

Cristiane Bitencourt Dias

Doença óssea em glomerulopatia primária

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

Área de concentração: Nefrologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Viktoria Woronik

São Paulo

2006

À MINHA FAMÍLIA – MEUS AMORES

Meu pai, Antonio Ferreira Dias, que muita falta me faz.

Minha mãe, Ana Bitencourt Dias, cuja força me permite estudar e acalma
minha saudade.

Meus irmãos, Eduardo, Rafael e Dayana, que me fazem sentir sempre
amada.

Meus sobrinhos, Thiago e Cadu, alegrias da minha vida.

Minhas cunhadas Irian e Izelly, pela amizade e irmandade.

Agradecimentos

À Dr^a Viktória Woronik, grande responsável por minha formação médica, por seus ensinamentos e orientações constantes na idealização e realização deste trabalho.

À Dr^a Vanda Jorgetti que conquista por sua inteligência, bondade e integridade. Que me apoiou e estimulou e a quem devo muitos aprendizados de vida.

Ao Dr Rui Toledo Barros, por sua compreensão e orientação durante toda minha trajetória como residente e pós-graduanda.

Aos amigos e também meus professores, Luciene, Fabiana, Wagner e Valéria, pela imensa ajuda e pelo constante apoio ao longo desses cinco anos de tese.

Aos amigos do LIM 16, Rosemeire, Rozidete, Eliana, Neide e Denise, por sempre estarem prontos a ajudar.

Aos meus amigos de pós-graduação e da vida, Carolina, Daniela, Andréa, Marília e José Edvanilson, pela grandiosidade de suas amizades.

Aos meus amigos Nina, Cláudia, Ana Cláudia, Maria do Carmo, Etienne, Marcelo, Ana Maria e Kátia Gonzaga, que se tornaram amigos e companheiros de toda vida.

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

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

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

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

SUMÁRIO

Resumo

Summary

1- INTRODUÇÃO.....	1
<i>1.1- Objetivos.....</i>	<i>12</i>
2- PACIENTES E MÉTODOS.....	13
<i>2.1- Estudo Bioquímico.....</i>	<i>14</i>
<i>2.2- Inquérito Nutricional</i>	<i>15</i>
<i>2.3- Biópsia Óssea.....</i>	<i>15</i>
<i>2.4- Processamento do Tecido Ósseo e Análise Histomorfométrica..</i>	<i>16</i>
<i>2.5- Cultura de Osteoblastos.....</i>	<i>16</i>
3- RESULTADOS.....	23
<i>3.1- Resultados Bioquímicos e avaliação nutricional.....</i>	<i>23</i>
<i>3.2- Resultados Histomorfométricos</i>	<i>28</i>
<i>3.3- Resultados dos Marcadores Bioquímicos de Formação Óssea...</i>	<i>33</i>
<i>3.4- Resultados de Cultura de Osteoblastos.....</i>	<i>35</i>
4- DISCUSSÃO.....	37
5- REFERÊNCIAS.....	43

RESUMO

Dias CB. Doença óssea em glomerulopatia primária [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 51p.

INTRODUÇÃO: Alterações no tecido ósseo e no metabolismo da vitamina D são encontradas em pacientes com proteinúria, porém ainda é um assunto controverso. Estudos prévios com biópsia óssea em pacientes com síndrome nefrótica demonstraram desde tecido normal até lesões características de osteomalácia e osteíte fibrosa. O objetivo deste estudo foi analisar o metabolismo e o tecido ósseo de pacientes com proteinúria decorrente de doença glomerular primária, sem uso prévio de glicocorticoide ou outra droga imunossupressora e com filtração glomerular normal. **MÉTODOS:** Dezessete pacientes com proteinúria $\geq 1,5$ g/dia, biópsia renal confirmando glomerulopatia primária e clearance de creatinina > 55 mL/min/1,73m² foram estudados. Em todos os pacientes foram realizadas dosagens séricas de cálcio iônico, fósforo, PTHi, 25(OH)D₃, 1,25(OH)₂D₃, dosagens urinárias de sódio e cálcio e biópsia óssea com análise histomorfométrica, além da retirada de fragmentos ósseos dessas biópsias (n=13) para cultura de osteoblasto, na qual avaliou-se proliferação celular e atividade de fosfatase alcalina. Analisaram-se ainda marcadores bioquímicos de formação óssea, fosfatase alcalina fração óssea e osteocalcina. **RESULTADOS:** A análise histomorfométrica comparada a controles de literatura demonstrou: menor volume ósseo ($20,9 \pm 14,5$ vs $26,8 \pm 5,9$ %, $p= 0,0008$), menor volume osteóide ($0,9 \pm 0,7$ vs $2 \pm 1,4$ %, $p= 0,0022$), menor espessura osteóide ($6,4 \pm 2,8$ vs $11,5 \pm 3,2$ μ m, $p < 0,0001$), menor

superfície mineralizante ($4,6 \pm 3,1$ vs $13,5 \pm 6$ %, $p < 0,0001$) e menor taxa de formação óssea ($0,03 \pm 0,04$ vs $0,09 \pm 0,05$ $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{d}$, $p < 0,0001$), assim como, maior separação entre as traves ósseas ($475,5 \pm 96,4$ vs $368,3 \pm 86,2$ μm , $p = 0,0002$) e menor número de traves ($1,7 \pm 0,2$ vs $2,0 \pm 0,3$ mm, $p = 0,004$). Esses resultados são compatíveis com diminuição da remodelação óssea e comprometimento de sua microarquitetura. Corroborando os resultados da histomorfometria, observou-se diminuição da proliferação celular dos osteoblastos dos pacientes quando comparados a controles ($910,2 \pm 437,1$ vs 2261 ± 1121 dpm/well, $p = 0,0016$). Nos resultados bioquímicos destacou-se a correlação negativa da $25(\text{OH})\text{D}_3$ com a proteinúria e positiva com a proliferação dos osteoblastos em cultura. Não houve alterações nas dosagens séricas dos marcadores de formação óssea. **CONCLUSÃO:** Esse estudo demonstrou que pacientes com glomerulopatia primária proteinúricos e filtração glomerular preservada apresentam diminuição da remodelação óssea e comprometimento da microarquitetura, provavelmente relacionado a perdas urinárias de $25(\text{OH})\text{D}_3$ e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Descritores: Síndrome nefrótica, doenças ósseas, biópsia, proteinúria, cultura de células, vitamina D, calcifediol, hormônio paratireóideo, fosfatase alcalina.

SUMMARY

Dias CB. Bone disease in primary glomerulopathy [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2005. 51p.

INTRODUCTION: Much controversy surrounds the topic of bone alterations and vitamin D metabolism in proteinuria patients. Bone biopsy studies in patients with nephrotic syndrome have produced results varying from normal tissue to lesions characteristic of osteomalacia and osteitis fibrosa. The objective of this study was to analyze bone tissue and vitamin D metabolism in proteinuric patients not having previously taken glucocorticoids or other immunosuppressive drugs and with normal glomerular filtration. **METHODS:** Seventeen patients with proteinuria $\geq 1,5$ g/day, biopsy confirmed primary glomerulopathy and creatinine clearance > 55 mL/min/1,73m² were studied. Serum levels of ionized calcium, phosphorus, intact parathormone, 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D₃, were determined, as were urinary excretions of sodium and calcium. Histomorphometric analysis of bone biopsies was performed for all patients, and bone fragments were obtained for osteoblast culture ($n = 13$), in which we evaluated cell proliferation and alkaline phosphatase activity. Biochemical bone formation markers were analyzed by bone alkaline phosphatase and osteocalcin. **RESULT:** Comparing patients to controls, we found lower mean trabecular bone volume ($20.9 \pm 14.5\%$ vs. $26.8 \pm 5.9\%$; $P = 0.0008$), osteoid volume ($0.9 \pm 0.7\%$ vs. $2 \pm 1.4\%$; $P = 0.0022$), osteoid thickness (6.4 ± 2.8 μm vs. 11.5 ± 3.2 μm ; $P <$

0.0001), mineralizing surface ($4.6 \pm 3.1\%$ vs. $13.5 \pm 6\%$; $P < 0.0001$), bone formation rate ($0.03 \pm 0.04 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$ vs. $0.09 \pm 0.05 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{day}$; $P < 0.0001$) and trabecular number ($1.7 \pm 0.2/\text{mm}$ vs. $2.0 \pm 0.3/\text{mm}$; $P = 0.004$), as well as greater trabecular separation ($475.5 \pm 96.4 \mu\text{m}$ vs. $368.3 \pm 86.2 \mu\text{m}$, $P = 0.0002$). These data indicate reduced bone remodeling and altered bone microarchitecture. In corroboration, mean osteoblast proliferation was lower in patient samples (910.2 ± 437.1 dpm/well). Concentrations of 25-hydroxyvitamin-D₃ correlated negatively with proteinuria and positively with osteoblast proliferation in culture. Biochemical bone formation markers not demonstrated alteration. CONCLUSION: Our results demonstrate that proteinuric patients with primary glomerulonephritis and normal glomerular filtration present reduced bone remodeling and altered bone microarchitecture, may be relationship with loss urinary of 25(OH)D₃ and 1,25(OH)₂D₃.

Descriptors: Nephrotic syndrome, Bone diseases, biopsy, cell culture, vitamin D, calcifediol, parathyroid hormone, alkaline phosphatase.

1- INTRODUÇÃO

Síndrome nefrótica é uma manifestação clínica de doença glomerular que acomete indivíduos de diversas faixas etárias e caracteriza-se por proteinúria maior que 3 – 3,5 g/24h, hipoalbuminemia, edema e hipercolesterolemia (1). Em decorrência da alteração na permeabilidade glomerular, ocorre perda urinária de albumina, imunoglobulinas, transferrina, vitaminas, além de outros elementos (1). Dentre as vitaminas perdidas, destacamos a vitamina D, que está envolvida no metabolismo cálcio/fósforo.

Metabolismo da Vitamina D

Duas são as fontes de vitamina D. A primeira é constituída por alimentos, especialmente vegetais, leite e óleo de peixes e a segunda é proveniente da conversão na pele da 7-deidrocolesterol, presente na membrana plasmática de queratinócitos da epiderme e fibroblastos da derme, em vitamina D₃ (coleciferol) pela ação dos raios ultravioletas (2). Essa vitamina é biologicamente inativa e necessita de duas hidroxilações consecutivas para tornar-se ativa (2).

A primeira hidroxilação ocorre no fígado, dando origem a 25 hidroxivitamina D₃ [25(OH)D₃] e a segunda hidroxilação ocorre no túbulo proximal renal, gerando a 1,25 dihidroxivitamina D₃ [1,25 (OH)₂D₃], que é a forma biologicamente ativa da vitamina D (figura 1) (3).

Qualquer metabólito da vitamina D em circulação encontra-se ligado principalmente a uma proteína carreadora (PCVD) (4) e em menor proporção à albumina e lipoproteínas (2). O complexo $25(OH)D_3 - PCVD$ é filtrado pelo glomérulo e reabsorvido pelo túbulo proximal onde sofre a ação da 1-alfa-hidroxilase formando a $1,25(OH)_2D_3$ (5,6). A absorção desse complexo no túbulo proximal ocorre por processo de endocitose com participação de receptores poliespecíficos existentes na porção apical da célula tubular proximal chamados cubilina e megalina (5-8).

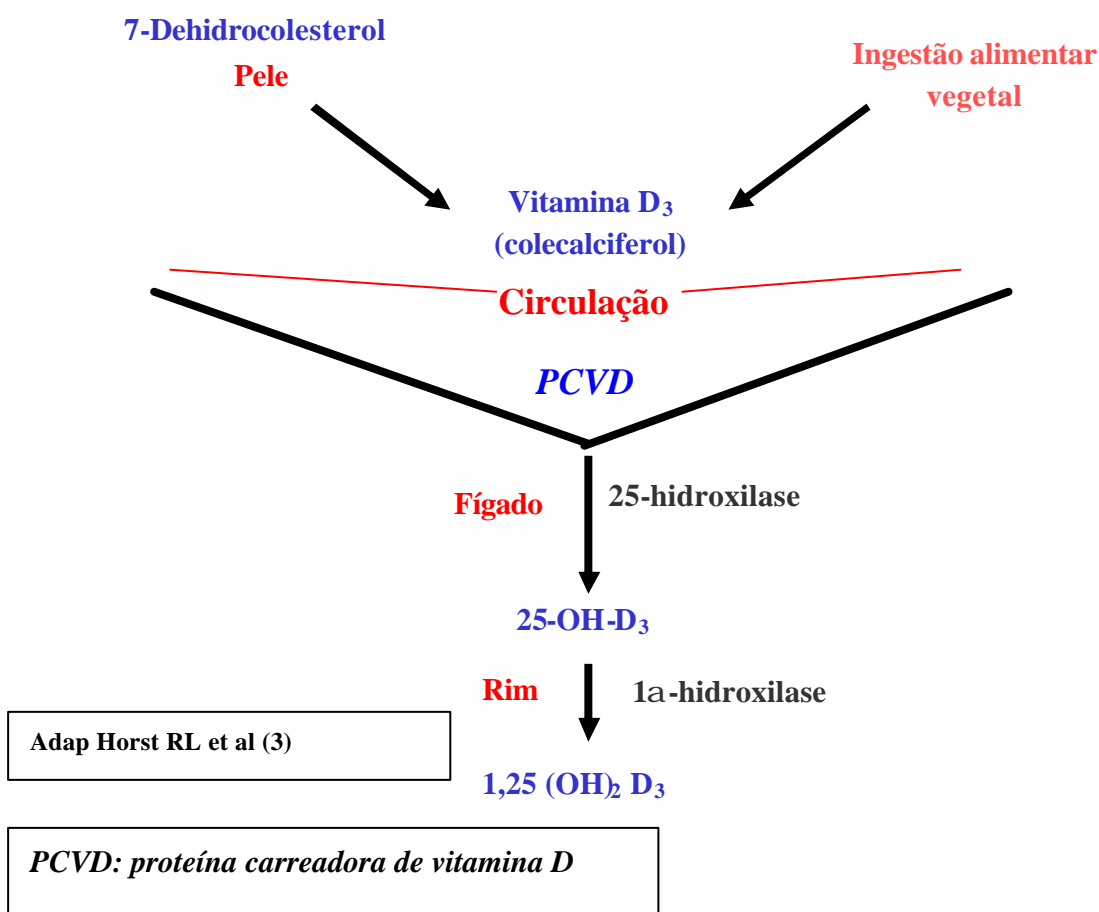
Cubilina e megalina são glicoproteínas pertencentes à família dos receptores da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (6). Estão localizadas na borda em escova das células do túbulo proximal e também localizadas em outros órgãos, como por exemplo, intestino (6). São responsáveis pelo processo de endocitose de várias substâncias como albumina, proteína carreadora de vitamina D, transferrina, drogas, mioglobina, etc (6,9). No metabolismo da vitamina D tem o importante papel de promover a endocitose do complexo $25(OH)D_3-PCVD$ para o interior da célula do túbulo proximal onde ocorrerá a ação da 1-alfa-hidroxilase para a formação da $1,25(OH)_2D_3$ (6,9).

A PCVD pertence a uma superfamília de proteínas carreadoras que inclui a albumina, α -albumina e α -fetoproteína (10). É composta por 458 aminoácidos, conferindo-lhe peso molecular menor que o da albumina (58-kDa vs 69-kDa, respectivamente) (10,11). É sintetizada predominantemente no fígado, com concentração plasmática de 4 – 8 μM e meia vida de dois a três dias (6,10). Além da função transportadora, a PCVD é importante na regulação do ingresso dessas vitaminas na

célula (11), desempenhando também um papel recém descrito na ativação de macrófagos e osteoclastogênese (10,11).

A $25(\text{OH})\text{D}_3$ é a forma circulante predominante da vitamina D e a sua concentração determina o estoque dessa vitamina. Por esse motivo, seus valores séricos identificam os casos de hiper e hipovitaminose D no organismo (12). Sua meia-vida na circulação sanguínea é de duas semanas, ao passo que a da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ é de menos de quatro horas. Além disso, a concentração sérica da $25(\text{OH})\text{D}_3$ é mil vezes maior que a concentração sérica da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (12).

Figura 1: Metabolismo da Vitamina D



Deficiência de Vitamina D: ação no osso e metabolismo cálcio e fósforo

A função primordial da vitamina D é a de manutenção da concentração sérica do cálcio em níveis fisiológicos. Isso é feito em parte através da regulação da absorção intestinal de cálcio (12).

Em condições normais de vitamina D no organismo, a absorção intestinal do cálcio da dieta é de 30%, podendo chegar a 60-80% de absorção do cálcio da dieta em situações que demandem uma necessidade maior de cálcio, como gravidez, lactação e período de crescimento (12). Na deficiência de vitamina D a absorção intestinal de cálcio cai para 10-15% (12).

A absorção intestinal inadequadamente baixa de cálcio, percebida através de sensores pouco conhecidos, desencadearia a ligação da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aos seus receptores no osteoblasto, induzindo uma resposta celular de produção do receptor ativador do fator nuclear κB ligante (RANKL), que agindo em receptores de osteoclastos (RANK) induziria a formação, fusão, ativação e aumento da sobrevivência desses osteoclastos, os quais mobilizariam cálcio do osso para elevar ao normal os níveis séricos desse elemento (12). Outro mecanismo de manutenção da calcemia frente a uma absorção intestinal inadequada de cálcio seria através da estimulação da glândula paratireóide a produzir PTH que promoveria a reabsorção tubular renal de cálcio e a ativação dos osteoclastos por mecanismo semelhante ao da $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (12).

Pela existência desses mecanismos compensatórios de manutenção da calcemia, a deficiência de vitamina D em adultos e crianças apresenta-se tipicamente com concentração de cálcio sérico normal (12).

Segundo Holick, a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ é também responsável pela mineralização da matriz colágena depositada pelos osteoblastos e por isso, a deficiência dessa vitamina poderia levar a um defeito de mineralização óssea (12). Outro efeito encontrado nos ossos de pacientes com deficiência de vitamina D é a redução da densidade mineral óssea e precipitação ou exacerbação de osteoporose, secundária à mobilização do cálcio do esqueleto feita pela $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ e PTH (12).

Ações não Calcêmicas da Vitamina D

Além dos osteoblastos, várias outras células expressam receptores de vitamina D, como células do intestino delgado, colon, pâncreas, próstata, cérebro, coração, pele, mama, linfócitos e monócitos (12).

A vitamina D ao interagir com seu receptor nessas células desencadearia uma resposta de expressão de vários genes. Assim, atribui-se à vitamina D, ações como: inibição da proliferação de células cancerígenas, modulação do sistema imune e regulação da pressão arterial através de sua ação por supressão do sistema renina - angiotensina - aldosterona (12).

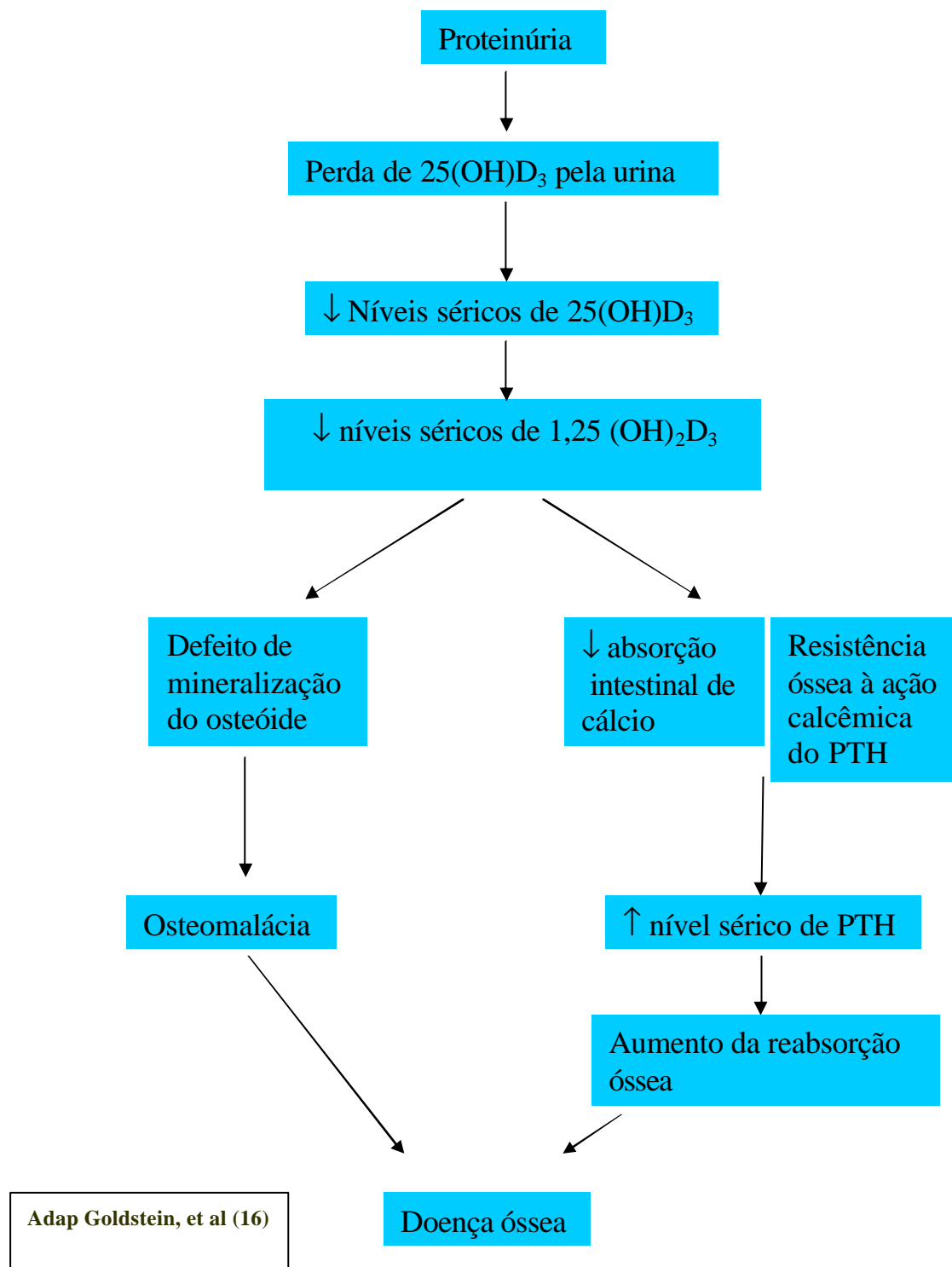
A musculatura esquelética também expressa receptores para vitamina D e por isso a sua deficiência pode induzir a quadros de dor e fraqueza muscular que poderiam mimetizar algumas doenças como, por exemplo, fibromialgia (10).

Fisiopatologia da Doença Óssea na Síndrome Nefrótica

A perda anormal de proteínas nas glomerulopatias se deve a dois mecanismos. O primeiro consiste na alteração de carga e tamanho dos poros da parede capilar glomerular, proporcionando a passagem de moléculas médias como albumina (69kDa) e transferrina (78kDa) e de moléculas maiores como IgG (150 kDa) e IgM (900 kDa). O segundo mecanismo seria uma reabsorção tubular inadequada dessas proteínas, principalmente de proteínas de baixo peso molecular, secundária a lesão tubular ou a uma competição com as proteínas de maior peso molecular (13).

Dessa forma, o complexo $25(OH)D_3 - PCVD$, que tem um peso molecular médio, é perdido na urina de doentes glomerulopatas por filtração aumentada, seguida de uma reabsorção tubular proximal insuficiente. Como consequência os níveis plasmáticos de $25(OH)D_3$ e $1,25(OH)_2D_3$ podem estar reduzidos, o primeiro por perda e o segundo por diminuição do seu substrato, que é a própria $25(OH)D_3$ (14,15).

Assim, a diminuição do nível sérico desses metabólitos provocaria, como já explicado, uma deficiência de mineralização óssea e uma redução da densidade mineral óssea (12,16). Além disso, uma estimulação mantida do PTH, secundária ao déficit de vitamina D e a absorção intestinal de cálcio inadequada, aumentaria a reabsorção óssea nesses pacientes (16) (figura 2).

Figura 2- Fisiopatologia da Doença Óssea em Síndrome Nefrótica

Doença Óssea em Síndrome Nefrótica: evidências de literatura

Trabalhos experimentais em ratos com síndrome nefrótica demonstraram uma diminuição dos níveis plasmáticos de 25(OH)D₃, 1,25 (OH)₂D₃, PCVD e cálcio urinário e o aumento do PTH (17,18).

Estudos em crianças com síndrome nefrótica mostraram uma diminuição do cálcio ionizado e da 25(OH)D₃, bem como elevação do PTH, sendo que estas alterações regrediram ao cessar a proteinúria (19,20). Esses achados foram mais graves em crianças tratadas com altas doses de glicocorticóide (21).

Adultos com síndrome nefrótica sem comprometimento da função renal podem apresentar baixos níveis de 25(OH)D₃ (21). Porém, em relação a 1,25 (OH)₂D₃ os dados são contraditórios (22,23,24).

Há cinco estudos que realizaram biópsia óssea e análise histomorfométrica em pacientes adultos com síndrome nefrótica. Lim *et al.* estudando sete pacientes, verificaram biópsias ósseas normais em 85,7% (25). Já Malluche *et al.* constataram presença de osteomalácia em 50% dos seis pacientes estudados e doença mista nos outros 50% (26). Recentemente, Mittal *et al.* mostraram incidência de osteomalácia em 56,7% e doença mista em 10% dos pacientes (27). Tessitore *et al.* observaram que 76% de seus pacientes apresentavam histologia normal, 17%, osteomalácia e 7%, doença mista (28). Por outro lado, Korkor *et al.* não encontraram nenhuma alteração óssea nos seis pacientes estudados (29). Na tabela 1 estão descritos os parâmetros clínicos e os resultados de biópsia óssea desses cinco estudos.

Tabela 1: Estudos em Pacientes com Síndrome Nefrótica

	Lim ²⁵	Malluche ²⁶	Mittal ²⁷	Tessitore ²⁸	Korkor ²⁹
Número de pacientes	7	6	30	29	6
Proteinúria (g/24h)	7,4	9,4	7,3	8,1	8,4
Clearance de creatinina (mL/min)	89	113	103	103	101
PTHi (pg/mL)	NR	↑	↔	↔	↔
25(OH)D ₃ (ng/mL)	NR	↓	↓	↓	↓
1,25(OH) ₂ D ₃ (pg/mL)	NR	NR	↔	↔	↔
Biópsia óssea					
Normal (%)	85,7	0	33,3	76	100
Osteomalácia (%)	0	50	56,7	17	0
Mista (%)	0	50	10	7	0
Outros (%)	14,3	0	0	0	0
Tempo de doença (meses)	ND	1	35	ND	80

NR = não realizado

ND = não descrito

« = valores normais para o método

Verificamos que os resultados destes cinco trabalhos são conflitantes, sendo que em três, a casuística era pequena (25,26,29), dois não descreveram o tempo de síndrome nefrótica (25,28) e um incluiu pacientes cujo diagnóstico era muito precoce (26). Um achado constante nestes estudos foi o de valores baixos de 25(OH)D₃. Os achados de biópsia óssea também são díspares: normais entre zero a 100%, osteomalácia entre zero a 56% e doença mista entre zero a 50%.

Marcadores Bioquímicos de Formação e Reabsorção Óssea em Síndrome Nefrótica.

Visando avaliar a formação e a reabsorção óssea através de métodos não invasivos, têm-se buscado parâmetros bioquímicos que tenham correlação com os dados histomorfométricos de biópsia óssea. Os marcadores de formação mais estudados são a fosfatase alcalina fração óssea e a osteocalcina e os de reabsorção, a piridinolina e a deoxipiridinolina (30).

A fosfatase alcalina é uma proteína glicosilada produzida em cinco órgãos diferentes que são: fígado, osso, rins, intestinos e placenta (30). A fosfatase alcalina fração óssea é produzida por osteoblastos e precursores de osteoblastos e por esse motivo tornou-se marcador de formação óssea e atividade osteoblástica (30).

A osteocalcina é a proteína não colágena mais abundante na matriz óssea e também é produzida pelo osteoblasto (30). A piridinolina e a deoxipiridinolina são marcadores de quebra do colágeno tipo I e II e sua excreção urinária teria correlação com reabsorção óssea (30).

Alguns trabalhos realizados em pacientes com insuficiência renal crônica não encontraram correlação desses marcadores com a histologia óssea (31,32). Estudo realizado por Parker *et al.* em mulheres transplantadas renais demonstrou correlação da superfície osteoblástica com osteocalcina e piridinolina (33).

Em ratos com síndrome nefrótica induzida pela puromicina, observou-se um aumento de osteocalcina e piridinolina, sugerindo uma maior remodelação óssea (34).

Nos pacientes nefróticos em uso de glicocorticóides observou-se aumento da deoxipiridinolina e queda importante nos níveis de osteocalcina após três meses de terapia, demonstrando uma aceleração na reabsorção e uma supressão na osteogênese provocada pelo uso do glicocorticóide (35).

Estudo de Osteoblastos *in Vitro*

Estudos de células ósseas "*in vitro*" são realizados para investigação bioquímica e fisiológica da formação óssea, para o entendimento das bases moleculares e celulares das doenças ósseas e para avaliação de possíveis terapêuticas.

A obtenção de cultura pura de osteoblastos (cultura primária) é uma tarefa difícil, pois no preparo do fragmento ósseo para o cultivo dos osteoblastos pode ocorrer contaminação com células de medula óssea, fibroblastos e adipócitos. Por esse motivo existem técnicas para caracterizar e diferenciar os osteoblastos dessas outras células.

Entre os métodos descritos para caracterização de osteoblastos estão a detecção da atividade de fosfatase alcalina e a capacidade de mineralização da célula (36), bem como produção de AMPc após estímulo com PTH e a produção de osteocalcina após

estímulo com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (37). A pesquisa de fosfatase alcalina pode ser realizada por métodos qualitativos, isto é, detectando os osteoblastos através de coloração por histoquímica e quantitativos, por dosagem através de método colorimétrico.

São poucos os estudos de cultura de células ósseas em pacientes com síndrome nefrótica. Freundlich *et al.* demonstraram que a incubação de osteoblastos normais com soro de crianças nefróticas aumentava a atividade de fosfatase alcalina e a expressão de RANKL quando comparada com soro de crianças normais (38), sendo mais um dado que sugere haver alteração do metabolismo ósseo nesses pacientes.

1.1 - Objetivos

Assim, havendo dados tão controversos e estudos ainda escassos sobre o assunto, propusemos este trabalho com os seguintes objetivos:

1- Avaliar as conseqüências da proteinúria sobre o metabolismo ósseo:

a) analisando parâmetros histomorfométricos do tecido ósseo de pacientes proteinúricos obtido por biópsia óssea e analisando o comportamento *in vitro* dos osteoblastos desses pacientes.

b) estudando as conseqüências da proteinúria sobre os níveis séricos da $25(\text{OH})\text{D}_3$ e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Nossa hipótese é de que existiria uma doença óssea nesses pacientes, secundária a perda renal de $25(\text{OH})\text{D}_3$ e que o conhecimento dessa seria importante já que são

pacientes que terão seu metabolismo ósseo ainda mais agredido por futuras imunossupressões e/ou insuficiência renal.

2 - PACIENTES E MÉTODOS

Foram incluídos pacientes portadores de glomerulopatia primária (GP) que obedeciam aos seguintes critérios:

- 1- Comprovação histológica da GP.
- 2- Proteinúria maior ou igual a 1,5 g/dia.
- 3- Creatinina sérica menor que 2mg/dL ou clearance de creatinina superior a 55 mL/min/1,73m².
- 4- Homens até 55 anos e mulheres até 40 anos.
- 5- Não ter usado glicocorticóide ou outro imunossupressor há pelo menos seis meses.
- 6- Tempo mínimo de doença renal de seis meses.

Excluíram-se os pacientes que estivessem em uso de medicações que alterassem o metabolismo ósseo (como por exemplo, anticoagulantes orais e anticonvulsivantes), que estivessem recebendo suplementação de cálcio ou vitamina D ou usado glicocorticóide ou outra imunossupressão há menos de seis meses do início do protocolo e os portadores de doença da tireóide.

Os pacientes foram mantidos com as seguintes medicações: inibidor de ECA, bloqueador do receptor AT1 da angiotensina II, furosemida e outros hipotensores excluindo-se hidroclorotiazida.

2.1- Estudo bioquímico

O estudo bioquímico constou de:

- a) dosagens séricas de: creatinina (Pcr), cálcio total [valor de referência (vr) de 8,5-10,5 mg/dL], cálcio iônico (vr de 4,8-5,4 mg/dL), fósforo (vr de 2,3-4,6 mg/dL) e eletroforese de proteínas por métodos habituais. Fosfatase alcalina fração óssea (vr até 20% da fosfatase total) medida através de método de separação eletroforética, 25(OH)D₃ (vr de 8,9 – 46,7 ng/mL) e 1,25 (OH)₂D₃ (vr de 15,9 – 55,6 pg/mL) medidas por radioimunoensaio (39), PTH intacto (vr de 11-62pg/mL) medido por radioimunoensaio (Cis-Bio International ELSA PTH, Gif-sur-Yvette France) e osteocalcina medida também por radioimunoensaio (Cis Bio Internacional) com os valores de referência indicados pelo fabricante.

- b) dosagens urinárias de: creatinina (Ucr), sódio, proteinúria e calciúria por métodos habituais e padrões convencionais. A calciúria foi considerada como normal em valores de 2,5 mg/Kg/dia como relatado em população brasileira (40). A filtração glomerular foi medida através do clearance de creatinina, utilizando-se a fórmula $Ucr \times V / Pcr \times 1440$, corrigida para superfície corpórea, em urina de 24h com coleta de sangue ao final.

2.2- Inquérito Nutricional

Os pacientes preencheram um inquérito nutricional de três dias, cujos dados foram analisados através da aplicação de um programa de computador desenvolvido pela Universidade Federal de São Paulo.

2.3- Biópsia Óssea

A biópsia óssea foi realizada em osso ilíaco, dois centímetros posterior e dois abaixo da crista ilíaca antero-superior, utilizando trefina elétrica (Gauthier Medical, Rochester, EUA). Foi utilizada sedação com midazolam 7,5mg intramuscular e anestesia local com lidocaína 2% sem vasoconstritor. No ponto indicado, foi realizada incisão de aproximadamente dois centímetros na pele e tecido subcutâneo, introduzido o divulsionador e através dele um mandril que se fixa à superfície óssea. Através do mandril introduziu-se a trefina elétrica para retirada de fragmento ósseo de ± 2 cm.

Os parâmetros histomorfométricos foram divididos em estáticos/estruturais e dinâmicos e seguiram a nomenclatura padronizada pela *American Society of Bone and Mineral Research*, traduzida para o português, com exceção das abreviações. Os valores de controles normais estáticos/estruturais são de dos Reis *et al.* (41) e os dinâmicos de Melsen *et al.* (42).

Antes da biópsia os pacientes receberam tetraciclina 20mg/Kg por via oral, em duas tomadas por três dias, havendo um intervalo de dez dias, após o qual, repetia-se a

tetraciclina na mesma posologia e tempo. A biópsia era realizada entre o terceiro e o quinto dia após o final da segunda tomada de tetraciclina. Essa medicação promove uma marcação no osso que é utilizada para analisar os parâmetros dinâmicos da histomorfometria.

2.4- Processamento do Tecido Ósseo e Análise Histomorfométrica

Parte do tecido ósseo foi fixado em mistura de álcool a 70% e metil-metacrilato. Cortes de 5 μm foram obtidos com auxílio de um micrótomo de impacto Polycut S (Leika, Alemanha) com navalha de tungstênio e corados com azul de toluidina 0,1%, pH 6,4 (Sigma Chemical, St. Louis, EUA), para análise histológica convencional (parâmetros estáticos/estruturais), utilizando-se microscópio (Nikon, Labophot-2A), cursor, placa digitalizadora e o software *Osteomeasure* (Osteometrics, Inc, Atlanta, EUA). Outros cortes de 10 μm , não corados, foram obtidos para análise das marcações pela tetraciclina (parâmetros dinâmicos), empregando-se uma fonte de luz ultravioleta.

2.5-Cultura de osteoblastos

Foi realizada a partir de fragmento ósseo proveniente da biópsia, colocado em meio de transporte (Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM com tampão HEPES 25 mM; 500 $\mu\text{g/mL}$ de Ampicilina, 500 $\mu\text{g/mL}$ de Estreptomicina e 3 $\mu\text{g/mL}$ de Anfotericina B) e levado até câmara de fluxo laminar onde foi cortado em fragmentos

menores (1 mm^3), que foram lavados com PBS (tampão fosfato salina) inúmeras vezes para a retirada de células da medula óssea. Os fragmentos foram distribuídos em placas de Petri de poliestireno (Nunc, Illinois, EUA) nas quais adicionou-se 10 mL de meio de cultivo celular [DMEM, suplementados com $100 \mu\text{g/mL}$ de Ampicilina, $100 \mu\text{g/mL}$ de Estreptomicina, $2,5 \mu\text{g/mL}$ de Anfotericina B e 10% de soro fetal bovino – SFB (Cultilab, Campinas, Brasil)].

As placas foram cultivadas a 37°C em estufa contendo CO_2 a 5%, trocando-se o meio três vezes por semana, durante aproximadamente duas semanas. Após esse período, os fragmentos iniciais foram retirados da placa de Petri e as células obtidas foram mantidas até atingirem confluência. A seguir, as células foram dissociadas com ATV (Tripsina 0,2% + Versene 0,02% - Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil) e cultivadas em garrafa de 25 cm^2 com o mesmo meio de cultivo celular. Após nova confluência, as células foram novamente dissociadas com ATV e separadas em três alíquotas. A primeira foi semeada em lâminas de vidro por 24h para caracterização de osteoblastos com a coloração da fosfatase alcalina. A segunda foi semeada em placa de seis *wells* para avaliação da capacidade de mineralização e atividade de fosfatase alcalina, e a terceira alíquota semeada em placas de 24 wells tratadas com timidina para avaliação da proliferação celular.

Na cultura primária, os osteoblastos podem perder progressivamente suas características fenotípicas após seqüências de dissociação com ATV (quebra das suas ligações intercelulares) (43). Essas seqüências são chamadas passagens e realizadas com o objetivo de aumentar o número de células para a feitura dos diversos experimentos.

Por esses motivos, para termos certeza de suas características fenotípicas, os osteoblastos foram avaliados após duas passagens.

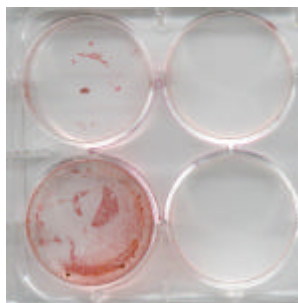
2.5.1-Identificação dos osteoblastos em cultura

Para comprovação de que as células estudadas eram predominantemente osteoblastos, utilizamos dois métodos:

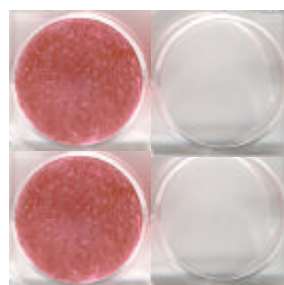
a) Capacidade de Mineralização

Após semeadura na placa de seis *wells* aguarda-se a confluência das células. A seguir adiciona-se meio DMEM suplementado com 100 µg/mL de ácido ascórbico (Sigma), 5 mM de β-glicerofosfato (Sigma), antibióticos (100µg/mL de Ampicilina, 100µg/mL de Estreptomicina e 2,5µg/mL de Anfotericina B) e 10% de soro fetal bovino – SFB e deixa-se a cultura correr por 21 dias, trocando-se esse meio três vezes por semana. Após esse tempo fixamos com formaldeído diluído em PBS por 5 minutos. Coramos com Vermelho de Alizarina 1% (Merck), pH= 6,3, por mais 5 minutos. Lavamos com água destilada e observamos em microscópio a presença dos nódulos ósseos (figura 3^A).

Figura 3^A- Caracterização dos osteoblastos quanto a formação de nódulos ósseos.



**Amostra não
incluída**
considerada fraca
coloração e por isso
a possibilidade de
conter poucos
osteoblastos.



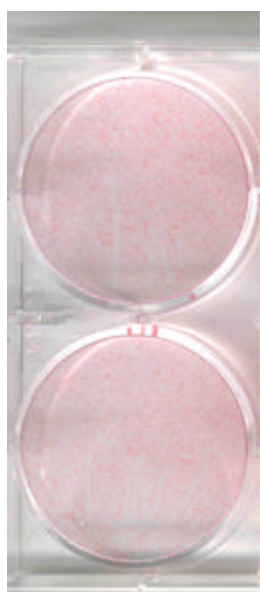
Amostra incluída
considerada boa
coloração,
significando a
presença de
osteoblastos em
grande número.

b) Coloração das Células para Fosfatase Alcalina por Histoquímica Enzimática

Solução A: Dissolvemos 0,025g de Naphthol Phosphate AS-MX (Sigma, St Louis, USA) em 500 μ l de N,N Dimetilformamida - C_3H_7NO (Merck); adicionamos 0,05g de 4-cloro-2-metilbenzenediazonium sal - Fast Red - $C_{14}H_{12}N_4O_2Cl_2 \cdot ZnCl_2$; completamos para 50 mL de Tris-HCl 0,05M. A seguir, agitamos e filtramos a solução.

Método: a alíquota semeada em lâmina de vidro é submetida à lavagem com PBS por 5 minutos e em seguida adiciona-se a solução A cobrindo toda lâmina. Incuba-se por 30 minutos a 37⁰C. Nova lavagem com PBS é realizada e a seguir utiliza-se formaldeído a 4% por 5 minutos para fixação. A lâmina é lavada com água destilada, montada com glicergel (Merck) e levada ao microscópio. Os osteoblastos são visualizados em cor vermelha, (figura 3^B).

Figura 3^B-Caracterização dos osteoblastos quanto a coloração de fosfatase alcalina por histoquímica.



**Amostra incluída
como boa coloração
para fosfatase
alcalina**

2.5.2- Avaliação dos Osteoblastos dos Pacientes.

a) Proliferação Celular

Foi analisada a proliferação celular pela incorporação de ^3H - Timidina ao DNA celular. Conforme descrito anteriormente, os osteoblastos foram cultivados por nove dias, após a segunda tripsinização. A seguir, $5\mu\text{Ci/mL}$ de ^3H - Timidina (Amersham Pharmacia Biotech Brasil Ltda, SP, Brasil) foram adicionados às placas de cultura, aguardando-se duas horas, para então serem lavadas com PBS, precipitadas com 5% de ácido tricloroacético (TCA), ressuspensas em $300\mu\text{L}$ de $0,2\text{N NaOH}/0,3\%$ sarcosil e neutralizadas com $2\mu\text{L}$ ácido acético glacial a 100%. O lisado celular ($100\mu\text{L}$) foi transferido para tubos com 5 mL de líquido de cintilação e a incorporação de ^3H - Timidina foi determinada utilizando-se um contador de cintilação beta Beckman modelo LS6200 (Beckman Instruments, Palo Alto, EUA). A incorporação de ^3H - Timidina foi expressa em desintegrações por minuto (dpm) por *well*.

b) Atividade de Fosfatase alcalina

As placas de seis *wells* foram colocadas em gelo e os *wells* lavados com PBS, seguido da adição de $500\mu\text{L}$ de água destilada gelada. As células foram descoladas da placa por ação mecânica, sonicadas por 30 segundos e depois centrifugadas por 30 min em 2000 rpm. Sobrenadante e precipitado foram armazenados em freezer à -20°C , para posterior análise da atividade de fosfatase alcalina e dosagem das proteínas, respectivamente. A atividade de fosfatase alcalina foi determinada por método

colorimétrico, usando-se *p*-nitrophenylphosphate como substrato, e os resultados expressos por unidade de atividade enzimática por litro por mg de proteína (UI/L/mg).

Os resultados obtidos da cultura dos osteoblastos dos pacientes foram comparados aos da cultura de osteoblastos normais, obtidos a partir de fragmentos ósseos de indivíduos doadores cadáveres de órgãos e pareados quanto à idade e sexo. A cultura dos osteoblastos desses indivíduos seguiu todas as etapas e metodologias descritas acima.

Análise Estatística

Os resultados foram apresentados em média \pm desvio padrão (DP). Comparações entre os grupos foram feitas aplicando-se o teste *t Student* não pareado e quando a amostra não tinha distribuição normal aplicamos o teste de *Mann-Whitney* para essas comparações. As correlações foram obtidas pela análise de correlação de *Pearson* ou *Spearman* quando apropriado. Valores com significância foram considerados quando $p < 0,05$.

Algumas figuras (gráficos) tiveram valores do eixo x expressos em logaritmo, para melhor visualização dos resultados.

Este trabalho foi aprovado pela comissão de ética, protocolo HC 183/00, e os pacientes assinaram um consentimento, após serem devidamente informados sobre o estudo.

3- RESULTADOS

Foram estudados 17 pacientes (11 homens e 6 mulheres) com média de idade de 37 ± 9 anos. À biópsia renal, 12 pacientes apresentavam glomerulonefrite membranosa, 1 glomerulonefrite membranoproliferativa, 3 glomeruloesclerose segmentar e focal e 1 nefropatia da IgA.

3.1- Resultados Bioquímicos e avaliação nutricional

A média de creatinina plasmática foi de $1,0 \pm 0,2$ mg/dL (0,7 a 1,7), o *clearance* de creatinina de 84 ± 20 mL/min/1,73m² (56 a 120), a proteinúria de $7,5 \pm 4,5$ g/dia (1,5 a 17,3) e o tempo de doença de $38 \pm 41,1$ meses (8 a 156). Na tabela 2 estão descritas as demais características bioquímicas dos pacientes.

Doze pacientes apresentavam proteinúria elevada, $9,4 \pm 4$ g/dia, associada a albumina sérica baixa $1,7 \pm 0,5$ g/dL e cinco apresentavam proteinúrias mais baixas, $2,8 \pm 1,2$ g/dia, sendo que quatro desses com albumina sérica normal, $3,6 \pm 0,8$ g/dL. Sete pacientes utilizaram imunossupressão e o tempo médio de interrupção da medicação até o início do protocolo foi de 25 meses (6 a 36) e os demais não receberam tratamento imunossupressor.

Tabela 2. Características gerais dos pacientes.

Pacientes	Idade	Per (mg/dL)	Alb (g/dL)	Ca total (mg/dL)	Cai (mg/dL)	P (mg/dL)	PTHi (pg/mL)	25(OH)D ₃ (ng/mL)	1,25(OH) ₂ D ₃ (pg/mL)	Prot (g/dia)	Cau (mg/Kg/dia)	Nau (mEq/dia)
1	33	0,8	1,8	7,8	4,8	4,7	20	14,4	43,7	9,7	0,2	105
2	31	1,1	1,2	7,0	5,1	5,0	25	27,6	28,9	9,0	0,1	364
3	39	1,7	1,8	7,5	4,8	3,7	58	12,2	12,2	11,3	0,1	129
4	43	0,8	2,0	8,5	4,9	3,1	17,5	17,2	40,2	17,3	0,1	133
5	19	0,9	4,2	10,1	5,2	4,1	19	29,0	NR	1,5	1,7	189
6	45	1,0	3,5	9,1	5,3	3,3	10	35,1	67,7	3,9	1,1	252
7	42	1,5	4,5	10,0	5,4	3,2	30	37,7	41,0	4,1	1,2	175
8	40	0,7	2,3	8,3	4,6	4,9	17	15,2	13,6	2,8	1,0	116
9	38	0,9	1,1	8,2	5,3	4,5	27	5,02	18,8	6,2	0,1	49
10	45	1,4	2,0	7,6	4,8	4,4	38	16,2	22,3	6,2	0,1	129
11	34	1,0	3,5	9,3	5,1	3,4	10	35,5	15,6	1,6	0,5	122
12	41	1,3	1,5	8,2	4,8	5,9	34	9,1	46,0	15,4	0,2	127
13	28	1,1	2,1	8,8	5,1	4,3	35	12,4	43,9	5,5	0,2	66
14	32	1,2	0,9	7,7	5,0	3,8	10	8,5	14,7	8,1	1,7	160
15	55	1,7	2,6	8,3	5,0	3,4	26	15,2	57,5	9,6	0,02	164
16	25	0,7	2,6	8,7	5,3	4,1	10	12,6	34,6	4,0	0,5	58
17	47	1,3	1,3	7,3	4,7	5,0	62	10,7	13,4	10,9	0,05	144
Média ± DP	37 ± 9	1,0 ± 0,2	2,3 ± 1	8,3 ± 0,8	5,0 ± 0,2	4,1 ± 0,7	26,3 ± 5,6	18,4 ± 10,3	32,1 ± 17,2	7,5 ± 4,5	0,4 ± 0,5	146 ± 75

Alb = albumina, Ca = cálcio, Cai = cálcio ionizado, P = fósforo, Prot = Proteinúria, Cau = cálcio urinário, Nau = sódio urinário; NR= não realizado; Valores normais de: PTH (11-62pg/ml), 25(OH)D₃ (8,9-46,7 ng/ml), 1,25(OH)₂D₃ (15,9-55,6pg/ml), Cai (4,8 – 5,4mg/dL) e P (2,3 -4,6 mg/dL).

Em dois pacientes a concentração de cálcio iônico estava abaixo do normal. A concentração sérica de 25(OH)D₃ estava reduzida em dois pacientes e a de 1,25(OH)₂D₃ em cinco.

Com relação a calciúria constatamos uma baixa excreção de cálcio que se correlacionou negativamente com a proteinúria ($r = - 0,52$, $p = 0,03$) e positivamente com a albumina sérica ($r = 0,5$, $p = 0,02$) figura 4 e 5.

Houve correlação positiva entre a 25(OH)D₃ e albumina sérica ($r = 0,8$, $p < 0,0001$) - figura 6 e negativa com a proteinúria ($r = -0,4$, $p = 0,04$) - figura 7.

Comparando os pacientes mais proteinúricos (n=12) com os de menor proteinúria (n=5), observamos que o primeiro grupo apresentava menor nível de 25(OH)D₃ em relação ao segundo, $13,4 \pm 5,6$ vs $30,5 \pm 9,1$ ng/mL, $p = 0,0003$ respectivamente.

Figura 4

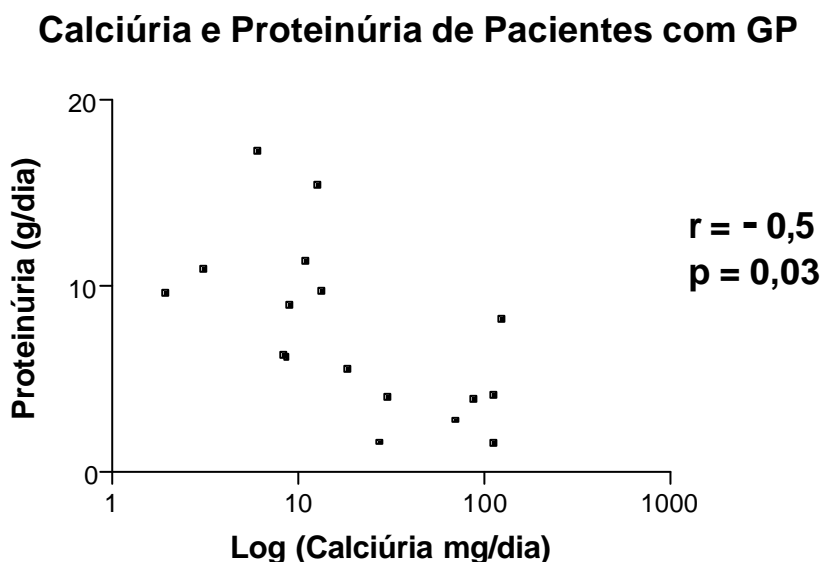


Figura 5

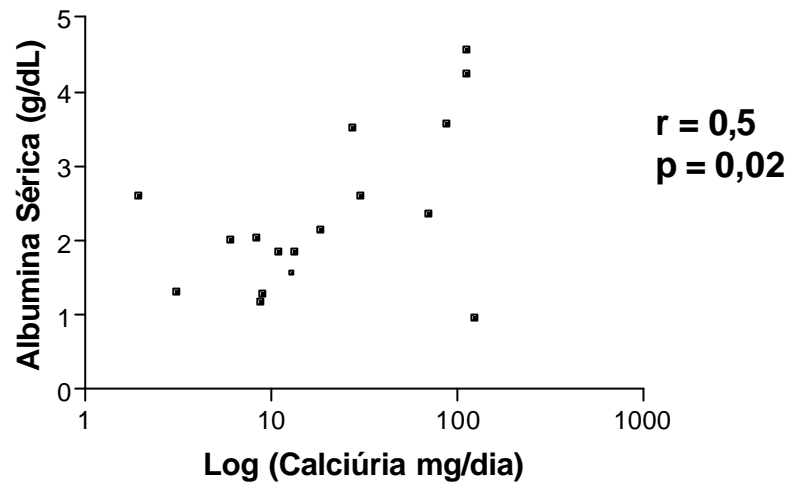
Calciúria e Albumina Sérica de Pacientes com GP

Figura 6

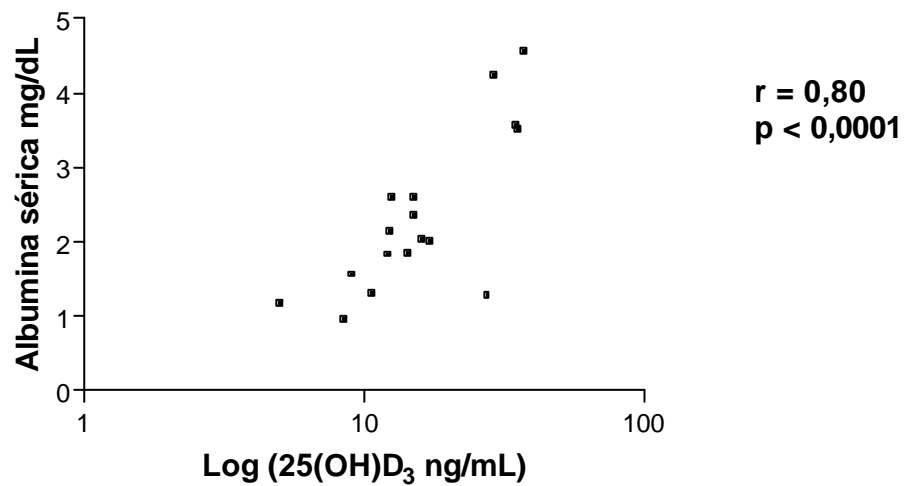
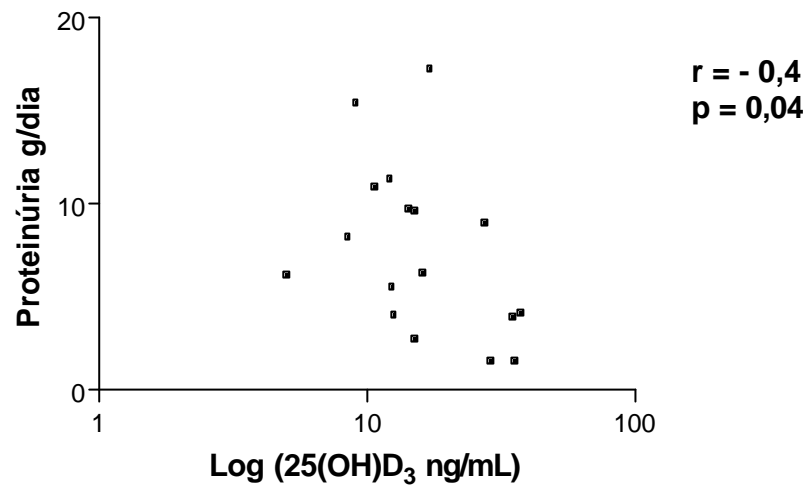
Albumina Sérica e 25(OH)D₃ de Pacientes com GP

Figura 7

Proteinúria e 25(OH)D₃ de Pacientes com GP

A baixa excreção urinária de cálcio poderia ser explicada por baixa ingestão. Assim sendo, realizamos a avaliação nutricional dos pacientes, que foi obtida através de inquérito respondido por 10 pacientes e que mostrou uma ingestão de cálcio baixa, porém, semelhante à encontrada em controles brasileiros de pesquisa realizada por Martini *et al.* que é de 457 ± 363 mg/dia (40). Sete pacientes recusaram a responder ao inquérito nutricional. Não houve relação entre os valores de ingestão de cálcio com nenhum parâmetro estudado.

Tabela 3- Inquérito nutricional, ingestão de cálcio por dia

Pacientes	Cálcio (mg/dia)
1	434,92
2	1303,06
3	427,10
6	894,5
8	486,0
9	783,8
10	366,1
12	1069,0
13	430,0
16	305,4
média±DP	593,6 ± 374,3

3.2- Resultados Histomorfométricos

Na tabela 4 estão os resultados histomorfométricos dos 17 pacientes estudados. Comparando nossos resultados com os valores normais (tabela 5), observamos que nossos pacientes apresentaram **menor volume ósseo (BV/TV) = 20,9 ± 14,5 vs 26,8 ± 5,9 %, $p = 0,0008$, menor volume osteóide (OV/BV) = 0,9 ± 0,7 vs 2 ± 1,4 %, $p = 0,0022$; menor espessura osteóide (O.Th) = 6,4 ± 2,8 vs 11,5 ± 3,2 mm, $p < 0,0001$; e maior número de osteoclastos (Oc.S/BS) = 0,35 ± 0,6 vs 0,05 ± 0,1 %, $p = 0,0016$.**

Além disso, observamos perda da conectividade com **menor número de traves** (Tb.N) = $1,7 \pm 0,2$ vs $2,0 \pm 0,3$ mm, $p = 0,004$ e **maior separação entre as traves** (Tb.Sp) = $475,5 \pm 96,4$ vs $368,3 \pm 86,2$ mm, $p = 0,0002$, (tabela 5).

Também apresentaram **menor superfície mineralizante** (MS/BS) = $4,6 \pm 3,1$ vs $13,5 \pm 6$ %, $p < 0,0001$ e **menor taxa de formação óssea** (BFR) $0,03 \pm 0,04$ vs $0,09 \pm 0,05$, $p < 0,0001$, (tabela 6).

Tabela 4. Dados histomorfométricos da biópsia óssea

Pacientes	BV/TV (%)	OV/BV (%)	O.Th (mm)	OS/BS (%)	ES/BS (%)	Ob.S/BS (%)	Oc.S/BS (%)	MS/BS (%)	MAR (m/d)	BFR/BS (m ³ /m ² /d)	Aj. AR (m/d)	MIT (d)	Tb.Th (mm)	Tb.N (/mm)	Tb.Sp (mm)
1	30,1	0,20	5,9	3,0	1,2	0,36	0,15	1,63	0,45	0,007	0,24	25	118,6	2,53	275,3
2	21,0	0,46	7,1	4,8	2,9	1,59	0,27	4,08	0,56	0,030	0,47	15	123,5	1,70	462,8
3	22,2	0,83	6,4	11,6	0,3	1,55	0,00	5,03	0,60	0,030	0,27	24	118,9	1,86	416,0
4	19,2	0,87	5,3	12,1	3,3	3,03	0,34	4,48	0,41	0,018	0,15	35	139,3	1,38	583,3
5	20,5	0,45	4,0	9,7	0,4	2,68	0,00	9,57	0,70	0,060	0,74	6	112,7	1,81	437,1
6	23,3	0,48	6,0	9,0	0,6	1,13	0,07	3,09	0,62	0,019	0,21	28	134,4	1,74	440,2
7	21,5	2,40	8,5	18,3	1,3	2,73	0,4	7,43	0,50	0,040	0,20	42	121,9	1,76	445,5
8	19,9	2,40	14,3	9,1	4,7	5,53	0,00	10,52	0,86	0,090	0,99	15	114,7	1,73	460,1
9	10,9	0,68	3,8	15,7	0,0	0,53	0,00	5,54	0,42	0,023	0,15	25	85,0	1,28	691,4
10	16,1	0,76	5,6	6,7	0,9	2,69	0,19	4,4	0,6	0,028	0,36	13	115,0	1,40	598,3
11	24,1	0,15	9,1	1,0	3,6	0,3	0,3	2,0	0,9	0,018	1,66	5	123,0	1,95	387,2
12	21,8	2,13	8,6	14,8	16,8	7,0	2,6	10,6	1,6	0,170	1,18	7	135,0	1,61	489,0
13	25,7	0,82	9,3	5,8	4,8	1,7	0,2	1,2	0,7	0,009	0,16	58	144,0	1,78	414,7
14	19,9	0,45	3,1	6,9	6,3	2,6	0,4	2,5	0,6	0,016	0,24	13	98,8	2,01	397,3
15	17,6	1,63	5,7	15,8	1,8	2,3	0,2	3,7	0,5	0,021	0,13	43	117,6	1,47	558,5
16	26,8	0,05	2,4	1,9	2,2	0,4	0,4	1,4	0,5	0,008	0,42	5,8	195,0	1,37	531,13
17	15,2	0,53	4,6	5,9	1,6	1,0	0,1	2,1	1,7	0,038	0,63	7,3	89,2	1,71	494,20
Média±	20,9	0,9	6,4	8,9	3,1	2,1	0,35	4,6	0,7	0,03	0,48	21,7	122,8	1,7	475,5
DP	± 4,5	± 0,7	± 2,8	± 5,1	± 3,9	± 1,8	± 0,6	± 3,1	± 0,3	± 0,04	± 0,4	± 15,6	± 24,5	± 0,2	± 96,5

BV/TV= volume ósseo; OV/BV= volume osteóide; O.Th= espessura osteóide; OS/BS= superfície osteóide; ES/BS= superfície reabsorvida; ObS/BS = superfície osteoblástica; OcS/BS= superfície osteoclástica; MS/BS= superfície mineralizante; MAR= taxa de aposição mineral; BFR/BS= taxa de formação óssea; Aj.AR= taxa de formação óssea corrigida; MIT= intervalo de tempo para mineralização; Tb.Sp= separação das travess; Tb.N= número de travess; Tb.Th= espessura das travess.

Tabela 5 - Parâmetros Histomofométricos Estáticos e Estruturais

	BV/TV %	OV/BV %	O.Th mm	OS/BS %	ES/BS %	Ob.S/BS %	Oc.S/BS %	Tb.Th mm	Tb.Sp mm	Tb.N /mm
Pacientes	20,9±4,5	0,9±0,7	6,4±2,8	8,9±5,1	3,1±3,9	2,1±1,8	0,35±0,6	122,8±24	475,5±96,5	1,7±0,2
Controles	26,8±5,9	2,0±1,4	11,5±3,2	11,7±7,1	2,0±1,3	1,3±1,6	0,05±0,1	131,6±27	368,3±86,2	2,0±0,3
p	0,0008	0,0022	< 0,0001	ns	ns	ns	0,0016	ns	0,0002	0,0045

BV/TV= volume ósseo; OV/BV= volume osteóide; O.Th= espessura osteóide; OS/BS= superfície osteóide; ES/BS= superfície reabsorvida; ObS/BS = superfície osteoblástica; OcS/BS= superfície osteoclástica; Tb.Sp= sepração das traves; Tb.N= número de traves; Tb.Th= espessura das traves.

Tabela 6- Parâmetros Histomorfométricos Dinâmicos

	MS/BS %	MAR mm/d	BFR/BS mm ³ /mm ² /d	Aj.AR mm/d	MIT d
Pacientes	4,6 ± 3,1	0,7 ± 0,3	0,03 ± 0,04	0,48 ± 0,4	21,7 ± 15,6
Controles	13,5 ± 6	0,65 ± 0,12	0,09 ± 0,05	0,5 ± 0,2	22,5 ± 2,5
p	< 0,0001	ns	<0,0001	ns	ns

MS/BS= superfície mineralizante; MAR= taxa de aposição mineral; BFR/BS= taxa de formação óssea; Aj.AR= taxa de formação óssea corrigida; MIT= intervalo de tempo para mineralização.

Portanto, a histomorfometria óssea dos nossos pacientes é consistente com um baixo remanejamento ósseo, caracterizado por menores valores de BV/TV, OV/TV, O.Th, BFR e MS/BS e por alterações da microarquitetura óssea, representadas pela perda de conectividade das traves ósseas e menor número de traves.

Os achados de baixo volume ósseo (BV/TV) foram tão importantes que em uma paciente atingiu nível crítico para fratura (BV/TV menor que 11%). Esta paciente também apresentava o menor nível sérico de 25(OH)D₃ (5,02 ng/mL).

Pacientes menos proteinúricos (n=5) também apresentaram alterações ósseas quando comparados aos controles, tais como: menor BV/TV 21,8 ± 1,7 vs 26,8 ± 5,9 %, menor O.Th 8,4 ± 3,8 vs 11,5 ± 3,2 μm, menor MS/BS 6,5 ± 3,8 vs 13,5 ± 6 %, menor BRF 0,04 ± 0,03 vs 0,09 ± 0,5 μm³/μm²/d e maior separação entre as traves ósseas 434,1 ± 27,6 vs 368,3 ± 86,2 μm. Não foi possível a análise estatística entre esses dois últimos grupos devido ao número reduzido de pacientes num dos grupos.

Em relação a complicações pós biópsia óssea, doze pacientes não tiveram complicações, quatro tiveram dor leve e uma paciente teve pequeno hematoma local.

3.3- Resultados dos Marcadores Bioquímicos de Formação Óssea

Em relação aos marcadores bioquímicos de formação óssea, verificamos que a osteocalcina encontrava-se dentro dos valores de normalidade em todos os pacientes (tabela 7). Não detectamos correlações deste parâmetro com os resultados bioquímicos ou de histomorfometria.

A fosfatase alcalina fração óssea encontrava-se elevada em 10 pacientes (tabela 7) e também não encontramos correlações deste parâmetro com os resultados histomorfométricos e bioquímicos.

Tabela 7- Marcadores Bioquímicos de Formação Óssea.

Pacientes	Osteocalcina (ng/mL)	Fosfatase alcalina fração óssea (%)
1	9,0	23,20
2	18,2	29,30
3	8,1	20,10
4	37,8	17,9
5	20,6	18,60
6	16,5	18,90
7	10,8	NR
8	8,5	29,80
9	12,0	33,20
10	43,3	16,00
11	7,8	18,80
12	21,5	21,80
13	15,4	23,80
14	18,1	24,70
15	20,9	26,2
16	10,3	19,0
17	17,8	21,10
Média±SD	17,4 ± 10	22,6 ± 5

Valor normal de osteocalcina considerado para idade e sexo = 5,2 a 39,4 ng/ml.

Valor normal de fosfatase alcalina fração óssea = até 20% da fosfatase total.

NR= não realizado.

3.4- Resultados de Cultura de Osteoblastos

Dos 17 fragmentos ósseos colocados em cultura, três não apresentaram células e em um houve contaminação. Oito fragmentos de controles foram colocados em cultura, sendo três descartados por não preencherem as caracterizações dos osteoblastos já descritas. Foram considerados portanto os resultados das culturas de osteoblastos de 13 pacientes e 5 controles. Os osteoblastos dos pacientes mostraram uma proliferação celular menor quando comparado ao grupo controle, $910,2 \pm 437,1$ vs 2261 ± 1121 dpm/well $p = 0,0016$ respectivamente, (figura 8).

Não houve correlação da proliferação celular com parâmetros de histomorfometria, porém houve correlação com os níveis séricos de $25(\text{OH})\text{D}_3$ dos pacientes, $r = 0,6$ $p = 0,02$, (figura 9).

Os resultados de fosfatase alcalina das células foi de $5 \pm 4,3$ UI/L/mg, não sendo diferente em relação aos controles, $5,2$ UI/L/mg.

Figura 8

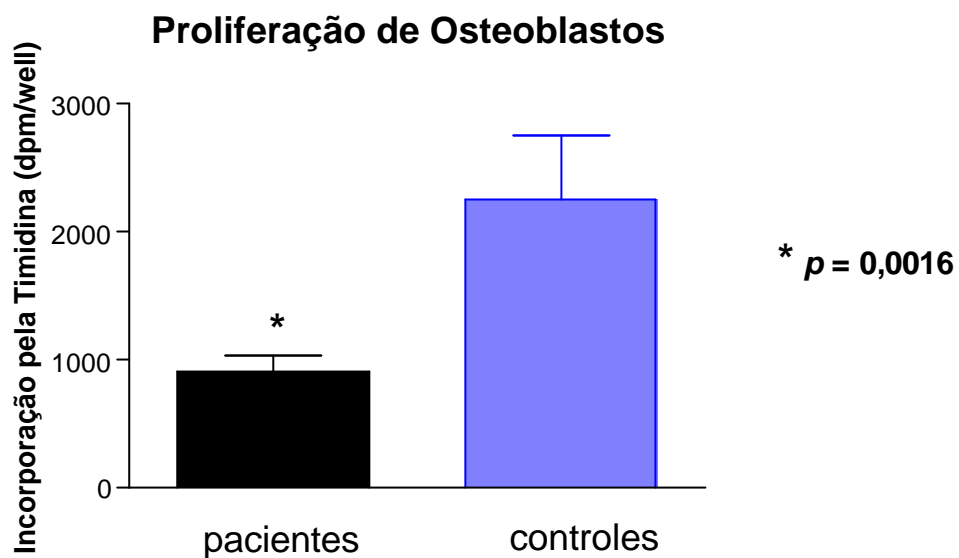
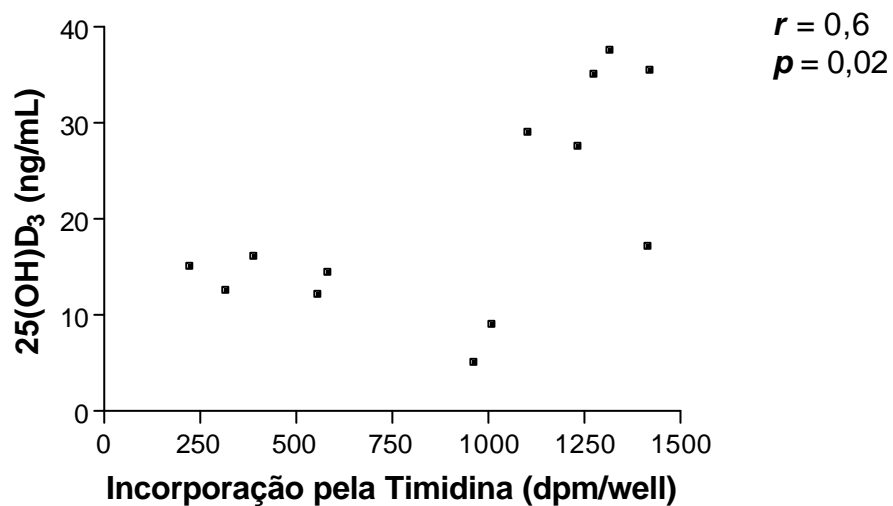


Figura 9

Correlação entre Incorporação pela Timidina de Osteoblastos em Cultura e 25(OH)D₃ dos Pacientes



4 – DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que pacientes com proteinúria apresentam baixo remanejamento ósseo e alterações de microarquitetura, bem como diminuição da proliferação dos osteoblastos *in vitro*. Uma possível explicação para essas alterações estaria relacionada ao metabolismo da vitamina D.

A vitamina D é um hormônio que tem a importante função de manter a homeostase do metabolismo do cálcio e dos ossos (44). Seus metabólitos são lipofílicos e quando presentes na circulação sanguínea estão obrigatoriamente ligados a uma proteína (44). Segundo Hosogame (2003) a principal proteína carreadora desses metabólitos é a PCVD, que apresenta alta afinidade pela 25(OH)D₃.

Os valores de normalidade da 25(OH)D₃, metabólito usado para avaliar os estoques de vitamina D (12), ainda são conflitantes. Thomas *et al.* estudando uma população não selecionada de pacientes de um hospital geral, encontrou uma relação entre os níveis séricos de PTH e de 25(OH)D₃, onde níveis abaixo de 15 ng/mL de 25(OH)D₃ foram relacionados a valores elevados de PTH (45). Outros autores admitem como concentração adequada de 25(OH)D₃ valor acima de 30 ng/mL, visto que níveis menores favorecem o aumento de PTH (46). Considerando esses critérios, a maioria dos nossos pacientes teriam níveis inadequados de 25[OH]D₃.

Em nosso estudo, a correlação positiva dos níveis de 25(OH)D₃ com a albumina sérica e negativa com a proteinúria, bem como, menores níveis séricos desse metabólito nos pacientes mais proteinúricos quando comparados aos menos proteinúricos demonstram a perda urinária dessa vitamina, fato também observado em outros estudos (47). Essa perda urinária além de ser secundária ao aumento da

permeabilidade glomerular pode estar associada a uma incompleta reabsorção tubular do complexo 25(OH)D₃-PCVD, como foi demonstrado em ratos albuminúricos, onde a grande carga de albumina filtrada competiria com a PCVD nos receptores comuns, sistema megalina – cubilina (44).

A concentração de 1,25(OH)₂D₃ foi normal em 70% dos nossos pacientes. Valores séricos normais de 1,25(OH)₂D₃ em pacientes com deficiência de 25(OH)D₃ poderiam ter duas explicações: primeiro, pela ação do PTH que inibiria a enzima 24[OH]ase responsável pela degradação da 1,25(OH)₂D₃ em metabólitos inativos (44,48) e segundo, por ser a concentração sérica da 25(OH)D₃ mil vezes maior que a da 1,25(OH)₂D₃, assim, quedas de até 1/3 nos níveis séricos da 25(OH)D₃ ainda seriam suficientes para manter níveis normais de 1,25(OH)₂D₃ (44). Nordin *et al.* em recente revisão, concluíram que existe uma correlação bifásica entre as concentrações séricas de 25(OH)D₃ e 1,25(OH)₂D₃. Dessa forma, os níveis séricos de 25(OH)D₃ se correlacionariam positivamente com os níveis de 1,25(OH)₂D₃, uma vez que a primeira é precursora da segunda, porém, diante de concentrações reduzidas de 25(OH)D₃ a correlação com a 1,25(OH)₂D₃ seria negativa, pois os níveis séricos da 1,25(OH)₂D₃ estariam mantidos pela ação do PTH (49). Esses dados não puderam ser comprovados em nosso estudo, provavelmente pelo número reduzido de pacientes incluídos.

Com relação a calciúria encontramos em nossos pacientes uma correlação negativa com a proteinúria e positiva com albumina sérica e, em média, valores inferiores a controles brasileiros (40). Relatos de literatura mostram resultados semelhantes aos que encontramos (15,17). Vale lembrar que vários fatores poderiam estar envolvidos na excreção renal de cálcio como, por exemplo, a excreção de sódio,

alimentação, fluxo urinário, os níveis séricos de PTH e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (3). Em nossos pacientes a excreção de sódio não apresentou correlação com a calciúria e a ingestão de cálcio dos pacientes foi semelhante a controles de estudo brasileiro (40). Assim, a correta fisiopatogenia da hipocalciúria nestes pacientes permanece indefinida, porém é sabido que aumentos de $25(\text{OH})\text{D}_3$ induzem hipercalciúria enquanto deficiências, hipocalciúria. Desse modo, nossos dados de hipocalciúria estão de acordo com o déficit de $25(\text{OH})\text{D}_3$ que estes pacientes apresentam (3,50).

As alterações encontradas na histomorfometria óssea poderiam ser decorrentes da deficiência de $25(\text{OH})\text{D}_3$ e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Essa deficiência diminuiria a absorção intestinal de cálcio, o que estimularia o PTH e a própria $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a promoverem osteoclastogênese (12). O aumento da mobilização do cálcio dos ossos pelos osteoclastos resultaria nas alterações descritas na histomorfometria óssea (12). Hosogane *et al.* estudando ratos deficientes em vitamina D, encontraram alterações ósseas semelhantes as do nosso estudo (44). A presença de osteomalácia encontrada em outros estudos (26,27), poderia ser um reflexo de níveis séricos mais baixos de $25(\text{OH})\text{D}_3$ em comparação aos observados em nossos resultados. Outro dado em relação a osteomalácia é de Chan *et al.* que estudando ratos nefróticos atribuíram a ausência de osteomalácia ao curto tempo de síndrome nefrótica (17). É de relevância salientar que alterações ósseas estavam presentes, mesmo nos pacientes com proteinúria menos intensa, sugerindo que essas alterações não dependem somente da intensidade da proteinúria, mas também de sua manutenção ao longo do tempo.

Não podemos atribuir as alterações ósseas encontradas ao uso de imunossupressão, porque pacientes que nunca tinham usado imunossupressão (n=

10) também apresentaram alterações ósseas. Por esses motivos, os resultados foram atribuídos inicialmente a proteinúria.

Em nosso protocolo havia motivações de confrontar medidas de marcadores bioquímicos do turnover ósseo já consagrados com resultados de biópsia óssea, a fim de avaliar sua utilização no diagnóstico da doença óssea. Estudos desses marcadores em síndrome nefrótica são escassos. Trabalho experimental em ratos nefróticos mostrou um aumento de osteocalcina e piridinolina sugerindo que poderia haver um turnover ósseo aumentado (34). No presente trabalho, os marcadores bioquímicos de formação óssea, osteocalcina e fosfatase alcalina fração óssea, não se mostraram úteis para detectar alterações do metabolismo ósseo na síndrome nefrótica, pois não houve nenhuma correlação entre esses marcadores e os resultados de bioquímica ou histomorfometria óssea, e nem tampouco alterações importantes de seus valores.

Este trabalho é pioneiro na realização de cultura de osteoblastos de pacientes proteinúricos. A diminuição da proliferação osteoblástica corrobora com a diminuição da remodelação óssea detectada na histomorfometria. Trabalhos envolvendo cultura de osteoblasto e histomorfometria óssea foram desenvolvidos em pacientes com insuficiência renal crônica, onde pacientes com doença óssea adinâmica cursavam com menor proliferação de osteoblastos (51,52). Recentemente Freundlich *et al.* incubando osteoblastos normais com soro de crianças nefróticas observaram um aumento de fosfatase alcalina e RANK_L no sobrenadante de cultura, correlacionando esses achados a um aumento da atividade osteoblástica (38). Em nosso estudo não encontramos diferença na fosfatase alcalina do sobrenadante de cultura entre pacientes e controles, porém, poderia ser decorrente do pequeno número de pacientes estudados.

Os achados deste estudo corroboram com a existência de comprometimento ósseo nos pacientes proteinúricos, porém, a deficiência de 25(OH)D₃ não explica todas as alterações. Outros fatores poderiam ser implicados, entre eles, a perda da PCVD, que parece ter uma ação direta na atividade da vitamina D como é sugerido em estudo experimental (11), a hipoalbuminemia visto que é um importante fator trófico, além de perdas urinárias de frações do hormônio do crescimento como insulina like growth factor (IFG), fatores inflamatórios e interleucinas.

A reposição de vitamina D nos pacientes proteinúricos ainda não é consenso, entretanto, frente aos nossos resultados, tal reposição merece atenção do nefrologista.

Assim nossos dados apontam para a existência de doença óssea em pacientes proteinúricos, por provável perda urinária de 25(OH)D₃, que é o maior substrato para a forma ativa de vitamina D, contudo mais estudos para o entendimento da fisiopatologia dessas alterações ósseas ainda são necessários.

Em resumo pacientes glomerulopatas proteinúricos com função renal normal apresentam:

- baixa excreção urinária de cálcio com correlação positiva com albumina sérica e negativa com a proteinúria.
- Correlação positiva entre 25(OH)D₃ e albumina sérica e negativa com a proteinúria.
- Histomorfometria óssea compatível com doença de baixo remanejamento e comprometimento da microarquitetura.

- Baixa proliferação celular de osteoblastos quando em cultura, com correlação positiva com níveis séricos de 25(OH)D₃. Sendo estas comprovações inéditas na literatura.

Como conclusão, nossos achados sugerem fortemente que há alteração do metabolismo ósseo em pacientes proteinúricos, por provável perda urinária de 25(OH)D₃. Assim sendo, devemos ficar atentos para a doença óssea em pacientes com proteinúrias altas e/ou prolongadas, mesmo se não forem associados imunossupressores ao tratamento.

5- REFERÊNCIAS

1. Crew RJ, Radhakrishnan J, Appel G: Complications of the nephritic syndrome and their treatment. *Clin Nephrol* 62: 245-259, 2004.
2. Bikle DD, Gee E, Halloran V, Haddad JG: Free 1,25-Dihydroxyvitamin D Levels in Serum from Normal Subjects, Pregnant Subjects, and Subjects with Liver Disease. *J Clin Invest* 74: 1966-1971, 1984.
3. Horst RL, Reinhardt TA: Vitamin D Metabolism. In: *Vitamin D*, edited by Feldman D, Glorieux, Pike, 1997, pp 13-31.
4. Cooke N, Haddad J G: Vitamin D Binding Protein. In: *Vitamin D*, edited by Feldman D, Glorieux, Pike, 1997, pp 87-101.
5. Hilpert J, Wogensen L, Thykjaer T, Wellner M, Schlichting U, Orntoft F, Bachmann S, Nykjaer A, Willnow TE: Expression profiling confirms the role of endocytic receptor megalin in renal vitamin D₃ metabolism. *Kidney Int* 62: 1672-1681, 2002.
6. Verroust PJ, Birn H, Nielsen R, Kozyraki R, Christensen EI: The tandem endocytic receptors megalin and cubilin are important proteins in renal pathology. *Kidney Int* 62: 745-756, 2002.

7. Bland R, Zehnder D, Hewison M: Expression of 25-hydroxyvitamin D₃ - 1[alpha]-hydroxylase along the nephron: new insights into renal vitamin D metabolism. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9: 17-22, 2000.
8. Osicha TM, Strong KJ, Nikolic-Paterson D, Atkins RC, Jerums G, Comper WD: Renal processing of serum proteins in an albumin-deficient environment: an in vivo study of glomerulonephritis in the Nagase analbuminaemic rat. *Nephrol Dial Transplant* 19: 320-328, 2004.
9. Gekle M: Renal Tubule Albumin Transport. *Annu Rev Physiol* 67: 573-594, 2005.
10. Gomme PT, Bertolini J: Therapeutic potential of vitamin D-binding protein. *Trends in Biotechnol* 22: 340-345, 2004.
11. Safadi FF, Thornton PM, Hollis H, Bruce W, Gentile M, Haddad JG, Liebharber SA, Cooke NE: Osteopathy and resistance to vitamin D toxicity in mice null for vitamin D binding protein. *J Clin Invest* 103: 239-251, 1999.
12. Holick MF: Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 1678s – 1688s, 2004.

13. Bazzi C, D'Amico G: Qualitative Aspects of Proteinuria Predict Progression and Response to Therapy Better than its Quantity. *Nephrolgy Self-Assessment Program 4*: 111-116, 2005.
14. Khamiseh G, Vaziri ND, Oveisi F, Ahmadnia MR, Ahmadnia L: Vitamin D Absorption, Plasma Concentration and Urinary Excretion of 25-Hydroxyvitamin D in Nephrotic Syndrome. *Soc Experim Biol Med* 196: 210-213, 1991.
15. Goldstein DA, Oda Y, Kurokawa K, Massry SG: Blood Levels of 25-hydroxyvitamin D in Nephrotic Syndrome. *Ann Int Med* 87: 664-667, 1977.
16. Goldstein DA, Haldiman B, Sherman D, Norman AW, Massry SG: Vitamin D Metabolites and Calcium Metabolism in Patients with Nephrotic Syndrome and Normal Renal Function. *J Clin Endocrinol Metabol* 52: 116-120, 1981.
17. Chan YL, Mason RS, Parmentier M, Savdie E, Lissner D, Posen S: Vitamin D metabolism in Nephrotic rats. *Kidney Int* 24: 336-341, 1983.
18. Mizokuchi M, Kubota M, Tomino Y, Koide H: Possible Mechanism of Impaired Calcium and Vitamin D Metabolism in Nephrotic rats. *Kidney Int* 42: 335-340, 1992.

19. Huang JP, Bai KM, Wang BL: Vitamina D and Calcium Metabolism in Children with Nephrotic Syndrome of Normal Renal Function. *Chin Med J* 105: 828-832, 1992.
20. Grymonprez A, Proesmans W, Van Dyck M, Jan I, Goos G, Bouillon R: Vitamin D Metabolism in Childhood Nephrotic Syndrome. *Pediatr Nephrol* 9: 278-281, 1995.
21. Guatali S, Sharma RK, Mittal A, Godbole M, Gupta A, Gujral R, Gulati K: Are Children with Idiopathic Nephrotic Syndrome at Risk for Metabolic Bone Disease? *J Am Soc Nephrol* 12: 103A, 2001.
22. Auwerx J, De Keyser L, Bouillon R, De Moor P: Decreased free 1,25-dihydroxycholecalciferol index in patients with the nephrotic syndrome. *Nephron* 42: 231-235, 1986.
23. Koenig K G, Lindberg JS, Zerwekh J E, Padalino P K, Cushner H M, Copley J B: Free and total 1,25 dihydroxyvitamin D levels in subjects with renal disease. *Kidney Int* 41: 161-165, 1992.
24. Van Hoof H J C, Sevaux R G L, Van Baelen H, Swinkels L M J W, Klipping C, Ross H A, Sweep C G J: Relationship between free and total 1,25 dihydroxyvitamin D in conditions of modified binding. *Eu J Endocrinol* 144: 391-396, 2001.

25. Lim P, Jacob E, Tock EPC, Pwee HS: Calcium and phosphorus metabolism in nephrotic syndrome. *Q J Med* 183: 327-338, 1997.
26. Malluche HH, Goldstein DA, Massry SG: Osteomalacia and hyperparathyroid bone disease in patients with nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 63: 494-500, 1979.
27. Mittal SK, Dash SC, Tiwari SC, Agarwal SK, Saxena S, Fishbane S: Bone histology in patients with nephrotic syndrome and normal renal function. *Kidney Int* 55: 1912-1919, 1999.
28. Tessitore N, Bonucci E, D'Angelo A, Lund B, Corgnati A, Lund B, Valvo E, Lupo A, Maschio G: Bone histology and calcium metabolism in patients with nephrotic syndrome and normal or reduced renal function *Nephron* 37: 153-159, 1984.
29. Korkor A, Schwartz J, Bergfeld M, Teitelbaum S, Avioli L, Klahr S, Slatopolsky E: Absence of Metabolic Bone Disease in Adult Patients with the Nephrotic Syndrome and Normal Renal Function. *J. Clin Endocrinol Metab*: 56: 496 – 500, 1983.
30. Ferreira A, Drüeke TB: Biological Markers in the Diagnosis of the Different Forms of Renal Osteodystrophy. *Am J Med Scienc* 320: 85-89, 2000.

31. Ureña P, de Vernejoul MC: Circulating Biochemical Markers of Bone Remodeling in Uremic Patients. *Kidney Int* 55: 2141-2156, 1999.
32. Bervoets ARJ, Spasovski GB, Behets GJ, Dams G, Polenakovic MH, Zafirovska K, Van Hoof VO, De Broe ME, D'Haese PC: Useful Biochemical Markers for Diagnosing Renal Osteodystrophy in Predialysis End-Stage Renal Failure Patients. *Am J Kidney Dis* 41: 997-1007, 2003.
33. Parker CR, Blackwell PJ, Freemont AJ, Hosking DJ: Biochemical Measurements in the Prediction of Histologic Subtype of Renal Transplant Bone Disease in Women. *Am J Kidney Dis* 40: 385-396, 2002.
34. Sierra RI, Specker BL, Jimenez F, Cruz C, Pedraza-Chaverri J: Biochemical bone markers, bone mineral content and bone mineral density in rats with experimental nephrotic syndrome. *Ren Fail* 19 (3): 409-424, 1997.
35. Fujita T, Satomura A, Hidaka M, Ohsawa I, Endo M, Ohi H: Acute Alteration in Bone Mineral Density and Biochemical Markers for Bone Metabolism in Nephrotic Patients Receiving High-Dose Glucocorticoid and One-Cycle Etidronate Therapy. *Calcif Tissue Int* 66: 195-199, 2000.
36. Robey PG, Termine JD: Human Bone Cells In Vitro. *Calcif Tissue Int* 37: 453-460, 1985.

37. Auf'mkolk B, Hauschka PV, Schwartz ER: Characterization of Human Bone Cells in Culture. *Calcif Tissue Int* 37: 228-235, 1985.
38. Freundlich M, Alonzo E, Bellorin-Font E, Weisinger JR: Increased Osteoblastic Activity and Expression of Receptor Activator of NF- κ B Ligand in Nonuremic Nephrotic Syndrome. *J Am Soc Nephrol* 16: 1-7, 2005.
39. Hollis BW: Assay of Circulating 1,25-Dihydroxyvitamin D Involving a Novel Single-Cartridge Extraction and Purification Procedure. *Clin Chem* 32: 2060-2063, 1986.
40. Martini LA, Cuppari L, Cunha MA, Schor N, Heilberg IP: Potassium and Sodium Intake and Excretion in Calcium Stone Forming Patients. *J Renal Nutr* 8:127-131, 1998.
41. Dos Reis, LM, Batalha JFR, Cardoso LA, Muñoz DR, Borelli A, Jorgetti V: Age related histomorphometric changes in bone in normal Brazilian men and women. *Bone* 23: Suppl 5, S 476, 1998.
42. Melsen F, Mosekilde L: Tetracycline Double-Labeling of Trabecular Bone in 41 Normal Adults. *Calcif Tiss Res* 26: 99-102, 1978.

43. Wergedal JE, Baylink DJ: Characterization of Cells Isolated and Cultured from Human Bone. *Proc. Soc. Exp. Biol Med* 176: 60-9, 1984.
44. Hosogane N, Shinki T, Kasuga H, Taketomi S, Toyama Y, Suda Tatsuo: Mechanisms for the reduction of 24,25-dihydroxyvitamin D₃ levels and bone mass in 24-hydroxylase transgenic rats. *FASEB J* 19, 2003.
45. Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, Shaw AC, Deraska DJ, Kitch BT, Vamvakas EC, Dick IM, Prince RL, Finkelstein JS: Hypovitaminosis D in Medical Inpatients. *New Englan J Med* 338: 777-783, 1998.
46. Gómez-Alonso C, Naves-Díaz ML, Fernández-Martín JL, Díaz-Lopez JB, Fernández-Coto MT, Cannata-Andía JB: Vitamin 25-hydroxyvitamin D cut-off levels. *Kidney Int* 63: Suppl 85 S44-S48, 2003.
47. Kano K, Nonoda A, Yoneshima H, Suda T: Serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D and 24,25-hydroxyvitamin D in patients with various types of renal disease. *Clin Nephrol* 14(6): 274-9, 1980.
48. Christakos S, Barletta F, Huening M, Dhawan P, Liu Y, Porta A, Peng X: Vitamin D Target Proteins: Function and Regulation. *J Cell Bioch* 88: 238-244, 2003.

49. Nordin BEG, Need AG: The Relation Between Serum Calcidiol and Calcitriol. *Bone* 2: 7-16, 2005.
50. Hewinson M, Zehnder D, Bland R, Stewart PM: 1α -hydroxylase and the action of vitamin D. *J Molec Endocrinol* 25: 141-148, 2000.
51. Marie PJ, Lomri A, Vernejoul MC, Morieux C, Graulet AM, Guéris J, Llach F: Relationships between Histomorphometric Features of Bone Formation and Bone Cell Characteristics in Vitro in Renal Osteodystrophy. *J Clin Endocrinol Metabol* 69: 1166-1173, 1989.
52. Sánchez MC, Bajo MA, Selgas R, Mate A, Sánchez-Cabezudo J, López-Barea F, Esbrit P, Martínez E: Cultures of Human Osteoblastic Cells from Dialysis Patients: Influence of Bone Turnover Rate on In Vitro Secretion of Interleukin-6 and Osteoblastic Cell Markers. *Am J Kidney Dis* 37: 30-37, 2001.