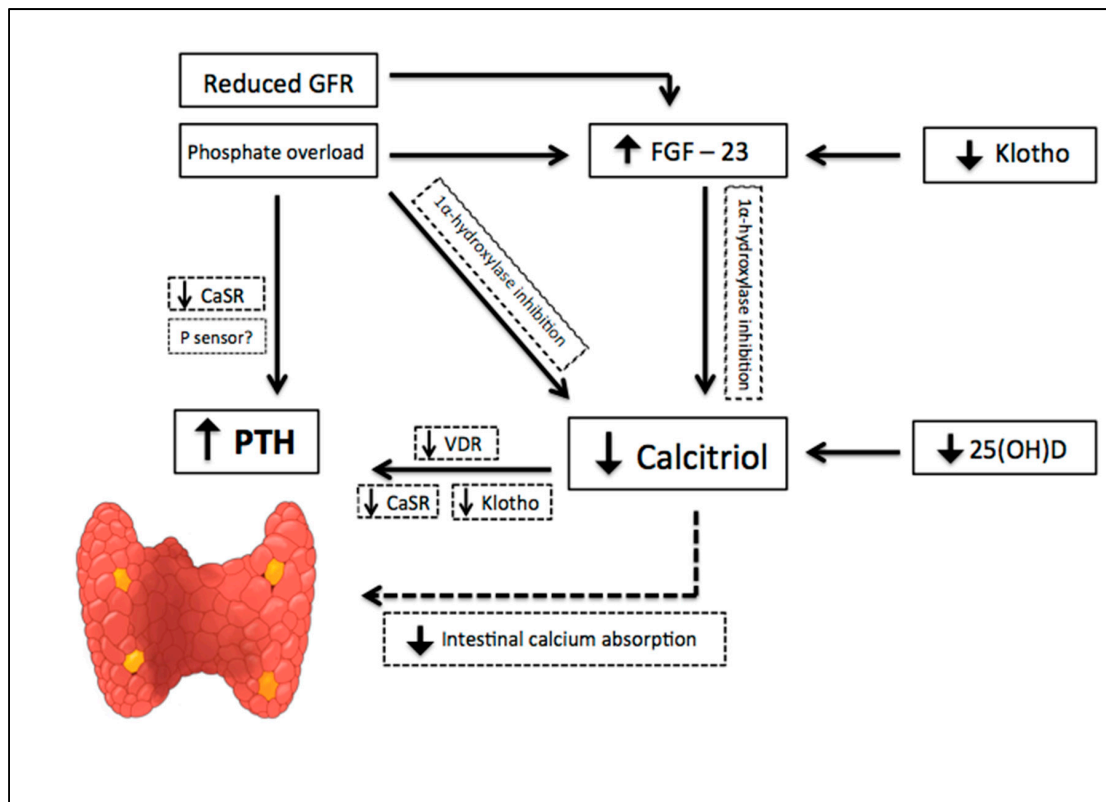
Continuous exposure to PTH increases osteoclast activity, causing osteoporotic changes [6], mostly mediated by enhancing the production of RANKL (receptor activator of nuclear factor- $\kappa\text{B}$  ligand) and decreasing the production of osteoprotegerin (OPG), a natural decoy of RANKL, by osteoblasts and stromal cell. By binding to RANK (receptor activator of nuclear factor- $\kappa\text{B}$ ), a member of the tumor necrosis factor family expressed by osteoclasts and their precursors, RANKL controls the differentiation, proliferation, and survival of osteoclasts [7]. As a result, continuous exposure to high levels of PTH causes bone loss, whereas intermittent exposure leads to bone mass gain.

## 2. CKD-Associated Secondary Hyperparathyroidism

Chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD) involves a broad systemic disorder manifested in uremic patients by disturbances in mineral and bone metabolism and extrasosseous

calcification [8]. This syndrome comprises one or a combination of the following conditions: vascular or other soft tissue calcification, vitamin D deficiency, abnormalities in bone turnover, abnormal metabolism of calcium and phosphate, an increase of levels of fibroblast growth factor-23 (FGF-23) and PTH.

The earliest abnormality that occurs with impaired kidney function is an increase in the level of FGF-23, a member of the family of the fibroblast growth factors which acts on phosphorus (P) metabolism. High FGF-23 results in increased phosphaturia, by inhibition of sodium-dependent P reabsorption (Na-P co-transporters IIa and IIc) [9], and deficiency of activated vitamin D, by inhibition of  $1\alpha$  hydroxylase [10]. For FGF-23 to exert its phosphaturic effect through FGF receptor, the klotho protein, expressed in the renal proximal tubules and parathyroid gland, is required as a cofactor. CKD progression is associated with a significant decrease in the expression of klotho, which causes high circulating levels of phosphate and vascular calcification in mice with CKD [11]. In addition, production of kidney calcitriol, the active form of vitamin D, decreases as CKD progresses. In normal conditions, calcitriol promotes intestinal absorption of calcium and phosphorus, and decreases the synthesis of PTH by binding to the vitamin D receptor (VDR) in the nucleus of the parathyroid cell. Therefore, calcitriol reduction allows an increase in the transcription of the PTH gene. Indirectly, it also stimulates PTH secretion due to a decrease in intestinal calcium absorption. Since parathyroid glands express FGF receptors and klotho [12], another mechanism regulating PTH secretion involves FGF-23, by reducing PTH mRNA through Klotho-dependent and Klotho-independent pathways [13]. However, as FGF-23 also inhibits the activity of  $1\alpha$ -hydroxylase, sustained high levels of FGF-23 are associated with an increase in PTH [10]. Calcitriol deficiency also influences the parathyroid set point for calcium-regulated PTH secretion and, possibly, decreases the expression of vitamin D and calcium receptors. Higher concentrations of calcium are needed to reduce PTH release *in vitro* from the parathyroid of uremic patients compared with healthy controls. Thus, renal klotho loss, hyperphosphatemia, vitamin D deficiency, and an increase in FGF-23 [12] are pathogenic mechanisms of hyperparathyroidism progression (Figure 2).



**Figure 2.** Pathogenic mechanisms of hyperparathyroidism progression in Chronic Kidney Disease (CKD). CKD progression is associated with phosphate overload, high levels of fibroblast growth factor-23 (FGF-23), significant decrease in the expression of klotho, and a reduction of renal calcitriol production. Calcitriol deficiency influences parathyroid set point for calcium-regulated PTH secretion and decreases the expression of vitamin D and calcium receptors. Indirectly, calcitriol deficiency also stimulates PTH secretion due to a decrease in intestinal calcium absorption. Down arrow = decrease, Up arrow = increase.

Secondary hyperparathyroidism (sHPT) is often observed in patients with CKD, mainly in those requiring dialysis therapy. PTH starts to rise when the estimated glomerular filtration rate (eGFR) drops to approximately 50 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>. Further decline of renal function results in skeletal resistance to PTH, abnormal parathyroid growth and function. Persistent high levels of PTH generate an increase in FGF-23 expression and CKD osteodystrophy, favoring high bone turnover. This condition increases bone fragility, which may explain, at least in part, the association between sHPT and increased fracture risk. Furthermore, sHPT causes hyperphosphatemia, vascular and tissue calcification, anemia (by erythropoiesis impairment), and worse quality of life. The Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS) has denoted that serum PTH higher than 600 pg/mL (63 pmol/L) is associated with a 21% increase in all-cause mortality risk [14].

Increased levels of FGF-23 and sHPT are closely related in the CKD setting. Whereas PTH acts directly on osteocytes to increase the FGF-23 expression, the FGF-23-receptor complex is downregulated in parathyroid glands, resulting in a loss of the ability of FGF-23 to decrease PTH expression. Moreover, as mentioned before, FGF-23 acts in the kidney by decreasing 1,25[OH]<sub>2</sub>D<sub>3</sub> synthesis, and therefore contributing to enhance PTH levels.

Hyperphosphatemia has been recognized as an important player in the pathogenesis of sHPT [15]. Phosphate retention directly impairs renal 1 $\alpha$ -hydroxylase activity, decreases 1,25[OH]<sub>2</sub>D<sub>3</sub> synthesis, and affects posttranscriptional events that ultimately influence PTH mRNA stability and hormone synthesis. As CKD progresses, high phosphate levels influence the expression of factors involved in cell cycle regulation and parathyroid cell proliferation [16], and promote resistance to the actions



of calcitriol in the parathyroid glands. High phosphate levels induce progression of sHPT and resistance to the effects of PTH in the bone. Moreover, it has been recently shown that phosphate at high concentrations acts as a noncompetitive antagonist of the CaSR, resulting in an increase of PTH secretion [17]. However, we should keep in mind that not only phosphate but other uremic toxins, such as indoxyl sulfate, are known to interfere with vitamin D metabolism and promote sHPT progression [18], as well as bone resistance to PTH.

Therapeutic arsenal for the treatment of sHPT includes calcitriol and vitamin D analogs, calcimimetics, and phosphate binders. Parathyroidectomy (PTX) is the surgical treatment indicated for cases with refractory hypercalcemia/hyperphosphatemia and severe symptoms such as extra skeletal calcification/calciophylaxis, intractable pruritus, and bone pain.

### 3. Effects of sHPT on BONE

Chronic PTH excess and bone resorption markers are associated with abnormal cortical and trabecular density, and fractures [19]. Cortical bone contributes to the mechanical strength of the skeleton, and this compartment is more adversely affected by hyperparathyroidism than the trabecular bone [20,21]. A histomorphometric evaluation in primary hyperparathyroidism has depicted that PTH promotes periosteal resorption and intracortical porosity [22].

A longitudinal study of 53 patients with stages 2 to 5 CKD, including those on dialysis, has shown that hyperparathyroidism and high serum concentration of bone turnover markers were associated with significant cortical loss, detected by dual-energy X-ray absorptiometry and high-resolution peripheral quantitative computed tomography [23]. The association of high levels of PTH and cortical porosity was also shown in dialysis patients [20]. In a post hoc analysis of the BRIC study, we observed an increased cortical porosity, evaluated through bone histomorphometry, which was associated with PTH levels, but not with the trabecular bone turnover [20].

In contrast to this effect in the cortical compartment, chronic excess of PTH might act as an anabolic agent for trabecular bone, increasing trabecular number and thickness [24]. Mice with prenatal conditional ablation of the PTH receptor (PTHR) by homologous recombination exhibit decreased trabecular bone compartment and increased thickness of cortical bone during fetal development [25].

Beyond consequences of PTH excess, the association between low levels of PTH and fractures is also a matter of debate. A U-shaped relationship between PTH and vertebral fractures has been shown in dialysis patients [26]. Moreover, Coco et al. [27] demonstrated a higher risk of hip fracture in patients on dialysis with lower PTH (around 195 pg/mL), and Iimori et al. [28] confirmed a high risk of fracture in patients with PTH levels below 150 pg/mL. However, according to Danese et al. [29], the risks for hip and vertebral fracture are weakly associated with PTH levels among patients on dialysis, with the lowest risk observed around a PTH concentration of 300 pg/mL.

Skeletal resistance to the PTH calcemic regulation further compromises the ability to maintain calcium levels in patients with advanced renal disease [30]. This resistance is not restricted to the effects of PTH on calcium release from the skeleton, but also involves the action of the hormone on the response of the bone cells [31]. We and others have shown increased bone expression of sclerostin in CKD patients [32,33], suggesting that this Wnt pathway inhibitor is related to the bone resistance to PTH. As a consequence, high serum PTH levels are needed to induce equivalent biologic responses in patients with CKD. Albeit some studies have described a down-regulation of PTHR in the context of CKD [34], we showed higher expression of PTHR1 in the osteocytes, mostly in earlier CKD stages [32]. However, this receptor activity was not evaluated in the mentioned study, and the current belief is that the PTHR activity might be compromised.

Some studies suggest that the transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) has a role in bone remodeling, regulating the recruitment of osteoclasts and osteoblasts. Downregulation of hormones and cytokines, such as IGF-1, IL-11, and TGF- $\beta$ 1, may be associated with age-related bone loss [35]. In vitro studies have shown that TGF- $\beta$  increases the synthesis of bone proteins by osteoblastic cells [36], and local injection of TGF- $\beta$  under the periosteum stimulates bone formation [37]. In contrast, transgenic mice

overexpressing osteoblast-specific truncated TGF- $\beta$  receptor present an increase in trabecular bone mass and a decrease in bone remodeling [38]. Furthermore, mice with knockout of the osteoblast TGF- $\beta$  receptor develop a decrease in cortical bone and an increase in trabecular compartment, which is similar to the phenotype of animals expressing an active PTHR [39]. Thus, due to its dual effect, a fine balance of TGF- $\beta$  production is required to prevent bone loss.

Pieces of evidence indicate that PTH and TGF- $\beta$  operate together to exert their biological activities in the bone. Higher expression of TGF- $\beta$  protein has been noted in high-turnover bones of patients with end-stage renal disease. In uremic animals, renal FGF-23 expression correlates with local TGF- $\beta$  expression [40]. Patients with renal osteodystrophy have significantly higher levels of TGF- $\beta$  than those without this condition [41]. Indeed, Santos et al. [42] demonstrated a significant high TGF- $\beta$  expression in bone of patients with sHPT, which has improved after PTX.

PTH receptors are present in tissues unrelated to calcium homeostasis [43], but little is known about PTHR downregulation in the CKD context. Therefore, it is unknown whether PTH excessive levels, required to keep trabecular bone remodeling, might contribute to deleterious actions on nonclassical target organs.

#### 4. Effects of sHPT on Cardiovascular System

sHPT promotes cardiovascular disease, regardless of calcium or phosphate levels [44]. There is some evidence of a correlation between serum levels of PTH and hypertension [45]. A study with 1784 individuals with mild renal dysfunction or normal eGFR followed for seven years revealed that PTH levels were able to predict hypertension in men, even after adjustments for age, smoking, and body mass index [46]. In addition, a meta-analysis with six prospective cohort studies, involving a total of 18,994 participants, showed that increased levels of PTH may be associated with a higher risk of hypertension [47]. Despite the evidence linking PTH with hypertension, the unanswered question is whether this relationship is causal. In particular, changes in systemic calcium metabolism are thought to play an important role in the regulation of blood pressure. Leiba et al. [48] have described some cases of hypertensive end-stage renal disease patients, who had a sudden drop in blood pressure after PTX. Heyliger et al. [49] documented a significant decrease in both systolic and diastolic blood pressure in 147 patients with hypertension undergoing PTX.

Parathyroid hyperfunction is associated with endothelial dysfunction and myocardial hypertrophy. In experimental studies using a rat model of CKD (5/6 nephrectomy) submitted to PTX, the continuous infusion of supraphysiological rates of 1–34 PTH was associated with myocardial hypertrophy and fibrosis along with a high myocardial expression of oxidative stress and inflammation markers [50]. There is an association between PTH levels, myocardial hypertrophy, and mortality, in patients with sHPT and in individuals from the general population [51]. An analysis with 2040 individuals has found that in women under 60 years and men over 59 years, PTH was a significant predictor of left ventricular hypertrophy [51].

PTH stimulation on cardiomyocytes promotes an increase in synthesis and expression of fetal-type proteins via activation of protein kinase C and affects contractile function by inhibiting  $\beta$ -adrenoceptor-mediated effects through the same pathway [52]. Therefore, this effect of PTH might suppress cardiomyocyte contractility.

Besides the aforementioned effect on cardiomyocytes, PTH acts on cardiac fibroblasts, inducing cardiac fibrosis in uremia [53]. As a promoter of fibroblast proliferation, TGF- $\beta$  also generates cardiac fibrosis, as well as cardiomyocyte apoptosis and cardiac hypertrophy [54]. Beyond its role in bone turnover, PTH may mediate cardiovascular fibrosis and apoptosis through the TGF- $\beta$  signaling pathway.

PTH might indirectly induce myocardial hypertrophy by increasing FGF-23 synthesis. High levels of FGF-23 have also been linked to left ventricular hypertrophy and mortality in patients with CKD. According to Gutierrez et al. [55], high levels of FGF-23 were independently associated with left ventricular hypertrophy in a group of 162 patients with CKD, not on dialysis. Furthermore, an experimental study has shown a direct effect of FGF-23 on myocardial hypertrophy [56].

CKD is associated with a high prevalence of arteriosclerosis or stiffening of the arteries independently of the presence of significant atherosclerosis. Calcification of the intimal and medial layers of vessels has an important role for arterial stiffening, and it is a key feature of the arterial disease in the kidney disease setting. Elevations in serum phosphate, calcium, and calcium-phosphate product, among other factors, are intimately involved in promoting calcification. Vascular calcification has been frequently documented in primary hyperparathyroidism and sHPT, although its pathophysiology is still a matter of debate. The question is whether there is a direct deleterious effect of PTH on vessels. An experimental study has shown that exposure of vascular endothelial cells to PTH led to decreased expression of the mRNA of OPG, a known protection factor of endothelial tissue [57]. However, the administration of 1–34 PTH to young mice has attenuated the progression of aortic valve calcification in a model of CKD [58]. Therefore, the association of long-term exposure of high PTH levels with vascular and valvular calcification [59] is probably explained by the large supply of calcium and phosphate from high bone turnover [60]. Indeed, sHPT is associated with an increased risk of calcific uremic arteriolopathy, also known as calciphylaxis. Elevations in phosphate and calcium levels compromise the vasculature, resulting in ischemic changes and plaque-like lesions that progress to painful skin lesions [61]. The prognosis of this condition is poor, and patients' survival generally reaches one year, in the best scenario [62].

In summary, although the role of PTH in mediating the RANK/RANKL/OPG axis in skeletal and extraskeletal calcification [63] has not yet been elucidated, this hormone should be included in the list of mediators of the bone–vascular interaction.

### **5. Effects of sHPT on CKD Progression**

A recent meta-analysis suggests an independent association between serum phosphate levels, kidney failure, and mortality among patients with CKD not requiring dialysis [64]. Increased levels of phosphate may lead to tubular injury, interstitial fibrosis, endothelial dysfunction, and vascular calcification via phosphate or calcium-phosphate crystals [65].

A retrospective cohort study with 13,772 incident patients on hemodialysis has revealed an association between the decline of residual kidney function and abnormalities of MBD, such as high levels of phosphate, intact PTH, alkaline phosphatase, and low levels of calcium [66]. It has also been shown that diabetic predialysis CKD patients with sHPT usually require greater healthcare resource utilization and experience a faster kidney disease progression with a higher risk of dialysis initiation or death when compared with predialysis diabetic patients with CKD but without sHPT [67].

### **6. Effects of sHPT on CKD-Related Cachexia and Energy Expenditure**

Muscle weakness is another condition possibly associated with hyperparathyroidism in patients with CKD, whose physiologic basis is not completely understood. Some studies using muscle biopsies of patients with CKD have revealed a decrease in muscle mitochondrial oxidative enzymes, such as citrate synthase and cytochrome c oxidase, and a decrease in the synthesis of contractile muscle proteins, myosin heavy chain, and mitochondrial proteins [68].

The diagnosis of uremic myopathy is based on clinical features and a multifactorial origin, caused by physical inactivity, reduced protein intake, immunological and myocellular alterations, inflammation, metabolic acidosis, abnormalities in insulin-like growth factor, and myostatin expression. Most of these mechanisms stimulate the ATP-dependent ubiquitin-proteasome system (UPS), one of the most important intracellular proteolysis pathways [69]. In addition, vitamin D deficiency is also recognized as a risk factor for CKD-related myopathy [70].

Experimental evidence supports the toxic effect of PTH on muscles. Animals exposed to high doses of PTH for four days showed muscle dysfunction, including a reduction of mitochondrial activity and a decrease in high-energy phosphate [71]. Gomez-Fernandez et al. [72] have described the weakness of the respiratory muscles in correlation with PTH levels.

Weight loss, a common feature of advanced CKD, might be related to the excess of PTH levels. CKD patients with sHPT who undergo PTX present, in general, a significant magnitude of weight gain (more than 5% above the baseline) [73]. Interestingly, patients undergoing dialysis with sHPT present an increase of resting energy expenditure that reduces significantly six months after PTX [74].

Kir et al. [75] uncovered evidence that PTH and PTH-related protein (PTHrP) signal, through the same receptor, work as potential mediators of body weight loss, in association with browning of adipose tissue and loss of muscle mass. They observed that injection of cancer cells into mice was responsible for increased concentration of PTHrP, with capacity to activate the uncoupling protein-1, inducing “browning” of white adipose tissue and energy generation. The pathway to browning includes PTH/PTHrP activation of protein kinase A and loss of muscle mass via the UPS. Deletion of PTHR abrogates the muscle atrophy and changes the regulation of thermogenic genes in mice with 5/6 nephrectomy.

This finding revealed that the deletion of PTHR in animal models acts as a critical factor for resistance to the development of sarcopenia. A higher concentration of brown adipose tissue might be an important factor associated with muscle wasting in CKD by increasing energy expenditure.

## 7. Effect of sHPT on Glucose Metabolism

Glucose intolerance is another condition associated with uremia, possibly due to decreased insulin secretion. Some evidence suggests that PTH has a role in this event since insulin resistance has been noted in patients with primary hyperparathyroidism [76]. There is, however, no convincing evidence of such effect in uremia.

Experimental studies in uremic animals have demonstrated an action of PTH on protein kinase C promoting an increase of cytosolic calcium in pancreatic islets. Excess PTH may interfere with the ability of the beta-cells to augment insulin secretion appropriately, affecting insulin secretion by calcium-dependent mechanisms [77]. Ahamed et al. [78] have documented a negative correlation between PTH and fasting insulin in uremic patients. Patients with severe hyperparathyroidism had relatively more impairment of pancreatic beta-cell function in comparison with those with mild hyperparathyroidism, and an intravenous dose of 1-cholecalciferol has been associated with an improvement of beta-cell function.

Mak et al. [79] have shown that patients on dialysis with 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> deficiency and sHPT were glucose-intolerant and insulin-resistant. After intravenous administration of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, there was an increase of insulin secretion and an improvement of glucose tolerance. These events occurred without any change in serum PTH concentration. An improvement of glucose tolerance and insulin secretion has been described in children with uremia after handling sHPT markers, by phosphate restriction and oral phosphate binders [80]. Therefore, changes in metabolism could be explained by a reduction of PTH, phosphate and/or FGF-23 levels, as well as by normalization of serum calcitriol.

However, some studies have shown that the undercarboxylated form of osteocalcin, an osteoblast-specific protein, is associated with energy metabolism regulation [81]. Infusion of undercarboxylated osteocalcin improves glucose tolerance and insulin resistance in mice with insulin receptor deletion [82]. In sHPT, there is a PTH-mediated increase of carboxylated and undercarboxylated osteocalcin, which might lead to an increase in insulin sensitivity and energy expenditure [83]. Thus, these conflicting actions of PTH on glucose metabolism should be addressed in future studies.

## 8. Effect of sHPT on Central Nervous System

Toxic effects of PTH on the central nervous system have been suggested. The mechanism might involve an increase of levels of cytosolic calcium in brain synaptic terminals since the removal of parathyroid is capable to prevent an excess of calcium in uremic brains [84]. Guisado et al. [85] have shown a correlation between changes in the electroencephalogram (EEG), similar to those presented in the chronic uremia context, with the increase of brain calcium content. Furthermore, PTX before

uremia induction prevented EEG abnormalities, whereas the administration of parathyroid extracts to healthy animals induced EEG changes similar to those observed in uremic animals.

It has also been suggested a harmful effect of PTH on cognitive function in CKD patients. However, there is still weak support due to the lack of research in this area [86].

### 9. Effect of sHPT on Hematopoietic and Immunological System

Hyperparathyroidism aggravates hematopoietic dysfunction [87], inhibiting erythropoiesis, accelerating erythrocyte sedimentation rate, and increasing osmotic fragility of erythrocytes through Ca-ATPase stimulation [88]. Elevated levels of PTH cause fibrosis of bone marrow [89], related to the synergism between FGF and TGF- $\beta$  action on myofibroblast transdifferentiation. A regression of medullary fibrosis was demonstrated one year after PTX in uremic patients, accompanied by a reduction in IL-1, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , and FGF [42].

Cell-mediated immunity, involving lymphocyte function, is abnormal in uremia [90]. Chronic exposure to PTH is associated with a reduction of T lymphocyte proliferation, cytokine production, and impairment of immunoglobulins production. There are some beneficial effects of PTX on the immunologic parameters in the sHPT context. In this regard, patients with CKD on maintenance dialysis followed prospectively for one year after PTX presented an improvement in serum immunoglobulins and complement titles. This improvement in humoral immunity after PTX occurs probably due to the remarkable reduction of PTH, which directly affects B-cells, and partially improved nutritional state [91]. Thus, abnormalities of the “uremic immunodeficiency” may be related to the degree of sHPT.

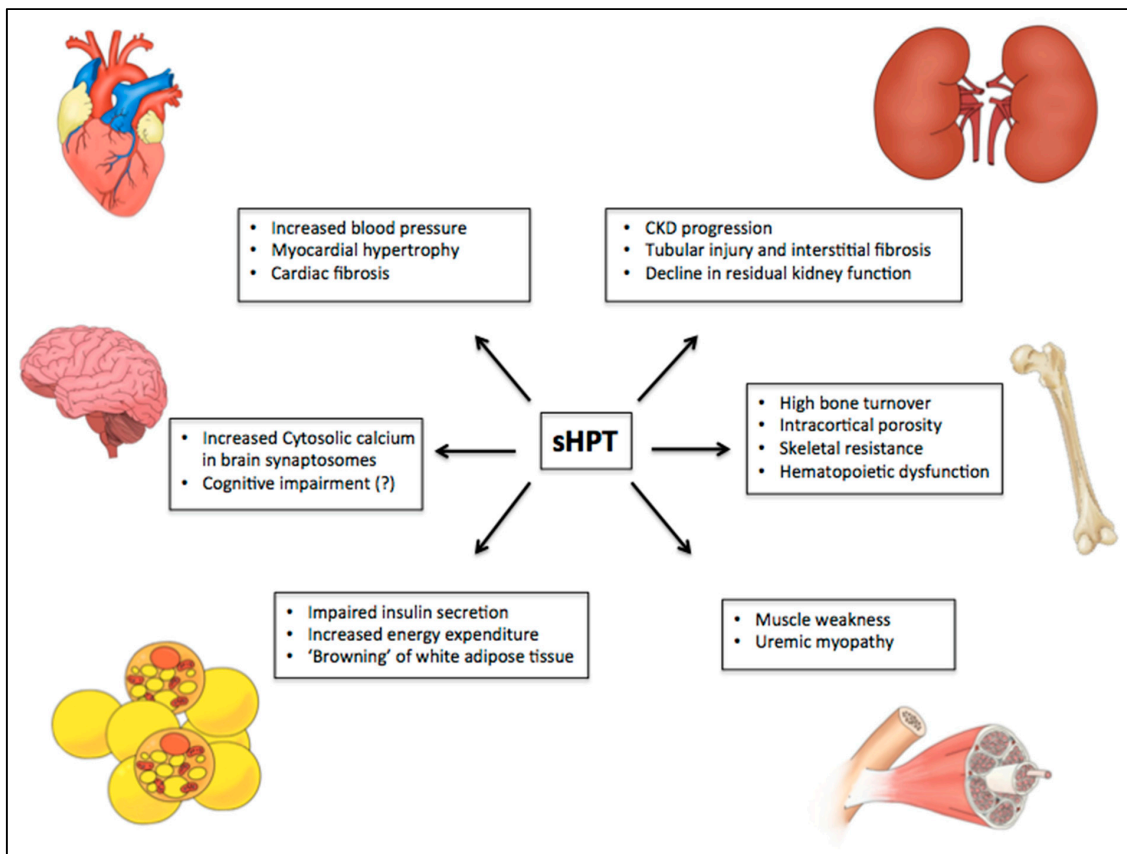
Interestingly, T lymphocytes are essential to the PTH-mediated bone homeostasis. Some authors have shown the role of T lymphocytes in PTH-mediated skeleton homeostasis, suggesting that the immune system is essential to the bone actions of PTH. Hory et al. [92] have reported that transplantation of human parathyroid into athymic mice did not promote bone resorption. A subsequent study by Pettway et al. [93] has suggested an involvement between T cells and bone response to PTH. Intermittent PTH treatment could induce a faint anabolic response in the trabecular bone compartment of T cell-deficient mice.

### 10. Conclusions

sHPT has significant clinical implications not restricted to the pathophysiology of some mineral and bone metabolism disorder. There is a substantial body of evidence that supports the role of PTH in the pathogenesis of abnormalities in cell function, contributing to several uremic findings in patients with CKD by increasing intracellular calcium. The presence of PTH receptors in different tissues unrelated to calcium homeostasis may be the reason for such a number of nonclassical effects of severe sHPT.

The diversity of toxic effects involves myocardial dysfunction, cardiac hypertrophy, muscle weakness, osmotic fragility of erythrocytes, glucose intolerance, and abnormalities of the immune system (Figure 3). Moreover, there is evidence that PTX restores some of these organ dysfunctions, as shown in Table 1.





**Figure 3.** PTH-related manifestations on different target organs in uremic syndrome. Some studies have suggested the role of PTH in uremic syndrome through calcium-dependent and independent mechanisms. Among several toxic actions, it has been shown an association of high levels of PTH with myocardial hypertrophy and cardiovascular disease, nervous system disorders, development of sarcopenia, progression of chronic kidney disease, hematopoietic dysfunction, reduced insulin secretion by pancreatic beta-cells, increase of energy expenditure, “browning” of white adipose tissue, and high bone turnover with significant cortical compartment loss. CKD: chronic kidney disease.

**Table 1.** PTH-related manifestations and beneficial effects of Parathyroidectomy.

PTH-Related Manifestations	Parathyroidectomy Effects	Ref.
Hypertension Myocardial hypertrophy	Blood pressure reduction Beneficial effect on cardiovascular mortality	[44,46]
Abnormal bone density (mainly in cortical compartment)	Improvement of bone mineral density at lumbar spine and femoral neck	[19,94]
Increase of levels of cytosolic calcium in brain synaptic terminals	Improvement of cognitive function Prevention of electroencephalogram abnormalities in uremic animals	[85,95]
Hematopoietic dysfunction Accelerate erythrocyte sedimentation rate Increase of osmotic fragility of erythrocytes	Improvement of anemia Regression of medullar fibrosis	[87,96]
Reduction of T lymphocyte proliferation and cytokine production Impairment of immunoglobulins production	Improvement on serum immunoglobulins and complement titles	[90,91]
Increase in all-cause mortality risk	Improve of survival in patients with severe secondary Hyperparathyroidism Improvement of quality of life	[14,97]

Therefore, in view of the several adverse effects of high levels of PTH, a true uremic toxin, there is a need for closer monitoring for its levels in patients with CKD, in order to achieve more rigorous and early control of sHPT.

**Funding:** Drs Moyses and Elias are supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). This financial support had no role in writing this review.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Goodman, W.G.; Salusky, I.B.; Juppner, H. New lessons from old assays: Parathyroid hormone (PTH), its receptors, and the potential biological relevance of PTH fragments. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2002**, *17*, 1731–1736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Conigrave, A.D. The calcium-sensing receptor and the parathyroid: Past, present, future. *Front. Physiol.* **2016**, *7*, 563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Blaine, J.; Chonchol, M.; Levi, M. Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* **2015**, *10*, 1257–1272. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Baron, R.; Kneissel, M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: From human mutations to treatments. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 179–192. [[CrossRef](#)]
5. Baron, R.; Rawadi, G. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. *Endocrinology* **2007**, *148*, 2635–2643. [[CrossRef](#)]
6. Jilka, R.L. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone* **2007**, *40*, 1434–1446. [[CrossRef](#)]
7. Hofbauer, L.C.; Khosla, S.; Dunstan, C.R.; Lacey, D.L.; Boyle, W.J.; Riggs, B.L. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* **2000**, *15*, 2–12. [[CrossRef](#)]
8. National Kidney, F. K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am. J. Kidney Dis.* **2003**, *42*, S1–S201.
9. Murer, H.; Hernando, N.; Forster, I.; Biber, J. Regulation of Na/Pi transporter in the proximal tubule. *Annu. Rev. Physiol.* **2003**, *65*, 531–542. [[CrossRef](#)]
10. Silver, J.; Naveh-Many, T. FGF-23 and secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.* **2013**, *9*, 641–649. [[CrossRef](#)]
11. Hu, M.C.; Shi, M.; Zhang, J.; Quinones, H.; Griffith, C.; Kuro-o, M.; Moe, O.W. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **2011**, *22*, 124–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Martin, A.; David, V.; Quarles, L.D. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. *Physiol. Rev.* **2012**, *92*, 131–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Olauson, H.; Lindberg, K.; Amin, R.; Sato, T.; Jia, T.; Goetz, R.; Mohammadi, M.; Andersson, G.; Lanske, B.; Larsson, T.E. Parathyroid-specific deletion of Klotho unravels a novel calcineurin-dependent FGF23 signaling pathway that regulates PTH secretion. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003975. [[CrossRef](#)]
14. Tentori, F.; Blayney, M.J.; Albert, J.M.; Gillespie, B.W.; Kerr, P.G.; Bommer, J.; Young, E.W.; Akizawa, T.; Akiba, T.; Pisoni, R.L.; et al. Mortality risk for dialysis patients with different levels of serum calcium, phosphorus, and PTH: The Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Am. J. Kidney Dis.* **2008**, *52*, 519–530. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Naveh-Many, T.; Rahamimov, R.; Livni, N.; Silver, J. Parathyroid cell proliferation in normal and chronic renal failure rats. The effects of calcium, phosphate, and vitamin D. *J. Clin. Investig.* **1995**, *96*, 1786–1793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Denda, M.; Finch, J.; Slatopolsky, E. Phosphorus accelerates the development of parathyroid hyperplasia and secondary hyperparathyroidism in rats with renal failure. *Am. J. Kidney Dis.* **1996**, *28*, 596–602. [[CrossRef](#)]
17. Centeno, P.P.; Herberger, A.; Mun, H.C.; Tu, C.; Nemeth, E.F.; Chang, W.; Conigrave, A.D.; Ward, D.T. Phosphate acts directly on the calcium-sensing receptor to stimulate parathyroid hormone secretion. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4693. [[CrossRef](#)]

18. Goto, S.; Fujii, H.; Hamada, Y.; Yoshiya, K.; Fukagawa, M. Association between indoxyl sulfate and skeletal resistance in hemodialysis patients. *Ther. Apher. Dial.* **2010**, *14*, 417–423. [[CrossRef](#)]
19. Nickolas, T.L.; Cremers, S.; Zhang, A.; Thomas, V.; Stein, E.; Cohen, A.; Chauncey, R.; Nikkel, L.; Yin, M.T.; Liu, X.S.; et al. Discriminants of prevalent fractures in chronic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **2011**, *22*, 1560–1572. [[CrossRef](#)]
20. Araujo, M.J.; Karohl, C.; Elias, R.M.; Barreto, F.C.; Barreto, D.V.; Canziani, M.E.; Carvalho, A.B.; Jorgetti, V.; Moyses, R.M. The pitfall of treating low bone turnover: Effects on cortical porosity. *Bone* **2016**, *91*, 75–80. [[CrossRef](#)]
21. Moe, S.M.; Chen, N.X.; Newman, C.L.; Gattone, V.H., 2nd; Organ, J.M.; Chen, X.; Allen, M.R. A comparison of calcium to zoledronic acid for improvement of cortical bone in an animal model of CKD. *J. Bone Miner. Res.* **2014**, *29*, 902–910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Duan, Y.; De Luca, V.; Seeman, E. Parathyroid hormone deficiency and excess: Similar effects on trabecular bone but differing effects on cortical bone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1999**, *84*, 718–722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Nickolas, T.L.; Stein, E.M.; Dworakowski, E.; Nishiyama, K.K.; Komandah-Kosseh, M.; Zhang, C.A.; McMahon, D.J.; Liu, X.S.; Boutroy, S.; Cremers, S.; et al. Rapid cortical bone loss in patients with chronic kidney disease. *J. Bone Miner. Res.* **2013**, *28*, 1811–1820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Parfitt, A.M. Hormonal influences on bone remodeling and bone loss: Application to the management of primary hyperparathyroidism. *Ann. Intern. Med.* **1996**, *125*, 413–415. [[CrossRef](#)]
25. Lanske, B.; Amling, M.; Neff, L.; Guiducci, J.; Baron, R.; Kronenberg, H.M. Ablation of the PTHrP gene or the PTH/PTHrP receptor gene leads to distinct abnormalities in bone development. *J. Clin. Invest.* **1999**, *104*, 399–407. [[CrossRef](#)]
26. Jansz, T.T.; Goto, N.A.; van Ballegooijen, A.J.; Willems, H.C.; Verhaar, M.C.; van Jaarsveld, B.C. The prevalence and incidence of vertebral fractures in end-stage renal disease and the role of parathyroid hormone. *Osteoporos. Int.* **2019**, 1–10. [[CrossRef](#)]
27. Coco, M.; Rush, H. Increased incidence of hip fractures in dialysis patients with low serum parathyroid hormone. *Am. J. Kidney Dis.* **2000**, *36*, 1115–1121. [[CrossRef](#)]
28. Iimori, S.; Mori, Y.; Akita, W.; Kuyama, T.; Takada, S.; Asai, T.; Kuwahara, M.; Sasaki, S.; Tsukamoto, Y. Diagnostic usefulness of bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in predicting fracture in CKD stage 5D patients—a single-center cohort study. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2012**, *27*, 345–351. [[CrossRef](#)]
29. Danese, M.D.; Kim, J.; Doan, Q.V.; Dylan, M.; Griffiths, R.; Chertow, G.M. PTH and the risks for hip, vertebral, and pelvic fractures among patients on dialysis. *Am. J. Kidney Dis.* **2006**, *47*, 149–156. [[CrossRef](#)]
30. Fukagawa, M.; Kazama, J.J.; Shigematsu, T. Skeletal resistance to pth as a basic abnormality underlying uremic bone diseases. *Am. J. Kidney Dis.* **2001**, *38*, S152–S155. [[CrossRef](#)]
31. Iwasaki-Ishizuka, Y.; Yamato, H.; Nii-Kono, T.; Kurokawa, K.; Fukagawa, M. Downregulation of parathyroid hormone receptor gene expression and osteoblastic dysfunction associated with skeletal resistance to parathyroid hormone in a rat model of renal failure with low turnover bone. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2005**, *20*, 1904–1911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Graciolli, F.G.; Neves, K.R.; Barreto, F.; Barreto, D.V.; Dos Reis, L.M.; Canziani, M.E.; Sabbagh, Y.; Carvalho, A.B.; Jorgetti, V.; Elias, R.M.; et al. The complexity of chronic kidney disease-mineral and bone disorder across stages of chronic kidney disease. *Kidney Int.* **2017**, *91*, 1436–1446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Boltensal, H.; Qureshi, A.R.; Behets, G.J.; Lindholm, B.; Stenvinkel, P.; D’Haese, P.C.; Haarhaus, M. Association of serum sclerostin with bone sclerostin in chronic kidney disease is lost in glucocorticoid treated patients. *Calcif. Tissue Int.* **2019**, *104*, 214–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Picton, M.L.; Moore, P.R.; Mawer, E.B.; Houghton, D.; Freemont, A.J.; Hutchison, A.J.; Gokal, R.; Hoyland, J.A. Down-regulation of human osteoblast PTH/PTHrP receptor mRNA in end-stage renal failure. *Kidney Int.* **2000**, *58*, 1440–1449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Manolagas, S.C. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.* **2000**, *21*, 115–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Bonewald, L.F.; Dallas, S.L. Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation. *J. Cell. Biochem.* **1994**, *55*, 350–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Noda, M.; Camilliere, J.J. In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. *Endocrinology* **1989**, *124*, 2991–2994. [[CrossRef](#)]



38. Filvaroff, E.; Erlebacher, A.; Ye, J.; Gitelman, S.E.; Lotz, J.; Heilman, M.; Derynck, R. Inhibition of TGF-beta receptor signaling in osteoblasts leads to decreased bone remodeling and increased trabecular bone mass. *Development* **1999**, *126*, 4267–4279.
39. Qiu, T.; Wu, X.; Zhang, F.; Clemens, T.L.; Wan, M.; Cao, X. TGF-beta type II receptor phosphorylates PTH receptor to integrate bone remodelling signalling. *Nat. Cell Biol.* **2010**, *12*, 224–234. [[CrossRef](#)]
40. Mace, M.L.; Gravesen, E.; Nordholm, A.; Hofman-Bang, J.; Secher, T.; Olgaard, K.; Lewin, E. Kidney fibroblast growth factor 23 does not contribute to elevation of its circulating levels in uremia. *Kidney Int.* **2017**, *92*, 165–178. [[CrossRef](#)]
41. Jiang, X.; Kanai, H.; Shigehara, T.; Maezawa, A.; Yano, S.; Naruse, T. Metabolism of transforming growth factor-beta in patients receiving hemodialysis especially those with renal osteodystrophy. *Ren. Fail.* **1998**, *20*, 135–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Santos, F.R.; Moyses, R.M.; Montenegro, F.L.; Jorgetti, V.; Noronha, I.L. IL-1beta, TNF-alpha, TGF-beta, and bFGF expression in bone biopsies before and after parathyroidectomy. *Kidney Int.* **2003**, *63*, 899–907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ritz, E.; Stefanski, A.; Rambauser, M. The role of the parathyroid glands in the uremic syndrome. *Am. J. Kidney Dis.* **1995**, *26*, 808–813. [[CrossRef](#)]
44. Lishmanov, A.; Dorairajan, S.; Pak, Y.; Chaudhary, K.; Chockalingam, A. Elevated serum parathyroid hormone is a cardiovascular risk factor in moderate chronic kidney disease. *Int. Urol. Nephrol.* **2012**, *44*, 541–547. [[CrossRef](#)]
45. Jorde, R.; Sundsfjord, J.; Haug, E.; Bonna, K.H. Relation between low calcium intake, parathyroid hormone, and blood pressure. *Hypertension* **2000**, *35*, 1154–1159. [[CrossRef](#)]
46. Jorde, R.; Svartberg, J.; Sundsfjord, J. Serum parathyroid hormone as a predictor of increase in systolic blood pressure in men. *J Hypertens* **2005**, *23*, 1639–1644. [[CrossRef](#)]
47. Zhang, Y.; Zhang, D.Z. Circulating parathyroid hormone and risk of hypertension: A meta-analysis. *Clin. Chim. Acta* **2018**, *482*, 40–45. [[CrossRef](#)]
48. Leiba, A.; Cohen, M.S.; Dinour, D.; Holtzman, E.J. Severe and long-lasting hypotension occurring immediately after parathyroidectomy in hypertensive hemodialysis patients: A case series. *J. Hum. Hypertens.* **2013**, *27*, 399–401. [[CrossRef](#)]
49. Heyliger, A.; Tangpricha, V.; Weber, C.; Sharma, J. Parathyroidectomy decreases systolic and diastolic blood pressure in hypertensive patients with primary hyperparathyroidism. *Surgery* **2009**, *146*, 1042–1047. [[CrossRef](#)]
50. Custodio, M.R.; Koike, M.K.; Neves, K.R.; dos Reis, L.M.; Gracioli, F.G.; Neves, C.L.; Batista, D.G.; Magalhaes, A.O.; Hawlitschek, P.; Oliveira, I.B.; et al. Parathyroid hormone and phosphorus overload in uremia: Impact on cardiovascular system. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2012**, *27*, 1437–1445. [[CrossRef](#)]
51. Saleh, F.N.; Schirmer, H.; Sundsfjord, J.; Jorde, R. Parathyroid hormone and left ventricular hypertrophy. *Eur. Heart J.* **2003**, *24*, 2054–2060. [[CrossRef](#)]
52. Schlüter, K.-D.; Piper, H.M. Cardiovascular actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Cardiovasc. Res.* **1998**, *37*, 34–41. [[CrossRef](#)]
53. Amann, K.; Ritz, E.; Wiest, G.; Klaus, G.; Mall, G. A role of parathyroid hormone for the activation of cardiac fibroblasts in uremia. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **1994**, *4*, 1814–1819. [[PubMed](#)]
54. Huntgeburth, M.; Tiemann, K.; Shahverdyan, R.; Schluter, K.D.; Schreckenber, R.; Gross, M.L.; Modersheim, S.; Caglayan, E.; Muller-Ehmsen, J.; Ghanem, A.; et al. Transforming growth factor beta(1) oppositely regulates the hypertrophic and contractile response to beta-adrenergic stimulation in the heart. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e26628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Gutierrez, O.M.; Januzzi, J.L.; Isakova, T.; Laliberte, K.; Smith, K.; Collerone, G.; Sarwar, A.; Hoffmann, U.; Coglianese, E.; Christenson, R.; et al. Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease. *Circulation* **2009**, *119*, 2545–2552. [[CrossRef](#)]
56. Faul, C.; Amaral, A.P.; Oskouei, B.; Hu, M.C.; Sloan, A.; Isakova, T.; Gutierrez, O.M.; Aguillon-Prada, R.; Lincoln, J.; Hare, J.M.; et al. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J. Clin. Investig.* **2011**, *121*, 4393–4408. [[CrossRef](#)]
57. Rashid, G.; Plotkin, E.; Klein, O.; Green, J.; Bernheim, J.; Benchetrit, S. Parathyroid hormone decreases endothelial osteoprotegerin secretion: Role of protein kinase A and C. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **2009**, *296*, F60–F66. [[CrossRef](#)]

58. Shao, J.S.; Cheng, S.L.; Charlton-Kachigian, N.; Loewy, A.P.; Towler, D.A. Teriparatide (human parathyroid hormone (1–34)) inhibits osteogenic vascular calcification in diabetic low density lipoprotein receptor-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 50195–50202. [[CrossRef](#)]
59. Linefsky, J.P.; O'Brien, K.D.; Katz, R.; de Boer, I.H.; Barasch, E.; Jenny, N.S.; Siscovick, D.S.; Kestenbaum, B. Association of serum phosphate levels with aortic valve sclerosis and annular calcification: The cardiovascular health study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2011**, *58*, 291–297. [[CrossRef](#)]
60. Neves, K.R.; Gracioli, F.G.; dos Reis, L.M.; Gracioli, R.G.; Neves, C.L.; Magalhaes, A.O.; Custodio, M.R.; Batista, D.G.; Jorgetti, V.; Moyses, R.M. Vascular calcification: Contribution of parathyroid hormone in renal failure. *Kidney Int.* **2007**, *71*, 1262–1270. [[CrossRef](#)]
61. McCarthy, J.T.; El-Azhary, R.A.; Patzelt, M.T.; Weaver, A.L.; Albright, R.C.; Bridges, A.D.; Claus, P.L.; Davis, M.D.; Dillon, J.J.; El-Zoghby, Z.M.; et al. Survival, risk factors, and effect of treatment in 101 patients with calciphylaxis. *Mayo Clin. Proc.* **2016**, *91*, 1384–1394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Nigwekar, S.U.; Zhao, S.; Wenger, J.; Hymes, J.L.; Maddux, F.W.; Thadhani, R.I.; Chan, K.E. A nationally representative study of calcific uremic arteriopathy risk factors. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **2016**, *27*, 3421–3429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Hofbauer, L.C.; Brueck, C.C.; Shanahan, C.M.; Schoppet, M.; Dobnig, H. Vascular calcification and osteoporosis—from clinical observation towards molecular understanding. *Osteoporos. Int.* **2007**, *18*, 251–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Da, J.; Xie, X.; Wolf, M.; Disthabanchong, S.; Wang, J.; Zha, Y.; Lv, J.; Zhang, L.; Wang, H. Serum phosphorus and progression of CKD and mortality: A meta-analysis of cohort studies. *Am. J. Kidney Dis.* **2015**, *66*, 258–265. [[CrossRef](#)]
65. Neves, K.R.; Gracioli, F.G.; dos Reis, L.M.; Pasqualucci, C.A.; Moyses, R.M.; Jorgetti, V. Adverse effects of hyperphosphatemia on myocardial hypertrophy, renal function, and bone in rats with renal failure. *Kidney Int.* **2004**, *66*, 2237–2244. [[CrossRef](#)]
66. Lee, Y.J.; Okuda, Y.; Sy, J.; Obi, Y.; Kang, D.H.; Nguyen, S.; Hsiung, J.T.; Park, C.; Rhee, C.M.; Kovesdy, C.P.; et al. Association of mineral bone disorder with decline in residual kidney function in incident hemodialysis patients. *J. Bone Miner. Res.* **2019**, *35*, 317–325. [[CrossRef](#)]
67. Schumock, G.T.; Andress, D.L.; Marx, S.E.; Sterz, R.; Joyce, A.T.; Kalantar-Zadeh, K. Association of secondary hyperparathyroidism with CKD progression, health care costs and survival in diabetic predialysis CKD patients. *Nephron. Clin. Pract.* **2009**, *113*, c54–c61. [[CrossRef](#)]
68. Adey, D.; Kumar, R.; McCarthy, J.T.; Nair, K.S. Reduced synthesis of muscle proteins in chronic renal failure. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2000**, *278*, E219–E225. [[CrossRef](#)]
69. Workeneh, B.T.; Mitch, W.E. Review of muscle wasting associated with chronic kidney disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *91*, 1128S–1132S. [[CrossRef](#)]
70. Molina, P.; Carrero, J.J.; Bover, J.; Chauveau, P.; Mazzaferro, S.; Torres, P.U.; European Renal, N.; Chronic Kidney, D.-M.; Bone Disorder Working Groups of the European Renal Association-European Dialysis Transplant Association. Vitamin D, a modulator of musculoskeletal health in chronic kidney disease. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **2017**, *8*, 686–701. [[CrossRef](#)]
71. Baczynski, R.; Massry, S.G.; Magott, M.; el-Belbessi, S.; Kohan, R.; Brautbar, N. Effect of parathyroid hormone on energy metabolism of skeletal muscle. *Kidney Int.* **1985**, *28*, 722–727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Gomez-Fernandez, P.; Sanchez Agudo, L.; Calatrava, J.M.; Martinez, M.E.; Escuin Sancho, F.; Selgas, R.; Sanchez Sicilia, L. Parathormone as a uremic toxin. Possible effect on respiratory muscle function in uremia. *Med. Clin.* **1984**, *82*, 395–397.
73. Khajehdehi, P.; Ali, M.; Al-Gebory, F.; Henry, G.; Bastani, B. The effects of parathyroidectomy on nutritional and biochemical status of hemodialysis patients with severe secondary hyperparathyroidism. *J. Ren. Nutr.* **1999**, *9*, 186–191. [[CrossRef](#)]
74. Cuppari, L.; de Carvalho, A.B.; Avesani, C.M.; Kamimura, M.A.; Dos Santos Lobao, R.R.; Draibe, S.A. Increased resting energy expenditure in hemodialysis patients with severe hyperparathyroidism. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **2004**, *15*, 2933–2939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Kir, S.; Komaba, H.; Garcia, A.P.; Economopoulos, K.P.; Liu, W.; Lanske, B.; Hodin, R.A.; Spiegelman, B.M. PTH/PTHrP receptor mediates cachexia in models of kidney failure and cancer. *Cell Metab.* **2016**, *23*, 315–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

76. Fadda, G.Z.; Akmal, M.; Premdas, F.H.; Lipson, L.G.; Massry, S.G. Insulin release from pancreatic islets: Effects of CRF and excess PTH. *Kidney Int.* **1988**, *33*, 1066–1072. [[CrossRef](#)]
77. Amend, W.J., Jr.; Steinberg, S.M.; Lowrie, E.G.; Lazarus, J.M.; Soeldner, J.S.; Hampers, C.L.; Merrill, J.P. The influence of serum calcium and parathyroid hormone upon glucose metabolism in uremia. *J. Lab. Clin. Med.* **1975**, *86*, 435–444.
78. Ahamed, N.A.; Abdul-Aziz, M.Y.; El-Bauomy, A.; Salem, T.S. Parathyroid hormone: effects on glucose homeostasis and insulin sensitivity in chronic renal failure patients on regular hemodialysis. *J. Taibah Univ. Med. Sci.* **2008**, *3*, 44–54. [[CrossRef](#)]
79. Mak, R.H. Intravenous 1,25 dihydroxycholecalciferol corrects glucose intolerance in hemodialysis patients. *Kidney Int.* **1992**, *41*, 1049–1054. [[CrossRef](#)]
80. Mak, R.H.; Turner, C.; Haycock, G.B.; Chantler, C. Secondary hyperparathyroidism and glucose intolerance in children with uremia. *Kidney Int. Suppl.* **1983**, *16*, S128–S133.
81. Wolf, G. Energy regulation by the skeleton. *Nutr. Rev.* **2008**, *66*, 229–233. [[CrossRef](#)]
82. Fulzele, K.; Riddle, R.C.; DiGirolamo, D.J.; Cao, X.; Wan, C.; Chen, D.; Faugere, M.C.; Aja, S.; Hussain, M.A.; Bruning, J.C.; et al. Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell* **2010**, *142*, 309–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Goldenstein, P.T.; Gracioli, F.G.; Antunes, G.L.; Dominguez, W.V.; Dos Reis, L.M.; Moe, S.; Elias, R.M.; Jorgetti, V.; Moyses, R.M.A. A prospective study of the influence of the skeleton on calcium mass transfer during hemodialysis. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0198946. [[CrossRef](#)]
84. Fraser, C.L.; Sarnacki, P.; Arieff, A.I. Calcium transport abnormality in uremic rat brain synaptosomes. *J. Clin. Investig.* **1985**, *76*, 1789–1795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Guisado, R.; Arieff, A.I.; Massry, S.G.; Lazarowitz, V.; Kerian, A. Changes in the electroencephalogram in acute uremia. Effects of parathyroid hormone and brain electrolytes. *J. Clin. Investig.* **1975**, *55*, 738–745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Lourida, I.; Thompson-Coon, J.; Dickens, C.M.; Soni, M.; Kuzma, E.; Kos, K.; Llewellyn, D.J. Parathyroid hormone, cognitive function and dementia: A systematic review. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0127574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Meytes, D.; Bogin, E.; Ma, A.; Dukes, P.P.; Massry, S.G. Effect of parathyroid hormone on erythropoiesis. *J. Clin. Investig.* **1981**, *67*, 1263–1269. [[CrossRef](#)]
88. Levi, J.; Malachi, T.; Djaldetti, M.; Bogin, E. Biochemical changes associated with the osmotic fragility of young and mature erythrocytes caused by parathyroid hormone in relation to the uremic syndrome. *Clin. Biochem.* **1987**, *20*, 121–125. [[CrossRef](#)]
89. Brickman, A.S.; Sherrard, D.J.; Jowsey, J.; Singer, F.R.; Baylink, D.J.; Maloney, N.; Massry, S.G.; Norman, A.W.; Coburn, J.W. 1,25-dihydroxycholecalciferol. Effect on skeletal lesions and plasma parathyroid hormone levels in uremic osteodystrophy. *Arch. Intern. Med.* **1974**, *134*, 883–888. [[CrossRef](#)]
90. Klinger, M.; Alexiewicz, J.M.; Linker-Israeli, M.; Pitts, T.O.; Gaciong, Z.; Fadda, G.Z.; Massry, S.G. Effect of parathyroid hormone on human T cell activation. *Kidney Int.* **1990**, *37*, 1543–1551. [[CrossRef](#)]
91. Yasunaga, C.; Nakamoto, M.; Matsuo, K.; Nishihara, G.; Yoshida, T.; Goya, T. Effects of a parathyroidectomy on the immune system and nutritional condition in chronic dialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Am. J. Surg.* **1999**, *178*, 332–336. [[CrossRef](#)]
92. Hory, B.G.; Roussanne, M.C.; Rostand, S.; Bourdeau, A.; Drueke, T.B.; Gogusev, J. Absence of response to human parathyroid hormone in athymic mice grafted with human parathyroid adenoma, hyperplasia or parathyroid cells maintained in culture. *J. Endocrinol. Investig.* **2000**, *23*, 273–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Pettway, G.J.; Schneider, A.; Koh, A.J.; Widjaja, E.; Morris, M.D.; Meganck, J.A.; Goldstein, S.A.; McCauley, L.K. Anabolic actions of PTH (1-34): Use of a novel tissue engineering model to investigate temporal effects on bone. *Bone* **2005**, *36*, 959–970. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Chou, F.F.; Chen, J.B.; Lee, C.H.; Chen, S.H.; Sheen-Chen, S.M. Parathyroidectomy can improve bone mineral density in patients with symptomatic secondary hyperparathyroidism. *Arch. Surg.* **2001**, *136*, 1064–1068. [[CrossRef](#)]
95. Chou, F.F.; Chen, J.B.; Hsieh, K.C.; Liou, C.W. Cognitive changes after parathyroidectomy in patients with secondary hyperparathyroidism. *Surgery* **2008**, *143*, 526–532. [[CrossRef](#)]

96. Mandolfo, S.; Malberti, F.; Farina, M.; Villa, G.; Scanziani, R.; Surian, M.; Imbasciati, E. Parathyroidectomy and response to erythropoietin therapy in anaemic patients with chronic renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* **1998**, *13*, 2708–2709. [[CrossRef](#)]
97. Goldenstein, P.T.; Elias, R.M.; Pires de Freitas do Carmo, L.; Coelho, F.O.; Magalhaes, L.P.; Antunes, G.L.; Custodio, M.R.; Montenegro, F.L.; Titan, S.M.; Jorgetti, V.; et al. Parathyroidectomy improves survival in patients with severe hyperparathyroidism: A comparative study. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e68870. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Apêndice C** - Nephrology picture: bone loss due to absence of adequate therapy for severe secondary hyperparathyroidism. *J Nephrol.* 2022



# Nephrology picture: bone loss due to absence of adequate therapy for severe secondary hyperparathyroidism

Eduardo J. Duque<sup>1</sup> · Rosilene M. Elias<sup>1,2</sup> · Vanda Jorgetti<sup>1</sup> · Rosa M. A. Moysés<sup>1</sup>

Received: 27 September 2022 / Accepted: 10 October 2022 / Published online: 1 November 2022  
© The Author(s) under exclusive licence to Italian Society of Nephrology 2022

**Keywords** Secondary hyperparathyroidism · Osteoporosis · Parathyroidectomy · Chronic kidney disease

A 43-year-old black female was referred to our service in 2017 due to severe secondary hyperparathyroidism (SHPT). She had hypertension and had been on hemodialysis since 2010, thrice weekly for 4 h, via an arteriovenous fistula. She presented with diffuse bone pain, limited walking, requiring a wheelchair for mobility, and restricted light physical activity. She was on 0.5 µg of oral calcitriol thrice weekly.

Initially, cinacalcet 30 mg/day was started and surgical treatment was proposed, but the patient refused. Symptoms worsened with a loss of 15 cm in height and severe kyphosis. Two years later, in 2019, a plain lateral radiograph (Fig. 1A, B) and chest tomography revealed a collapsed T11 vertebra (Fig. 1E) and diffuse bone demineralization. In addition, prominent thickening with diffuse alteration of the signal of the cortical bones of the femurs and muscle atrophy was shown by thigh magnetic resonance imaging (Fig. 1F). Cinacalcet dose was increased to 90 mg/day, but laboratory tests pointed to advanced hyperparathyroidism. Due to the lack of clinical response to drug treatment, the patient agreed to undergo parathyroidectomy (PTX) and surgery was scheduled. However, due to the limited number of hospital beds during the coronavirus pandemic, the procedure was postponed. Densitometry was repeated in September 2020, with a significant 18.9% and 9% loss in bone density of the total hip and femoral neck sites, respectively (Sup. Table 1B).

In October 2020 she underwent total PTX with parathyroid autotransplantation on the forearm. Whole-body

dual-energy x-ray absorptiometry was repeated in March 2021 and in April 2022. She presented a remarkable bone mineral content increase of 17.6% and 44% at 6 and 18 months, respectively (Sup. Fig. 1).

SHPT is a common morbid condition in patients with chronic kidney disease (CKD). In CKD patients, PTH acts as a uremic toxin due to its deleterious effects on several systems [1]. In the context of advanced SHPT, the compartment of the cortical bone, which is responsible for skeletal resistance, is more severely affected than the trabecular bone [2]. PTX is an effective therapeutic procedure for advanced SHPT that does not respond to clinical treatment. The improvement of symptoms occurs shortly after surgery, and some harmful effects, such as soft-tissue calcification and cardiovascular complications, may be reversible [3, 4]. In this case, the delayed surgical procedure resulted in considerable bone mineral density (BMD) decline in the year prior to PTX, as well as the development of bone deformities, fractures, and worsening of functional capacity. A significant worsening in total BMD (−7%) was noted, mainly in the hip, which is a cortical bone site. Despite the improvement in functionality after PTX, the patient has irreversible sequelae, including bone deformities and collapsed vertebrae. Although uncommon, these complications still exist, due to the lack of adequate therapy and stress the need for close and early control of SHPT.

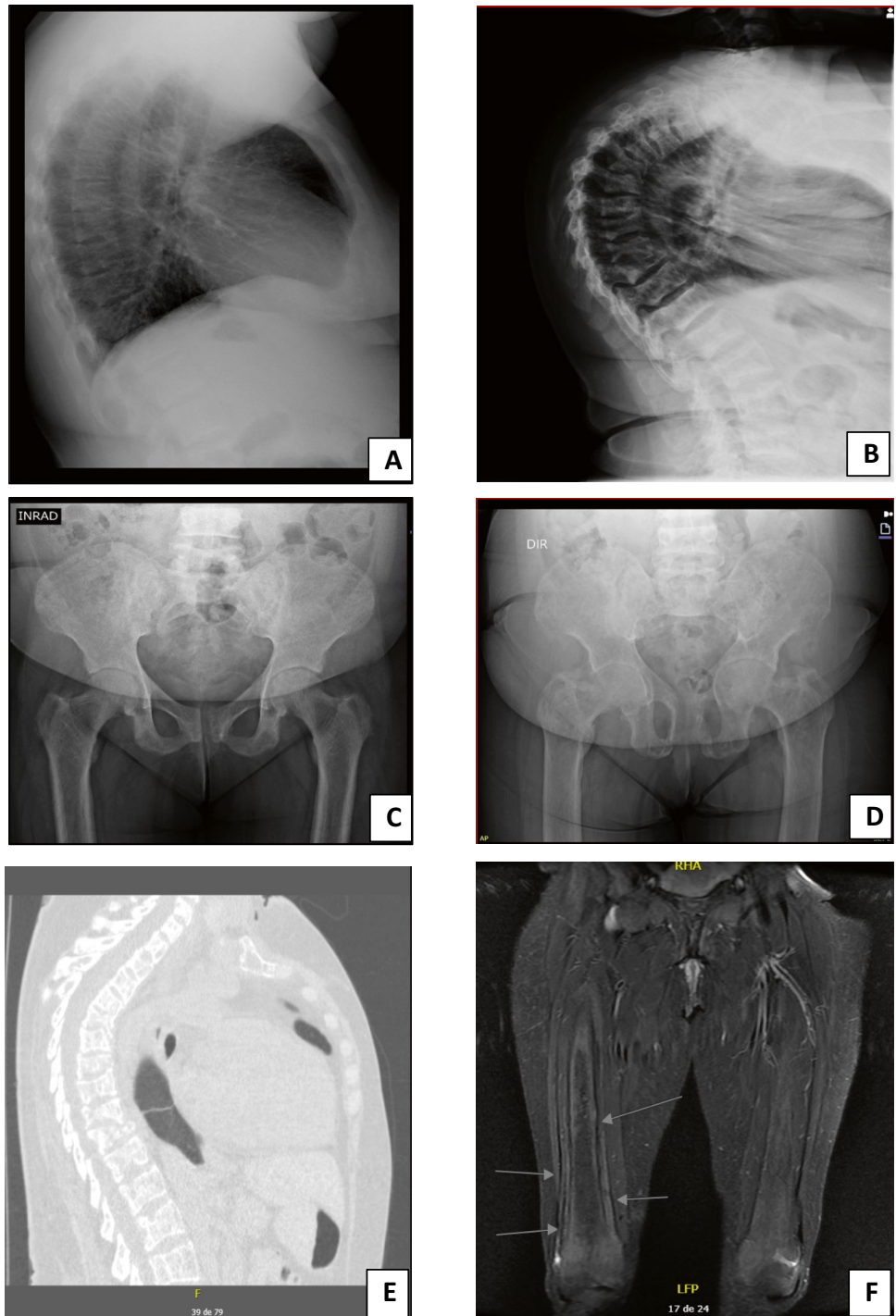
✉ Eduardo J. Duque  
eduardojorgeduque@gmail.com

<sup>1</sup> Nephrology Department, Laboratório de Investigação Médica 16, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>2</sup> Universidade Nove de Julho (UNINOVE), São Paulo, SP, Brazil



**Fig. 1** Imaging studies of the evolution of SHPT without adequate therapy. **A, B** Plain chest x-rays revealing marked kyphosis due to collapse of the vertebrae after loss to follow-up. **C, D** Hip radiographs show development of brown tumor and pubic symphysis diastasis. **E** Chest tomography. **F** Magnetic resonance imaging



**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s40620-022-01496-6>.

**Funding** The author(s) RME, VJ and RMAM disclosed receipt of support from CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), grant # 304901/2021–0, 307900/2021–5 and 303545/2020–8, respectively. The author RMAM disclosed receipt of support from FAPESP (Fundação de Auxílio à Pesquisa do Estado de São Paulo), grant # 2019/14583–4. 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.

## Declarations

**Conflict of interests** The authors declare that they have no conflict of interests.

**Ethical approval** The patient was enrolled in a protocol approved by the Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (CAPPesq 87886218.7.0000.0068).

**Consent for publication** All authors approved.

## References

1. Duque EJ, Elias RM, Moyses RMA (2020) Parathyroid hormone: a uremic toxin. *Toxins (Basel)* 12(3):189
2. Araujo MJ, Karohl C, Elias RM, Barreto FC, Barreto DV, Canziani ME, Carvalho AB, Jorgetti V, Moyses RM (2016) The pitfall of treating low bone turnover: effects on cortical porosity. *Bone* 91:75–80
3. Pessoa M, Santo RM, De Deus AA, Duque EJ, Rochitte CE, Moyses RMA, Elias RM (2021) Corneal and conjunctival calcification in a dialysis patient reversed by parathyroidectomy. *Blood Purif* 50:254–256
4. Goto N, Tominaga Y, Matsuoka S, Sato T, Katayama A, Haba T, Uchida K (2005) Cardiovascular complications caused by advanced secondary hyperparathyroidism in chronic dialysis patients; special focus on dilated cardiomyopathy. *Clin Exp Nephrol* 9:138–141

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Supplementary material:

Figure 1. Bone mineral density (%) evolution preoperatively and postoperatively

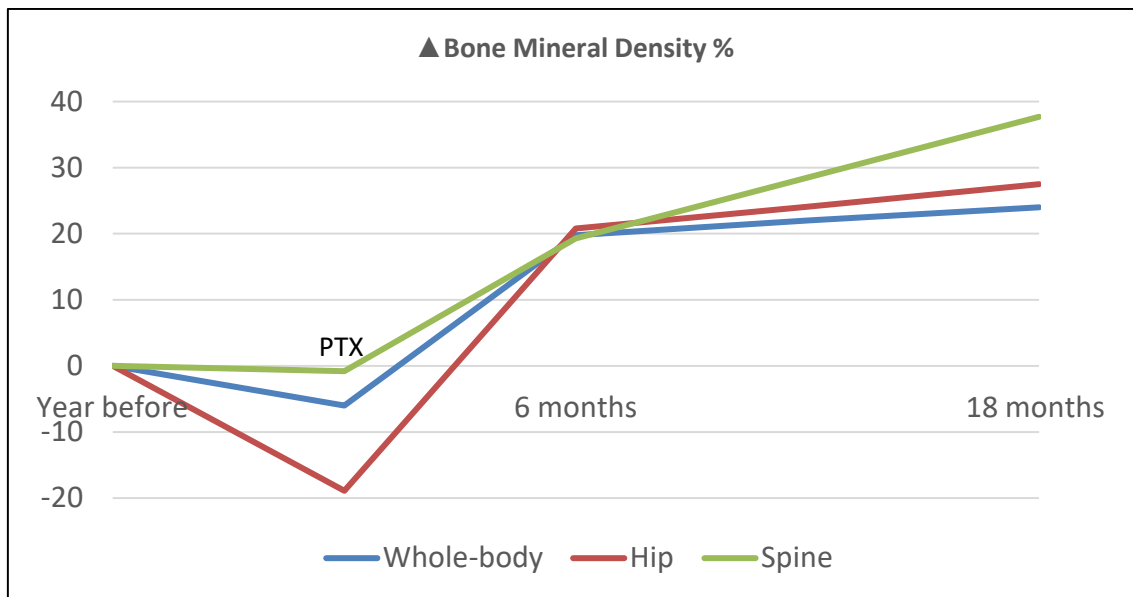


Table 1. Biochemical (A) and DXA parameters (B) evolution preoperatively and postoperatively

A

	Year before	PTX	6m after	18 m after	Reference
PTH	2,658	3,234	280	11	15-65 pg/ml
ALP	1,803	3,018	338	188	35–104 U/L
Ca	5.08	5.06	4.07	3.94	4.9-5.2 mg/dl
P	5.8	5.0	2.6	2.2	2.7-4.5 mg/dl
25vitD	19	12	38	25	30–60 ng/dl
Meds	Cinacalcet 90mg/d	Cinacalcet 90mg/d	Calcitriol 2 µg/d + CaCO <sub>3</sub> 16g/d	Calcitriol 1.5 µg/d + CaCO <sub>3</sub> 8 g/d	

B

<b>DXA parameters</b>	Year before	PTX	6m after	18 m after
Appendicular mass (Kg)	14,596	13,133	13,393	14,402
%FAT	50.9	47.6	47.9	47.9
Visceral fat (g)	1,238	1,010	974	1,043
BMC (g)	1,593	1,481	1,742	2,129
TBS	1.229	1.352	1.334	1.457
%ΔtotalBMD		- 7	+ 19.8	+ 24
Lower spine				
BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.843	0.836	0.997	1.367
T-score	-2.3	-3	-1.8	1.2
Δ BMD%		- 0.8	+19.3	+37.7
Total Hip				
BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.677	0.549	0.663	0.845
T-score	-2.6	-3.6	-2.7	-1.3
Δ BMD%		- 18.9	+20.8	+27.5
Femoral neck				
BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.571	0.516	0.654	0.879
T-score	-3.4	- 3.8	-2.8	-1.1
Δ BMD%		- 9.0	+26.7	+34.4

PTH: parathormone; ALP: alkaline phosphatase; Ca: calcium; P: phosphate; 25vitD: 25-hydroxyvitamin D; CaCO<sub>3</sub>: calcium carbonate; FAT: fat mass; BMC: bone mineral content; TBS: trabecular bone score; BMD: bone mineral density; PTX: parathyroidectomy