

Radiografia digital como método alternativo na avaliação da densidade óssea em ratos urêmicos

Digital radiography as an alternative method in the evaluation of bone density in uremic rats

Autores

Bárbara Bruna Abreu de Castro^{1,2,3} 

Wander Barros Carmo^{1,2,3} 

Jasmin³ 

Roberto Sotto Maior Fortes Oliveira³ 

Vera Maria Peters³ 

Vanda Jorgetti⁴ 

Melani Ribeiro Custodio⁴ 

Helady Sanders-Pinheiro^{1,2,3} 

¹ Universidade Federal de Juiz de Fora, Laboratório de Nefrologia Experimental e Núcleo de Experimentação Animal, Juiz de Fora, MG, Brasil.

² Universidade Federal de Juiz de Fora, Divisão de Nefrologia e Núcleo Interdisciplinar de Estudos e Pesquisa em Nefrologia, Juiz de Fora, MG, Brasil.

³ Universidade Federal de Juiz de Fora, Centro de Biologia da Reprodução, Juiz de Fora, MG, Brasil.

⁴ Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Laboratório de Fisiopatologia Renal, São Paulo, SP, Brasil.

Data de submissão: 10/01/2019.

Data de aprovação: 24/04/2019.

Correspondência para:

Helady Sanders-Pinheiro.

E-mail: heladysanders@gmail.com

DOI: 10.1590/2175-8239-JBN-2019-0008

RESUMO

Introdução: A radiografia digital (RxD) pode representar uma alternativa adequada para investigar o distúrbio mineral e ósseo (DMO) e a perda de densidade óssea (DO) em modelos de roedores da doença renal crônica (DRC). O objetivo deste estudo foi utilizar a RxD para avaliar a DO em ratos com DRC, e avaliar a correlação entre os achados da RxD e marcadores séricos de DMO e histomorfometria óssea. **Métodos:** A uremia foi induzida pela alimentação de ratos Wistar com dieta enriquecida com adenina (0,75% por 4 semanas/0,10% por 3 semanas); os resultados foram comparados com um grupo controle nas semanas experimentais 3, 4 e 7. Os seguintes marcadores bioquímicos foram medidos: clearance de creatinina (CCr), fosfato (P), cálcio (Ca), fração excretada de P (FeP), fosfatase alcalina (ALP), fator de crescimento de fibroblastos-23 (FGF-23) e paratormônio (PTH). A imagem da RxD foi obtida e a análise histomorfométrica foi realizada com o fêmur esquerdo. **Resultados:** como esperado, na semana 7, os ratos urêmicos apresentaram redução do CCr e níveis mais altos de P, FeP e ALP em comparação aos controles. A RxD confirmou a menor DO em animais urêmicos ($0,57 \pm 0,07$ vs. $0,68 \pm 0,06$ u.a.; $p = 0,016$) em comparação aos controles no final da semana 7, quando a DMO foi mais proeminente. Uma forma grave de doença óssea de alta renovação celular acompanhou essas mudanças bioquímicas. A DO, medida na RxD foi correlacionada a P ($r = -0,81$; $p = 0,002$), ALP ($r = -0,69$, $p = 0,01$), PTH ($r = -0,83$, $p = 0,01$), OS/BS ($r = -0,70$ $p = 0,02$) e Ob.S/BS ($r = -0,70$; $p = 0,02$). **Conclusão:** A DO quantificada por RxD esteve associada às complicações típicas da DMO na DRC e mostrou-se viável na avaliação de alterações ósseas na DRC.

Palavras-chave: Densidade Óssea; Radiografia; Modelos Animais de Doenças; Insuficiência Renal Crônica; Distúrbio Mineral e Ósseo na Doença Renal Crônica.

ABSTRACT

Introduction: Digital radiography (DRx) may provide a suitable alternative to investigate mineral and bone disorder (MBD) and loss of bone density (BD) in rodent models of chronic kidney disease (CKD). The objective of this study was to use DRx to evaluate BD in CKD rats, and to evaluate the correlation between DRx findings and serum MBD markers and bone histomorphometry. **Methods:** Uremia was induced by feeding Wistar rats an adenine-enriched diet (0.75% for 4 weeks/0.10% for 3 weeks); outcomes were compared to a control group at experimental weeks 3, 4, and 7. The following biochemical markers were measured: creatinine clearance (CrC), phosphate (P), calcium (Ca), fractional excretion of P (FeP), alkaline phosphatase (ALP), fibroblast growth factor-23 (FGF-23), and parathyroid hormone (PTH). DRx imaging was performed and histomorphometry analysis was conducted using the left femur. **Results:** As expected, at week 7, uremic rats presented with reduced CrC and higher levels of P, FeP, and ALP compared to controls. DRx confirmed the lower BD in uremic animals (0.57 ± 0.07 vs. 0.68 ± 0.06 a.u.; $p = 0.016$) compared to controls at the end of week 7, when MBD was more prominent. A severe form of high-turnover bone disease accompanied these biochemical changes. BD measured on DRx correlated to P ($r = -0.81$; $p = 0.002$), ALP ($r = -0.69$, $p = 0.01$), PTH ($r = -0.83$, $p = 0.01$), OS/BS ($r = -0.70$; $p = 0.02$), and Obs/BS ($r = -0.70$; $p = 0.02$). **Conclusion:** BD quantified by DRx was associated with the typical complications of MBD in CKD and showed to be viable in the evaluation of bone alterations in CKD.

Keywords: Bone Density; Radiography; Disease Models, Animal; Renal Insufficiency, Chronic; Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder.



INTRODUÇÃO

Em humanos, o osso trabecular tem uma taxa de renovação celular aproximadamente 8 vezes mais rápida do que a do osso compacto, e é altamente responsivo a estímulos metabólicos¹. Essa alta taxa de renovação torna o osso trabecular o principal local para a detecção da perda óssea precoce que precede as fraturas, e para monitorar a eficácia de diferentes tratamentos com o objetivo de prevenir ou retardar a perda óssea em situações clínicas². Assim, a avaliação da densidade óssea (DO) é considerada uma importante ferramenta clínica para a detecção de patologias que afetam a estrutura óssea³.

A densidade óssea é avaliada utilizando métodos de densitometria que se baseiam no princípio de absorção diferencial de fótons por tecidos de diferentes radiodensidades, bem como por diferentes regiões de radiodensidades variáveis dentro do mesmo tecido. A absorção de fótons está diretamente relacionada à espessura e composição do tecido ósseo. Portanto, à medida que a DO diminui, menos fótons são absorvidos, resultando na atenuação do sinal radiográfico^{4,5}.

A absorptometria radiológica de dupla energia (DXA) é o método densitométrico mais utilizado para avaliar quantitativamente o tecido ósseo na população geral, pois é não invasivo, utiliza baixas doses de radiação e proporciona avaliação de DO com alta precisão e boa sensibilidade e especificidade. A tomografia computadorizada quantitativa (TCQ) está sendo cada vez mais usada como um método alternativo, compartilhando os mesmos atributos da DXA, mas com a vantagem adicional de proporcionar uma avaliação separada da DO cortical e trabecular^{4,6}.

O escore ósseo trabecular é um novo método que estima a microarquitetura trabecular a partir de imagens de DXA. Estudos em humanos confirmam sua associação com os achados da TCQ e com avaliação óssea trabecular por histomorfometria óssea, tornando este um método promissor para a avaliação do risco de fratura em indivíduos com e sem doença renal^{7,8}. Em pacientes com doença renal crônica (DRC), a histomorfometria é considerada o padrão-ouro para a avaliação da DO^{4,6}. Como a histomorfometria é altamente invasiva, métodos alternativos não invasivos estão sendo estudados, combinando técnicas de imagem com a análise de biomarcadores de renovação celular óssea, a fim de avaliar o risco de fratura em pacientes com DRC^{5,9}.

Em estudos experimentais, a radiografia digital (RxD) também tem sido utilizada para a avaliação

da DO^{10,11}. Com a RxD, as imagens digitais são obtidas eletronicamente, convertidas em dados numéricos usando um software customizado, amostrados e armazenados para análise off-line. Para análise, a imagem digital é dividida em pixels, e o tom da escala de cinza para cada pixel é numericamente codificado. Assim, cada pixel é associado a um número que representa a cor da área ou a intensidade de tons de cinza. Dessa forma, a imagem é convertida em um conjunto de números e pode ser visualizada em uma tela de computador ou ser impressa para análise^{12,13}. Até o momento, a RxD não foi utilizada para análise de distúrbio mineral e ósseo (DMO) em modelos experimentais de DRC.

O objetivo deste estudo foi avaliar a DO em ratos urêmicos utilizando RxD e avaliar a associação de medidas baseadas em imagens com os marcadores bioquímicos de DMO renal e com aspectos da histomorfometria óssea.

MÉTODOS

DECLARAÇÃO DE ÉTICA

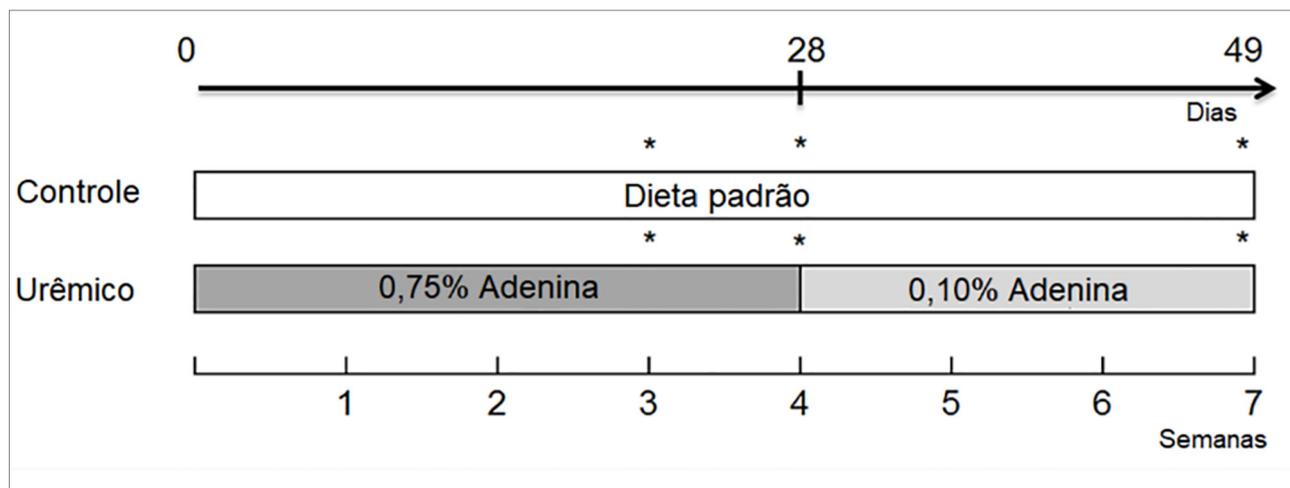
Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Lei Federal Brasileira, (11.794, de 08 de outubro de 2008) e as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Testes em Animais. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Juiz de Fora, protocolo número 031/2013.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL E DIETAS

Utilizamos ratos Wistar machos com 8 a 12 semanas de idade, pesando 200g a 300g. Os animais foram obtidos no Centro de Biologia da Universidade Federal de Juiz de Fora e divididos aleatoriamente em dois grupos (grupos Controle e Urêmico), contendo 24 animais cada. Os animais do grupo Controle foram alimentados com dieta padrão (Pragsoluções, Jaú, Brasil) até o final de 7 semanas. Os animais do grupo Urêmico foram alimentados com dieta enriquecida com adenina a 0,75% por 4 semanas, seguida de dieta enriquecida com adenina a 0,10% nas três semanas seguintes (Pragsoluções) (Figura 1).

Oito animais de cada grupo foram sacrificados nas semanas experimentais 3, 4 e 7. No dia anterior à eutanásia, os animais foram alojados em gaiolas metabólicas para coleta de urina de 24 horas. Os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e ketamina (90 mg/kg) (König, Avellaneda, Argentina), IP. Amostras de sangue foram coletadas por punção

Figura 1. Do dia 0 ao dia 49 (7 semanas), a dieta padrão foi administrada ao grupo Controle. Do dia 0 ao dia 28 (4 semanas), foi administrada uma dieta de adenina a 0,75% ao grupo Urêmico. No dia 28, a dieta de adenina a 0,75% foi interrompida, e do dia 28 ao dia 49 (i.e., 3 semanas), foi administrada uma dieta de adenina a 0,1% ao grupo Urêmico. O peso corporal, a ingestão de alimentos e água foram medidos uma vez por semana. Estrelas indicam os pontos de tempo de medição da ingestão de água, volume de urina e eutanásia (N = 8).



cardíaca. Os fêmures esquerdos foram removidos para análise por RxD e histomorfometria óssea.

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Nas semanas 3, 4 e 7, a creatinina sérica, P, ALP e Ca, e os níveis de creatinina e P urinários foram determinados usando-se um analisador automático Progress da LabMax (Labtest Diagnostica SA, Lagoa Santa, Brasil). Além disso, os testes de hormônio paratireóideo sérico (PTH) e kit de fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23) (kit FGF-23 ELIZA, Clone Cloud Corp. Houston, EUA) foram realizados por ELISA (R & D Systems, Minneapolis, EUA).

HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA

O fêmur esquerdo de 5 animais por grupo foi retirado, dissecado livre de tecido mole, imerso em etanol a 70% e processado como descrito previamente¹⁴. Parâmetros estáticos, estruturais e dinâmicos de formação e reabsorção óssea foram medidos na metáfise distal (aumento de 250x; 30 campos), 195 µm da placa de crescimento epifisária, usando um analisador de imagem OsteoMeasure (Osteometrics, Atlanta, GA, USA). Os parâmetros estruturais incluíram espessura trabecular (em µm), separação trabecular (em µm) e número trabecular (em trabéculas/mm). Os índices de formação estática incluíram a proporção de volume ósseo trabecular e volume osteóide em relação ao volume ósseo total (ambos em%), espessura osteóide (em µm) e superfícies osteóide/osteoblasto (ambos em% da superfície óssea). Os índices de reabsorção estática incluíram superfície erodida e superfície de osteoclastos (ambos em% da superfície óssea). A taxa de aposição mineral

foi determinada a partir da distância entre os dois marcadores de tetraciclina, dividida pelo intervalo de tempo entre as duas administrações de tetraciclina e expressa em µm/dia. O tempo de retardo da mineralização foi expresso em dias. A porcentagem de superfície dupla (mineralizante) marcada com tetraciclina por superfície óssea e taxa de formação óssea completaram a avaliação dinâmica. Os resultados também são descritos de acordo com a classificação do volume de mineralização da renovação celular óssea (VRO)¹⁵. Índices histomorfométricos foram relatados usando a nomenclatura recomendada pela Sociedade Americana de Pesquisa Mineral e Óssea¹⁶. Todos os dados dos animais foram obtidos por examinadores cegos para o protocolo do estudo.

AVALIAÇÃO DE DO POR RxD

Para análise por RxD (método direto), o fêmur esquerdo de 6 animais por grupo foi fixado em etanol a 100%. Imagens de todo o osso foram então capturadas usando uma estação de imagem Pro Kodak In vivo, equipada com uma câmera CCD (Carestream Health Inc., Rochester, NY). As imagens das RxD foram obtidas usando os seguintes parâmetros: 60s de tempo de exposição, 2x2 binning, KVP35, filtro de alumínio de 0,8 mm, 2,8 f-stop e campo de visão de 80 mm. As imagens adquiridas foram analisadas usando o software Carestream MI Application (versão 5.0.2.30, Carestream Health Inc.). Após a calibração da imagem para densidade óptica, a área óssea foi delimitada utilizando-se a ferramenta de seleção automática e a intensidade média de cinza para cada pixel na área delimitada quantificada em unidades arbitrárias (u.a.)^{11,13,17}.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são reportados como média \pm desvio padrão ou mediana com mínimo e máximo, conforme apropriado para a distribuição dos dados avaliados, utilizando o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. As comparações entre os parâmetros bioquímicos da DMO na DRC para os grupos Controle e Urêmicos foram realizadas usando o teste-t de Student. Os coeficientes de correlação de Pearson e de Spearman foram usados para avaliar a relação entre DO, medido por RxD, e parâmetros bioquímicos e aspectos da histomorfometria óssea na semana 7. A significância estatística foi estabelecida em um valor de $p < 0,05$, e todas as análises foram realizadas usando-se o software de estatística SPSS (Versão 21; IBM Corporation, Chicago, IL).

RESULTADOS

MORTALIDADE E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Um animal morreu no grupo urêmico na semana 3. Os resultados da dieta enriquecida com adenina no CCr são mostrados na Figura 2A. O CCr foi acentuadamente menor no grupo Urêmico na semana 4, seguindo a dieta inicial com 0,75% de enriquecimento de adenina por 4 semanas, com níveis de $0,11 \pm 0,04$ mL/min/100g comparado a $0,75 \pm 0,44$ mL/min/100g para animais no Grupo controle ($p = 0,016$). Essa disfunção renal no grupo urêmico persistiu por 3 semanas após a redução da concentração de adenina na dieta para 0,1%, com níveis de CCr na semana 7 de $0,16 \pm 0,06$ mL/min/100g comparado a $0,62 \pm 0,29$ mL/min/100g para o grupo Controle ($p = 0,01$).

Disfunção renal foi associada à DMO caracterizada por anormalidades bioquímicas específicas. Hiperfosfatemia foi encontrada nos animais Urêmicos nos 3 momentos (Figura 2B). Os níveis de P no grupo Urêmico aumentaram em comparação aos animais do grupo Controle na semana 4, com níveis de $14,70 \pm 4,87$ mg/dL e $7,11 \pm 0,71$ mg/dL, respectivamente ($p = 0,01$). Os níveis de P permaneceram elevados na semana 7, com valores de $10,61 \pm 2,49$ mg/dL e $6,82 \pm 0,53$ mg/dL para os grupos Urêmico e Controle, respectivamente ($p = 0,001$) (Figura 2B).

A ALP foi estatisticamente maior no grupo Urêmicos em comparação com o grupo Controle, em todos os 3 pontos de tempo (Figura 2C). No grupo urêmico, a ALP aumentou gradualmente para $383,14 \pm 109,55$ u/L na semana 3, $452,71 \pm 153,43$ u/L na semana 4 e $561 \pm 90,90$ u/L no final

do experimento (semana 7). A fração excretada de P (FeP) aumentou enquanto a função renal piorou. Os níveis de FeP estavam elevados para os animais do grupo urêmico em comparação ao grupo controle, nos três momentos (Figura 2D). Os níveis de FeP nos animais Urêmicos aumentaram para $34,21 \pm 8,63\%$ e $71,59 \pm 20,23\%$ nas semanas 3 e 7, respectivamente, em comparação com $20,06 \pm 16,83\%$ na semana 7 para os animais do grupo Controle. Enquanto os níveis de Ca eram comparáveis entre os grupos nas semanas 3 e 4, os níveis foram elevados para os animais do grupo urêmico na semana 7 (Figura 2E).

Esperava-se um aumento nos níveis de FGF-23 paralelamente ao aumento da disfunção renal. No nosso modelo animal, no entanto, os níveis de FGF-23 apresentaram uma tendência para maior valor apenas na semana 3 (Figura 2F). Enquanto os níveis de PTH foram amplamente variáveis no grupo Urêmico, os níveis foram consistentemente maiores em comparação com o grupo Controle nas semanas 3 e 4 (Figura 2G). Os valores comparativos foram de $2.659,20 \pm 392,57$ pg / dL vs. $214,84 \pm 53,31$ pg / dL ($p = 0,001$), respectivamente, para os grupos Urêmico e Controle na semana 3, e $3.769,40 \pm 1693,62$ pg / dL vs. $214,84 \pm 53,31$ pg / dL ($p = 0,01$), respectivamente, na semana 4. Na semana 7, houve apenas uma tendência de os níveis de PTH serem maiores no grupo com uremia ($5.940,2 \pm 5.740,35$ pg / dL vs. $272,3 \pm 192,22$ pg / dL; $p = 0,09$) (Figura 2G).

HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA

A histomorfometria óssea revelou que os parâmetros ósseos estruturais não diferiram entre os grupos (Tabela 1). A taxa de formação óssea (BFR/BS) foi significativamente maior no grupo DRC do que no grupo controle. Outros parâmetros de formação óssea, tais como superfícies osteóide (OS/BS), osteoclastos (Oc.S/BS) e osteoblastos (Ob.S/BS) também foram significativamente maiores no grupo com DRC (Tabela 1). Estes resultados confirmaram a realização de uma doença óssea de alta taxa de renovação.

AVALIAÇÃO DE DO POR RxD

A análise qualitativa comparativa das imagens de DO dos fêmures esquerdos de animais dos grupos Urêmico e Controle está exibida na Figura 3A e 3B. O fêmur esquerdo de animais urêmicos mostrou várias áreas

Figura 2. Parâmetros bioquímicos coletados nas semanas 3, 4 e 7: (A) Clearance de creatinina (CCr), (mL/min/100g), (B) Fosfato sérico (P) (mg/dL), (C) Fosfatase alcalina (ALP) (u/L), (D) Fração excretada de P (FeP) (%), (E) Cálcio sérico (Ca) (mg/dL), (F) fator de crescimento de fibroblastos-23 (FGF-23) (pg/dL) e (G) hormônio paratireóideo (PTH) (pg/dL). Os dados são expressos como média \pm DP para cada grupo e o teste-t de Student foi usado para comparar os dados em cada semana, * $p < 0,05$.

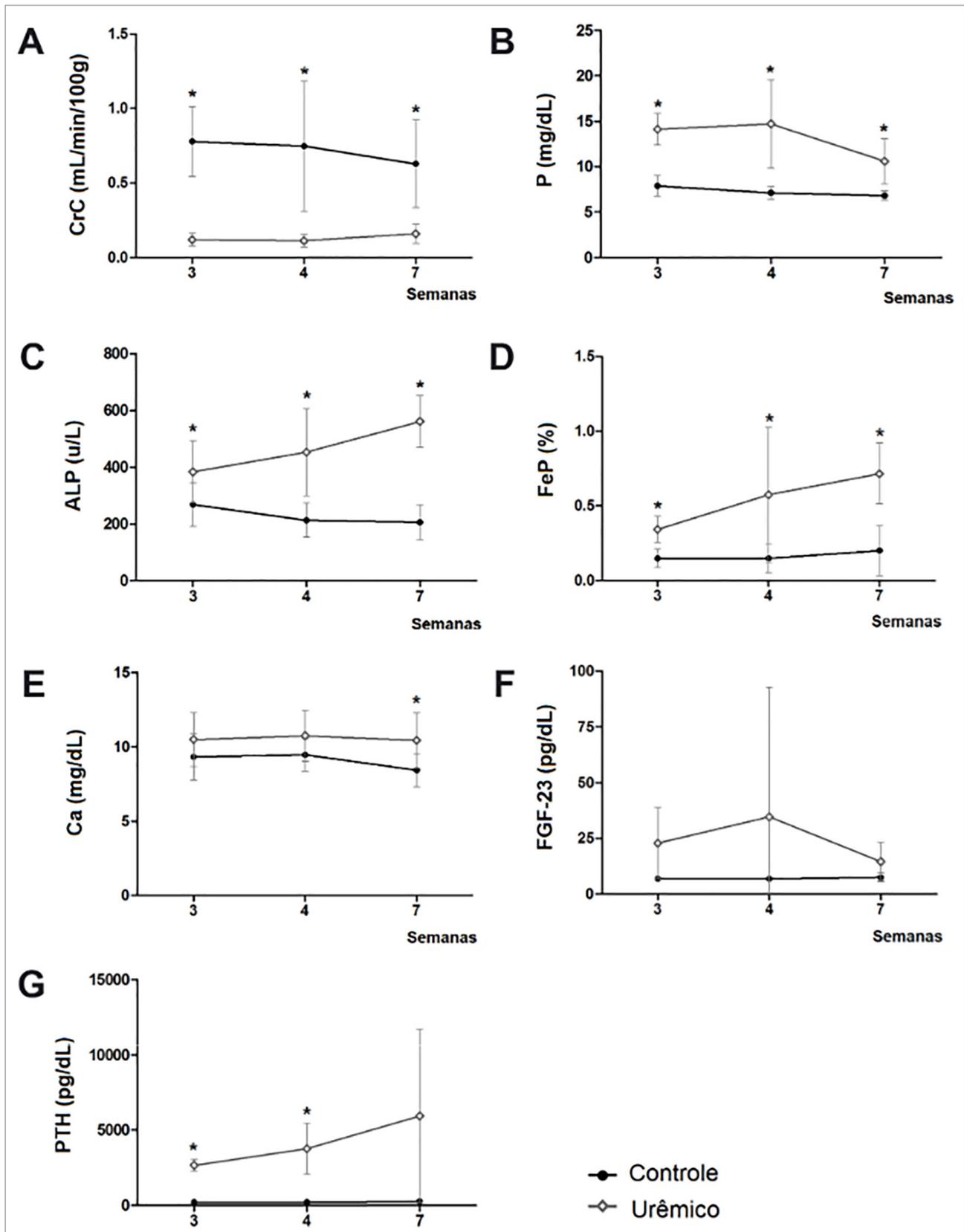
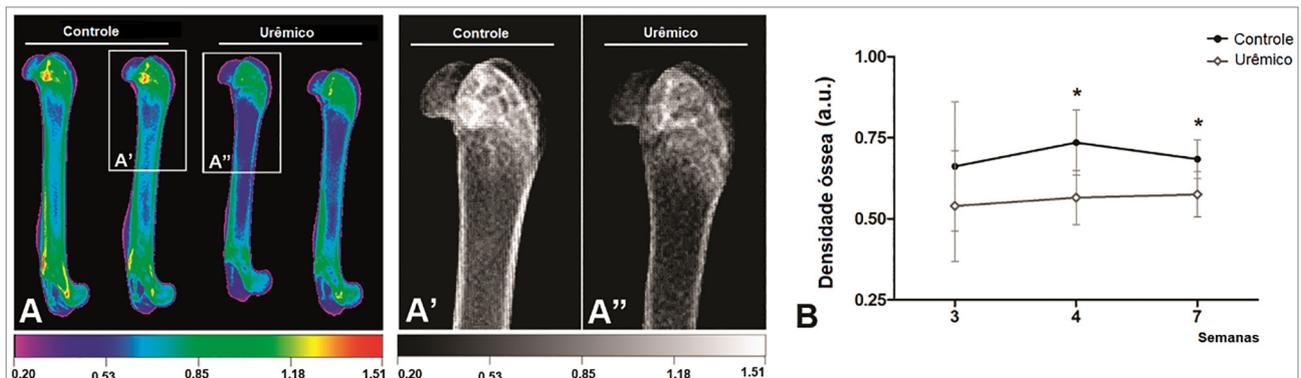


TABELA 1 DADOS DE HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA APÓS 7 SEMANAS^a

Parâmetros ósseos	Controle	Urêmico	<i>p</i>
<i>Parâmetros estruturais</i>			
Volume Trabecular (VO/VT, %)	22.64 ± 3.71	25.69 ± 15.83	0.686
Número Trabecular (Tb.N, mm)	4.20 ± 0.35	4.46 ± 2.48	0.810
Espessura Trabecular (Tb.Th, μm)	54.03 ± 8.57	57.78 ± 17.92	0.680
Separação Trabecular (Tb.Sp, μm)	185.25 ± 18.63	265.23 ± 229.92	0.434
<i>Parâmetro de formação</i>			
Espessura osteóide (O.Th, μm)	0.97 (0.49 - 1.46)	4.99 (2.63 - 25.68)	0.077
Superfície osteóide (OS/BS, %)	1.87 ± 1.13	33.20 ± 21.33	0.010
Superfície osteoblástica (Ob.S/BS, %)	1.71 ± 0.97	22.79 ± 11.67	0.007
Superfície mineralizante (MS/BS, %)	1.58 ± 0.77	2.59 ± 0.86	0.139
Taxa de aposição mineral (MAR, μm/dia)	0.37 ± 0.20	1.32 ± 0.66	0.021
Taxa de formação óssea (BFR/BS, μm ³ /μm ² /dia)	0.01 (0.0 - 0.01)	0.03 (0.02 - 0.04)	0.004
<i>Parâmetros de reabsorção</i>			
Superfície erodida (ES/BS, %)	3.67 ± 0.91	14.20 ± 7.42	0.017
Superfície osteoclástica (Oc.S/BS, %)	1.09 (0.32 - 1.13)	5.32 (0.34 - 7.19)	0.012

^aDados expressos como média ± DP e teste-t de Student para comparação de grupos ou como mediana (min-max) e teste de Mann-Whitney usados para comparar grupos (N = 5).

Figura 3. (A) Radiografia Digital Representativa (RxD) dos fêmures esquerdos de cada grupo, apresentada em escala de cores. (A') RxD foi representativa em tons de cinza para o fêmur de um animal no grupo Controle, e (A'') tons de cinza RxD representativos para o fêmur de um animal do grupo Urêmico. (B) densidade óssea calculada a partir da intensidade média dos tons de cinza (a.u.). Os dados são expressos como média ± DP em cada grupo e o teste-t de Student foi usado para comparar os dados em cada semana, **p* < 0,05.



de reabsorção óssea grave, indicativas de rarefação óssea. Áreas de redução na espessura do osso cortical e expansão do osso trabecular foram identificadas em torno de regiões de rarefação (Figura 3A). A análise da densidade óptica de todo o fêmur (Figura 3B) indicou DO significativamente menor no grupo Urêmico, com valores de DO de $0,57 \pm 0,08$ u.a., comparado a $0,73 \pm 0,10$ u.a. para o grupo Controle (*p* = 0,01) na semana 4 e $0,58 \pm 0,07$ u.a. v.s. $0,68 \pm 0,06$ u.a., respectivamente, na semana 7 (*p* = 0,016).

ASSOCIAÇÃO ENTRE DO E ASPECTOS DA HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NA SEMANA 7

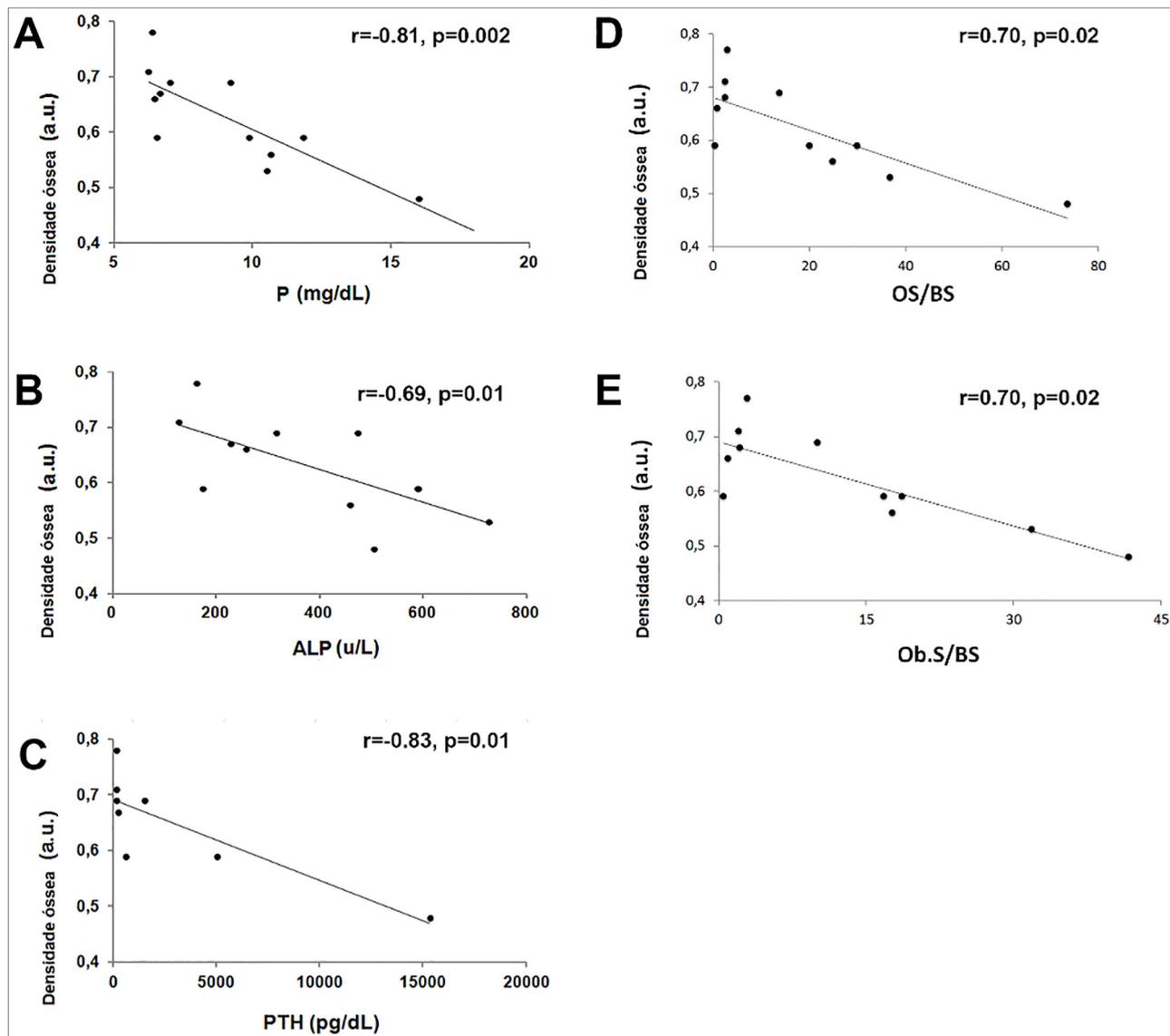
Os resultados da análise de correlação de Pearson e Spearman, avaliando a associação entre DO, medida

por RxD, e aspectos selecionados da histomorfometria óssea e parâmetros bioquímicos selecionados de DMO na DRC são mostrados na Figura 4. A análise revelou uma correlação inversa significativa entre DO e P ($r = -0,81$; *p* = 0,002) (Figura 4A), ALP ($r = -0,69$, *p* = 0,01) (Figura 4B), PTH ($r = -0,83$, *p* = 0,01) (Figura 4C), OS/BS ($r = -0,70$; *p* = 0,02) (Figura 4D) e Ob.S/BS ($r = -0,70$; *p* = 0,02) (Figura 4E).

DISCUSSÃO

A DRC induz mudanças significativas nos mecanismos de remodelação óssea, resultando em um desequilíbrio entre a formação óssea e sua reabsorção. As mudanças resultantes no conteúdo orgânico mineral do osso podem ser medidas por vários métodos^{5,18}. Até onde sabemos, o uso de RxD para análise de DO

Figura 4. Correlação de Pearson e Spearman entre densidade óssea medida por Radiografia Digital (RxD) e parâmetros bioquímicos na semana 7: (A) Correlação entre densidade óssea (DO) e fosfato sérico (P); (B) Correlação entre DO e fosfatase alcalina (ALP); e (C) Correlação entre DO e hormônio paratireóideo (PTH); (D) Correlação entre DO e Superfície Osteóide/Superfície Óssea (OS/BS); (E) Correlação entre DO e superfície osteoblástica/superfície óssea (Ob.S/BS).



em modelos experimentais urêmicos não foi previamente avaliada. Recentemente, a análise da DO em pacientes com DRC tem ganhado importância na prática clínica devido à sua associação com aumento do risco de fraturas e aumento da mortalidade geral e cardiovascular^{19,20}.

Nós adaptamos o modelo de adenina como descrito anteriormente²¹. Damment et al. modificaram o protocolo original de alimentação de animais com adenina a 0,75% por 4 semanas, adicionando uma fase de manutenção consistindo de uma dieta de adenina a 0,1% por 18 semanas²¹. Em nosso estudo, usamos as primeiras 4 semanas de alimentação com adenina a 0,75% e adicionamos 3 semanas de alimentação com 0,1% de adenina. Nosso protocolo de adenina

adaptado teve como objetivo prolongar o período de disfunção renal enquanto reduz a mortalidade²¹.

Em nosso modelo experimental, a taxa de filtração glomerular (TFG), estimada pelo CCr, foi reduzida em 75% dos valores normais no grupo Urêmico no final do experimento. Extrapolando nossos dados para a classificação da Doença Renal: KDIGO da DRC, podemos inferir que a redução da TFG em animais Urêmicos foi equivalente a pacientes com a categoria 4²².

A DMO é comum nessa categoria de DRC experimental²³. No entanto, os sinais DRC estão presentes precocemente no curso da DRC, com níveis séricos anormais de P, Ca, FGF-23, PTH e calcitriol, que precedem alterações identificáveis na DO²⁴. Essas

alterações precoces foram demonstradas por Pereira et al., que relataram aumento da produção de FGF-23 pelos osteócitos em pacientes com DRC de categoria 2²⁵. Na transição das categorias 2 para 3, a redução da TFG promove uma sobrecarga de P, que estimula a secreção de FGF-23 e aumenta a fosfatúria^{26,27}. À medida que a DRC progride, o aumento dos níveis de FGF-23 reduz os níveis de calcitriol e, consequentemente, aumenta os níveis de PTH na tentativa de manter a homeostase do P^{24,28}. As alterações bioquímicas, principalmente a hiperfosfatemia, são mais evidentes quando os pacientes evoluem para DRC na categoria 4²⁹.

Além da redução no CCr, nossos dados reproduziram a cinética dos indicadores bioquímicos precoces e tardios da DMO da DRC; os marcadores bioquímicos iniciais incluíram um aumento nos níveis de FeP e FGF-23, com elevação dos níveis de PTH e hiperfosfatemia como marcadores tardios. Em modelos experimentais, essas alterações bioquímicas e hiperfosfatemia, mais especificamente, têm sido correlacionadas a um aumento da prevalência de calcificação vascular, distúrbios ósseos e mortalidade³⁰⁻³². A ALP é outro marcador bioquímico da DRC que tradicionalmente tem sido associado à remodelação óssea e risco cardiovascular em pacientes urêmicos, também aumentada à medida que a função renal diminui^{33,34}.

Acreditamos que a ausência de elevação significativa do FGF 23 em nosso estudo se deveu à grande variação intragrupo de animais urêmicos na quarta semana. Além disso, observamos que os níveis séricos de cálcio aumentaram durante o início da DRC. Uma explicação potencial poderia ser a característica peculiar do modelo experimental. A adenina pode induzir elevação do cálcio sérico, como descrito em outros estudos, pois, além de induzir a DRC, atua diretamente nos osteoblastos, comprometendo sua capacidade de mineralização, induzindo uma doença óssea grave, com alta taxa de remodelamento³⁵⁻³⁷.

Anormalidades ósseas em modelos animais têm sido predominantemente associadas a níveis elevados de PTH^{36,38}. Em nosso modelo, os níveis de PTH aumentaram durante o experimento, mas os níveis foram estatisticamente diferentes do grupo Controle apenas nos primeiros momentos de medição. A ausência de diferenças entre grupos em momentos posteriores provavelmente reflete a grande variabilidade entre animais nos níveis de PTH na DRC³⁶.

Pacientes com DRC apresentam alta prevalência de fraturas quando comparados à população geral,

o que mostra que a disfunção renal aumenta o risco para essa condição^{19,20}. Após as diretrizes do KDIGO 2012, a avaliação da DO vem sendo cada vez mais incluída como componente da investigação clínica de pacientes com DRC, justificada pela importância do diagnóstico precoce de risco de fratura e pela necessidade de novos tratamentos para preservar a massa óssea nessa população⁹.

O risco de fratura óssea é definido como a capacidade de um osso de manter sua estrutura sob uma força aplicada. Essa capacidade está diretamente relacionada à DO, qualidade óssea e taxa de remodelação óssea³⁹. DO é a fração do osso que pode ser quantificada. Embora comumente avaliada pela DXA, a DO tem sido avaliada mais recentemente pela TCQ, que delimita os ossos cortical e trabecular^{5,40}. No entanto, técnicas rápidas e menos dispendiosas, como a RxD, também podem ser aplicadas para avaliar a massa óssea trabecular e as características mais gerais das alterações relacionadas à doença na DO. A RxD tem a vantagem de ser mais fácil de usar que o DXA, e o TCQ é mais viável para a avaliação básica¹³, sendo cada vez mais utilizada para fornecer medidas substitutas de DO em pequenos animais^{10,11,13,41,42}. A imagem da RxD foi relatada como comparável a outras técnicas de imagem (DXA e TCQ), marcadores bioquímicos e padrões histológicos para diferenciar osso normal de osso em desenvolvimento^{10,13}, bem como para identificar os efeitos ósseos de várias condições, incluindo diabetes mellitus⁴², implantes de titânio⁴¹, perda óssea induzida por desuso¹¹ e osteoporose⁴³. Estudos sobre a avaliação óssea total na DMO em modelos experimentais de DRC não foram encontrados na literatura. Em nossos experimentos, menores valores de DO medidos por RxD foram encontrados em animais urêmicos em todos os momentos de medição, e mudanças na DO correlacionaram-se a mudanças nos marcadores bioquímicos de DMO caracterizados pela elevação de PTH, P e ALP e a alterações da histomorfometria óssea de uma doença óssea de alta taxa de renovação. Portanto, havia uma relação direta entre a redução da DO e a doença óssea de alta renovação encontrada na DRC⁴⁴. A ausência de correlação entre o volume trabecular e a DO pode ser explicada pelas características únicas do modelo da adenina. A adenina age diretamente sobre os osteoblastos, comprometendo a capacidade de mineralização das células, e induzindo uma relativa hipercalcemia e uma doença óssea de alta remodelação³⁵⁻³⁷. Em nosso estudo, encontramos uma superfície osteóide

umentada, evidenciando calcificação óssea comprometida; entretanto, também identificamos alta reabsorção óssea caracterizada pelo aumento da superfície dos osteoclastos. Portanto, na ausência de mineralização do tecido ósseo, a DO medida pela RxD é menor que a encontrada nos animais do grupo Controle.

As limitações do nosso estudo devem ser reconhecidas. Enquanto estudos prévios em roedores demonstraram uma boa correlação dos achados de RxD com os resultados de DXA e TCQ, bem como com marcadores séricos de doença óssea, a inclusão de outra técnica de imagem para comparação teria fortalecido os achados de nosso estudo¹⁰.

CONCLUSÃO

Em conclusão, a RxD foi capaz de detectar a redução de DO em fêmures de ratos urêmicos, e os resultados foram associados a marcadores de doença óssea de alta remodelação associada à DRC. Assim, a RxD é uma ferramenta útil no estudo da DO em modelos animais de DRC.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu apoio da Rede Mineira de Bioterismo e da Rede Mineira de Ensaios Toxicológicos e Farmacológicos. Bárbara Bruna Abreu de Castro recebeu apoio da Fundação de Amparo a Pesquisas e Pesquisas em Nefrologia (CAPEP) e pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Helady Sanders-Pinheiro projetou o estudo e preparou o primeiro rascunho do artigo. Ela é fiadora. Bárbara Bruna Abreu de Castro elaborou o estudo, preparou o primeiro rascunho do trabalho e realizou o trabalho experimental e a análise estatística dos dados. Wander Barros do Carmo desenhou o estudo, fez o trabalho experimental e a análise estatística dos dados. Jasmin, Roberto Sotto-Maior Fortes Oliveira, Vera Maria Peters, Vanda Jorgetti e Melani Ribeiro Custodio contribuíram para o trabalho experimental. Todos os autores revisaram o artigo criticamente em termos do seu conteúdo intelectual e aprovaram a versão final. Todos os autores concordam em ser responsáveis pelo trabalho e garantir que quaisquer questões relacionadas à precisão e integridade do trabalho sejam investigadas e devidamente resolvidas.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não ter conflito de interesse relacionado à publicação deste manuscrito.

REFERÊNCIAS

- Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:S131-9.
- Popp AW, Meer S, Krieg MA, Perrelet R, Hans D, Lippuner K. Bone mineral density (BMD) and vertebral trabecular bone score (TBS) for the identification of elderly women at high risk for fracture: the SEMOF cohort study. *Eur Spine J* 2016;25:3432-8.
- Fitzpatrick LA. Secondary causes of osteoporosis. *Mayo Clin Proc* 2002;77:453-68.
- Ibáñez R. Bone mineral density measurement techniques. *An Sist Sanit Navar* 2003;26:19-27.
- Moorthi RN, Moe SM. Recent advances in the noninvasive diagnosis of renal osteodystrophy. *Kidney Int* 2013;84:886-94.
- Bouxsein M. New advances in non-invasive evaluation bone resistance. *Am Soc Bone Miner Res* 2005;1:1-5.
- Silva BC, Walker MD, Abraham A, Boutroy S, Zhang C, McMahon DJ, et al. Trabecular bone score is associated with volumetric bone density and microarchitecture as assessed by central QCT and HRpQCT in Chinese American and white women. *J Clin Densitom* 2013;16:554-61.
- Ramalho J, Marques IDB, Hans D, Dempster D, Zhou H, Patel P, et al. The trabecular bone score: Relationships with trabecular and cortical microarchitecture measured by HR-pQCT and histomorphometry in patients with chronic kidney disease. *Bone* 2018;116:215-20.
- West SL, Lok CE, Langsetmo L, Cheung AM, Szabo E, Pearce D, et al. Bone mineral density predicts fractures in chronic kidney disease. *J Bone Miner Res* 2015;30:913-9.
- Bagi CM, Berryman E, Moalli MR. Comparative bone anatomy of commonly used laboratory animals: implications for drug discovery. *Comp Med* 2011;61:76-85.
- Mabilleau G, Mieczkowska A, Libouban H, Simon Y, Audran M, Chappard D. Comparison between quantitative X-ray imaging, dual energy X-ray absorptiometry and microCT in the assessment of bone mineral density in disuse-induced bone loss. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2015;15:42-52.
- Syriopoulos K, Sanderink GC, Velders XL, van der Stelt PF. Radiographic detection of approximal caries: comparison of dental films and digital imaging systems. *Dentomaxillofac Radiol* 2000;29:312-8.
- Jimenez-Mendoza D, Espinosa-Arbelaes DG, Giraldo-Betancur AL, Hernandez-Urbiola MI, Vargas-Vazquez D, Rodriguez-Garcia ME. Single x-ray transmission system for bone mineral density determination. *Rev Sci Instrum* 2011;82:125105.
- Gouveia CH, Jorgetti V, Bianco AC. Effects of thyroid hormone administration and estrogen deficiency on bone mass of female rats. *J Bone Miner Res* 1997;12:2098-107. DOI: 10.1359/jbmr.1997.12.12.2098
- Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al.; Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2006;69:1945-53. DOI: 10.1038/sj.ki.5000414
- Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Maluche H, et al. Standardized symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2013;28:2-17. DOI: 10.1002/jbmr.1805
- Jasmin, Jelicks LA, Tanowitz HB, Peters VM, Mendez-Otero R, de Carvalho ACC, et al. Molecular imaging, biodistribution and efficacy of mesenchymal bone marrow cell therapy in a mouse model of Chagas disease. *Microbes Infect* 2014;16:923-35.

18. Malluche HH, Davenport DL, Cantor T, Monier-Faugere MC. Bone mineral density and serum biochemical predictors of bone loss in patients with CKD on dialysis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2014;9:1254-62.
19. Nickolas TL, Leonard MB, Shane E. Chronic kidney disease and bone fracture: a growing concern. *Kidney Int* 2008;74:721-31.
20. Hirukawa T, Kakuta T, Nakamura M, Fukagawa M. Mineral and bone disorders in kidney transplant recipients: reversible, irreversible, and de novo abnormalities. *Clin Exp Nephrol* 2015;19:543-55.
21. Dammert SJ. Pharmacology of the phosphate binder, lanthanum carbonate. *Ren Fail* 2011;33:217-24.
22. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Chronic Kidney Disease Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2013;3:1-150.
23. Moe SM, Radcliffe JS, White KE, Gattone VH 2nd, Seifert MF, Chen X, et al. The pathophysiology of early-stage chronic kidney disease-mineral bone disorder (CKD-MBD) and response to phosphate binders in the rat. *J Bone Miner Res* 2011;26:2672-81.
24. Isakova T, Wahl P, Vargas GS, Gutiérrez OM, Scialla J, Xie H, et al. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2011;79:1370-8.
25. Pereira RC, Juppner H, Azucena-Serrano CE, Yadin O, Salusky IB, Wesseling-Perry K. Patterns of FGF-23, DMP1 and MEPE expression in patients with chronic kidney disease. *Bone* 2009;45:1161-8.
26. Berndt T, Kumar R. Novel mechanisms in the regulation of phosphorus homeostasis. *Physiology (Bethesda)* 2009;24:17-25.
27. Gutierrez O, Isakova T, Rhee E, Shah A, Holmes J, Collerone G, et al. Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2205-15.
28. Hamdy NA, Kanis JA, Beneton MN, Brown CB, Juttman JR, Jordans JG, et al. Effect of alfacalcidol on natural course of renal bone disease in mild to moderate renal failure. *BMJ* 1995;310:358-63.
29. Levin A, Bakris GL, Molitch M, Smulders M, Tian J, Williams LA, et al. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int* 2007;71:31-8.
30. Lau WL, Linnes M, Chu EY, Foster BL, Bartley BA, Somerman MJ, et al. High phosphate feeding promotes mineral and bone abnormalities in mice with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28:62-9.
31. El-Abbadi MM, Pai AS, Leaf EM, Yang HY, Bartley BA, Quan KK, et al. Phosphate feeding induces arterial medial calcification in uremic mice: role of serum phosphorus, fibroblast growth factor-23, and osteopontin. *Kidney Int* 2009;75:1297-307.
32. Finch JL, Lee DH, Liapis H, Ritter C, Zhang S, Suarez E, et al. Phosphate restriction significantly reduces mortality in uremic rats with established vascular calcification. *Kidney Int* 2013;84:1145-53.
33. Kalantar-Zadeh K, Shah A, Duong U, Hechter RC, Dukkipati R, Kovesdy CP. Kidney bone disease and mortality in CKD: revisiting the role of vitamin D, calcimimetics, alkaline phosphatase, and minerals. *Kidney Int Suppl* 2010;117:10-21.
34. Taliercio JJ, Schold JD, Simon JF, Arrigain S, Tang A, Saab G, et al. Prognostic importance of serum alkaline phosphatase in CKD stages 3-4 in a clinical population. *Am J Kidney Dis* 2013;62:703-10.
35. Orriss IR, Burnstock G, Arnett TR. Purinergic signalling and bone remodelling. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10:322-30.
36. Ferrari GO, Ferreira JC, Cavallari RT, Neves KR, dos Reis LM, Dominguez WV, et al. Mineral bone disorder in chronic kidney disease: head-to-head comparison of the 5/6 nephrectomy and adenine models. *BMC Nephrol* 2014;15:69.
37. Yaguchi A, Tatemichi S, Takeda H, Kobayashi M. PA21, a novel phosphate binder, improves renal osteodystrophy in rats with chronic renal failure. *PLoS One* 2017;12:e0180430.
38. Meng Y, Zhang H, Li Y, Li Q, Zuo L. Effects of unfractionated heparin on renal osteodystrophy and vascular calcification in chronic kidney disease rats. *Bone* 2014;58:168-76.
39. Felsenberg D, Boonen S. The bone quality framework: determinants of bone strength and their interrelationships, and implications for osteoporosis management. *Clin Ther* 2005;27:1-11.
40. Hind K, Oldroyd B, Truscott JG. In vivo precision of the GE Lunar iDXA densitometer for the measurement of total-body, lumbar spine, and femoral bone mineral density in adults. *J Clin Densitom* 2010;13:413-7.
41. Sakakura CE, Neto RS, Bellucci M, Wenzel A, Scaf G, Marcantonio E Jr. Influence of homeopathic treatment with comfrey on bone density around titanium implants: a digital subtraction radiography study in rats. *Clin Oral Implants Res* 2008;19:624-8.
42. de Morais JA, Trindade-Suedam IK, Pepato MT, Marcantonio E Jr, Wenzel A, Scaf G. Effect of diabetes mellitus and insulin therapy on bone density around osseointegrated dental implants: a digital subtraction radiography study in rats. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:796-801.
43. Beier EE, Maher JR, Sheu TJ, Cory-Slechta DA, Berger AJ, Zusick MJ, et al. Heavy metal lead exposure, osteoporotic-like phenotype in an animal model, and depression of Wnt signaling. *Environ Health Perspect* 2013;121:97-104.
44. Rix M, Andreassen H, Eskildsen P, Langdahl B, Olgaard K. Bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in patients with predialysis chronic renal failure. *Kidney Int* 1999;56:1084-93.