

## Associação entre indoxil sulfato e histomorfometria óssea em pacientes renais crônicos pré-diálise

### Authors

Fellype Carvalho Barreto<sup>1,4</sup>  
 Daniela Veit Barreto<sup>1,4</sup>  
 Maria Eugênia Fernandes Canziani<sup>2</sup>  
 Cristianne Tomiyama<sup>2</sup>  
 Andrea Higa<sup>2</sup>  
 Anaís Mozar<sup>1</sup>  
 Griet Glorieux<sup>3</sup>  
 Raymond Vanholder<sup>3</sup>  
 Ziad Massy<sup>1</sup>  
 Aluizio Barbosa de Carvalho<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Jules Verne University of Picardy.

<sup>2</sup> Universidade Federal de São Paulo.

<sup>3</sup> University Hospital Gent.

<sup>4</sup> Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Submitted on: 10/09/2013.

Approved on: 01/06/2014.

### Correspondence to:

Fellype de Carvalho Barreto.  
 Pontifícia Universidade Católica do Paraná.  
 Rua Imaculada Conceição,  
 nº 1155, Bloco CCBS, Prado Velho,  
 Curitiba, PR, Brasil. CEP: 80.215-901  
 E-mail: fellype\_barreto@hotmail.com  
 Tel: +55 (41) 3271-2285.  
 Fax: +55 (41) 3271-1657.

DOI: 10.5935/0101-2800.20140042

### RESUMO

**Introdução:** Estudos experimentais indicam que o indoxil sulfato (IS), uma toxina urêmica ligada à proteína, pode estar envolvido no desenvolvimento da osteodistrofia renal. **Objetivo:** Avaliar a associação entre os níveis séricos de IS e parâmetros bioquímicos do metabolismo mineral e da histomorfometria óssea em uma coorte de pacientes com doença renal crônica (DRC) pré-diálise. **Métodos:** Análise post-hoc de um estudo que avaliou a associação entre calcificação coronariana e histomorfometria óssea em 49 pacientes (idade:  $52 \pm 10$  anos; 67% sexo masculino; taxa de filtração glomerular estimada:  $36 \pm 17$  ml/min). Os níveis séricos de IS foram dosados. **Resultados:** Pacientes com DRC estágio 2 e 3 apresentaram uma taxa de formação óssea baixa. Pacientes com DRC estágio 4 e 5 apresentaram volume osteoide, superfícies osteoblástica e osteoclástica, volume de fibrose e taxa de formação óssea significativamente maiores e intervalo de mineralização significativamente menor que os pacientes com DRC estágio 2 e 3. Os níveis séricos de IS associaram-se positivamente com a taxa de formação óssea, volume osteoide, superfície osteoblástica e volume de fibrose. A análise de regressão multivariada identificou que o IS é um fator independente determinante da superfície osteoblástica e fibrose. Uma tendência similar foi observada para a taxa de formação óssea. **Conclusão:** Nosso estudo sugere que, na DRC pré-dialítica, o IS correlaciona-se positivamente com a formação óssea.

**Palavras-chave:** indoxil sulfato; insuficiência renal crônica; osteodistrofia renal; uremia.

### INTRODUÇÃO

Distúrbios dos metabolismos ósseo e mineral são comuns na doença renal crônica (DRC) e estão associados a um aumento da morbidade e redução da qualidade de vida dos pacientes.<sup>1,2</sup> As várias alterações patológicas ósseas encontradas em pacientes com DRC são referidas coletivamente como osteodistrofia renal (ODR) e incluem alterações na histologia óssea, que podem ser quantificadas pela avaliação histomorfométrica de biópsias ósseas.

Sabe-se que a ODR começa muito cedo no curso da DRC.<sup>3,4</sup> Muitos fatores têm sido considerados na fisiopatologia desta condição, incluindo cálcio, fosfato, hormônio da paratireoide (PTH), vitamina D e seus análogos, fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23) e, mais recentemente, esclerostina.<sup>5</sup> Vários outros solutos quantificáveis importantes que têm efeitos biológicos negativos e são retidos no corpo à medida que a condição urêmica progride - as chamadas toxinas urêmicas - têm também sido implicados.

O sulfato de indoxil (SI) é uma toxina urêmica ligada à proteína derivada do metabolismo do triptofano presente na dieta. Resumidamente, o triptofano é metabolizado em Indol por bactérias intestinais e, após a absorção intestinal, é ainda convertido em SI no fígado. É excretado pelos rins através de secreção tubular proximal. Consequentemente, o SI se acumula no sangue de pacientes com insuficiência renal. Além disso, a alta afinidade

de ligação do SI para com a albumina significa que ele não pode ser removido eficientemente pela hemodiálise convencional.<sup>6</sup> O papel do SI como toxina urêmica foi revelado pela primeira vez pelos seus efeitos de aceleração da progressão da DRC,<sup>7</sup> possivelmente através de uma redução na viabilidade das células tubulares proximais devido ao aumento do estresse oxidativo.<sup>8</sup> Posteriormente, Iwazaki e colaboradores<sup>9</sup> usaram um modelo de rato com insuficiência renal associada a baixo volume de remodelação óssea para mostrar que o acúmulo de SI foi relacionado à menor taxa de formação óssea e à redução na regulação de genes relacionados a osteoblastos. Esta condição foi melhorada pelo tratamento com o adsorvente oral AST-120 (provavelmente reduzindo os níveis de SI). Posteriormente, o mesmo grupo mostrou que o SI reduz a produção de AMPc induzida pelo PTH, a expressão gênica do receptor de PTH (PTH1R) e a viabilidade celular em culturas de osteoblastos primários.<sup>10</sup> Mais recentemente, Mozar e colaboradores<sup>11</sup> demonstraram que o SI inibe a diferenciação e função dos osteoclastos. Na clínica, Goto e colaboradores<sup>12</sup> relataram uma associação negativa entre SI e marcadores sorológicos de remodelação óssea independente dos níveis de PTH, em uma coorte de 47 pacientes em hemodiálise. Estas observações levaram à hipótese de que o acúmulo de SI está envolvido no desenvolvimento de osteodistrofia renal. Até o momento, nenhum estudo avaliado por histomorfometria óssea foi realizado para analisar esta hipótese.

O presente estudo procurou avaliar a associação entre o sulfato de indoxil (SI) circulante - uma toxina urêmica ligada à proteína, e parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo mineral [tais como cálcio, fosfato, fosfatase alcalina óssea específica, PTH intacto, FGF-23, o 25(OH); a vitamina D<sub>3</sub> (25D), a vitamina D<sub>3</sub> 1,25 (OH)<sub>2</sub> e a vitamina D<sub>3</sub> (1,25 D)] e parâmetros histomorfométricos em uma coorte de pacientes com DRC pré-diálise sem tratamento prévio.

## MATERIAL E MÉTODOS

### INDIVÍDUOS E TIPO DO ESTUDO

Esta é uma análise post-hoc de um estudo transversal que avaliou a associação entre a calcificação da artéria coronária e os parâmetros histomorfométricos em uma coorte de pacientes ambulatoriais com DRC em pré-diálise, de uma clínica de nefrologia em São Paulo, Brasil.<sup>13</sup> Os pacientes tinham 18 anos de idade ou mais, com valores de clearance de creatinina de 24 horas entre 15 e 90 ml/min/m<sup>2</sup>. Todos haviam sido acompanhados por um nefrologista por pelo menos 3 meses e não receberam quaisquer aglutinantes de fosfato, análogos da vitamina D ou corticosteróides. Os

pacientes incluídos foram submetidos a exames clínicos e físicos. Não havia evidência de doença inflamatória, neoplásica ou infecciosa em qualquer dos indivíduos. Peso e altura foram utilizados para calcular o índice de massa corporal (IMC). Todos os pacientes foram submetidos a exames laboratoriais e biópsia óssea no prazo de 30 dias após a seleção da amostra.

Todos os pacientes forneceram consentimento informado por escrito. O protocolo do estudo foi revisado e aprovado pelo Conselho de Revisão Institucional local e foi realizado de acordo com os princípios éticos da Declaração de Helsinque.

### EXAMES LABORATORIAIS

As amostras de sangue sob jejum foram analisadas para creatinina, cálcio ionizado, fósforo, fosfatase alcalina (valores de referência: < 270 U/L para os homens e < 240 U/L para as mulheres), fosfatase alcalina óssea específica (ensaio imunoenzimático da Metra Biosystems Inc, Mountain View, CA, EUA; intervalo de referência: 11,6-42,7 U/L para os homens e 15-41,3 U/L para as mulheres), PTH intacto (PTH<sub>i</sub>; Immulite Assay, DPC, Los Angeles, CA, EUA; intervalo de referência: 10 a 65 pg/ml), FGF-23 (ELISA da Kainos Laboratories, Tóquio, Japão; intervalo de referência: 28,9 ± 1,1 pg/ml), 1,25 D (radioimunoensaio, contador Gamma, Perkin Elmer, Brasil, intervalo de referência: 15,9 a 55,6 pg/ml) e 25D (radioimunoensaio, DiaSorin®, Stillwater, MN, EUA; intervalo de referência: 18 a 62 ng/dL). Para a determinação de níveis séricos totais de SI as amostras foram desproteinizadas por desnaturação térmica e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência de fase inversa. As concentrações foram determinadas por detecção de fluorescência (excitação a 280 nm e emissão a 340 nm para SI).<sup>14</sup> O mesmo método foi utilizado para determinações de SI livre; entretanto, as amostras de soro foram ultrafiltradas por uma Centrifree (Millipore) antes da desproteíntização. Os valores de referência para SI total e livre em nossos indivíduos saudáveis de controle (n = 20) foram 0,090 ± 0,034 mg/dL e 0,016 ± 0,004 mg/dL, respectivamente.

Para estimar a verdadeira TFG com a maior precisão possível a partir dos níveis de creatinina sérica, aplicamos a equação “CKD-EPI” - recém-publicada.<sup>6</sup> Para fins descritivos, os pacientes foram classificados em estágios de DRC de acordo com as diretrizes K/DOQI da Fundação Nacional do Rim.<sup>15</sup> Como tínhamos poucos pacientes com DRC nos estágios 2 e 5, a população do estudo foi separada em dois grupos (DRC estágios 2-3 e estágios 4-5) para fins descritivos e analíticos.

## BIÓPSIA ÓSSEA

As amostras ósseas foram retiradas da crista íliaca após marcação dupla com tetraciclina. Fragmentos de ossos foram submetidos ao processamento histológico padrão.<sup>8</sup> A análise histomorfométrica óssea semiautomática foi conduzida utilizando o software Osteomeasure (Osteometrics Inc, Atlanta, GA), como descrito anteriormente.<sup>13</sup> Os parâmetros histomorfométricos analisados foram aqueles propostos pelo Comitê de Nomenclatura da Sociedade Americana de Histomorfometria de Pesquisa Mineral e Óssea.<sup>16</sup> Os valores de referência utilizados para os parâmetros estáticos foram obtidos a partir de controles locais,<sup>17</sup> ao passo que os parâmetros dinâmicos seguiram aqueles descritos por outros.<sup>18</sup>

Parâmetros histomorfométricos selecionados para a remodelação óssea [taxa de formação óssea/superfície óssea (BFR/BS)]; mineralização [tempo de retardo da mineralização (MLT)] e volume [volume ósseo trabecular (BV/TV)], bem como a superfície de osteoblastos/superfície óssea (Ob.S/BS); volume de osteóide/volume ósseo (OV/BV); a superfície de osteoclastos/superfície óssea (Oc.S/BS); erosão da superfície/superfície óssea (ES/BS) e volume de fibrose (Fb.V), foram descritos de acordo com as diretrizes publicadas na classificação ROD.<sup>1</sup>

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são expressos como média  $\pm$  DP, mediana e amplitude ou frequência. Para os parâmetros que apresentam uma distribuição não-gaussiana, os valores foram normalizados para log antes de serem utilizados em testes que exigem variáveis normalmente distribuídas. Comparações intergrupos foram realizadas utilizando um teste  $\chi^2$  para variáveis categóricas e teste-*t* de Student ou o teste de Mann-Whitney para variáveis contínuas. Modelos de regressão linear univariada foram utilizados para verificar as associações entre níveis séricos totais de SI e marcadores do metabolismo mineral, bem como parâmetros histomorfométricos ósseos. As variáveis selecionadas na análise univariada foram usadas em modelos de regressão linear multivariada para verificar a independência das associações identificadas. Um valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software de estatística PASW®, versão 18.0.

Os autores tiveram acesso total aos dados e assumem total responsabilidade por sua integridade. Todos os autores leram e aceitaram o manuscrito como está escrito.

## RESULTADOS

Os pacientes eram predominantemente do sexo masculino (67%) e da raça branca (49%), com 40% apresentando *diabetes mellitus* como comorbidade. A média  $\pm$  DP da idade foi de  $52 \pm 10$  anos, e o tempo médio desde o diagnóstico da DRC foi de 30 meses (variando de 15 a 83 meses). Nefrosclerose hipertensiva foi a etiologia mais frequente de DRC (39%), seguida de nefropatia diabética (31%). A TFG média estimada na coorte do estudo foi de  $36 \pm 17$  ml/min (10% na DRC estágio 2; 49% na DRC estágio 3; 35% na DRC estágio 4 e 6% em DRC estágio 5, de acordo com as diretrizes K/DOQI da Fundação Nacional do Rim (*National Kidney Foundation*)).<sup>19</sup> Os valores médios de albumina e hemoglobina ( $4,3 \pm 0,4$  g/dl e  $13 \pm 2$  g/dL, respectivamente) estavam dentro dos valores de referência normais. É digno de nota que a maioria dos pacientes (60%) tinha níveis suficientes de 25D (ou seja,  $25D \geq 30$  ng/ml) e apenas 10% dos pacientes estudados apresentaram deficiência de vitamina D (definido como  $25D \leq 15$  ng/ml).<sup>20</sup>

A Tabela 1 apresenta informações sobre as características bioquímicas e hormonais, por estágio da DRC. Os níveis séricos de fosfato, iPTH, FGF-23, fosfatase alcalina óssea específica, assim como SI total e livre estavam significativamente elevados em pacientes com DRC estágios 4 e 5, em comparação com aqueles com DRC nos estágios 2 e 3. Além disso, os níveis séricos de bicarbonato, 25D e 1,25 D estavam mais baixos em pacientes com DRC nos estágios 4 e 5 do que naqueles com DRC nos estágios 2 e 3. Como esperado (Figura 1), houve uma significativa associação negativa entre o SI sérico total e a TFG. Curiosamente, os níveis séricos total e livre de SI já estavam elevados em pacientes com DRC nos estágios 2 e 3, quando comparados com 20 controles saudáveis (média  $\pm$  DP total de SI foi de  $0,165 \pm 0,079$  vs.  $0,090 \pm 0,034$  mg/dL,  $p = 0,001$ , e a média  $\pm$  DP de SI livre foi de  $0,030 \pm 0,006$  vs.  $0,016 \pm 0,004$  mg/dL,  $p < 0,001$ , respectivamente). Vale ressaltar que não houve diferenças entre os subgrupos de estágios da DRC em termos de idade, gênero, raça, IMC, diabetes ou o tempo decorrido desde o diagnóstico da DRC (dados não exibidos).

A Tabela 2 mostra os parâmetros histomorfométricos ósseos selecionados por estágio da DRC. Pacientes com DRC estágios 2 e 3 apresentaram notavelmente baixa taxa de formação óssea. Em comparação com estes, os pacientes com DRC nos estágios 4 e 5 apresentaram significativamente maior volume de osteóide, superfície de osteoblastos,

superfície de osteoclastos, volume de fibrose e taxa de formação óssea, e mostrou uma tendência de menor tempo de retardo na mineralização. Não houve diferença entre os grupos em termos de volume de osso trabecular. É importante ressaltar que nenhum dos membros da coorte teve coloração positiva para o alumínio na superfície óssea. Análise por regressão univariada confirmou associações lineares significativamente negativas entre a taxa estimada de filtração glomerular, por um lado, e o volume de osteoide ( $r^2 = 0,17$ ,  $p = 0,004$ ), a superfície de osteoblastos ( $r^2 = 0,26$ ,  $p < 0,001$ ), o volume de fibrose ( $r^2 = 0,10$ ,  $p = 0,03$ ) e taxa de formação óssea ( $r^2 = 0,21$ ,  $p < 0,001$ ) por outro, bem como uma associação positiva entre a TFGe e o tempo de retardo na mineralização ( $r^2 = 0,09$ ,  $p = 0,03$ ).

As associações entre os níveis séricos totais de SI e os parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo mineral são apresentados na Tabela 3. Também percebemos uma associação positiva linear com fosfato, FGF-23 e níveis de iPTH e uma associação negativa com os níveis de 1,25 D.

Quanto aos parâmetros histomorfométricos, o SI esteve positivamente associado à taxa de formação óssea, volume osteoide, à superfície de osteoblastos e ao volume da fibrose (Tabela 4). Associações similares foram observadas entre níveis de iPTH e os mesmos parâmetros histomorfométricos. Modelos de regressão multivariada (Tabela 5), revelaram que as associações positivas entre níveis séricos de SI por um lado, e a superfície de osteoblastos e volume de fibrose óssea do outro não dependeram das características demográficas da coorte e dos parâmetros bioquímicos relacionados ao metabolismo mineral, tais como iPTH, FGF-23, 25D e bicarbonato.

Observamos tendência semelhante com relação à taxa de formação óssea.

## DISCUSSÃO

O presente estudo sugere que, em condições de “vida real” os níveis de SI estão positivamente associados à taxa de formação óssea. Esta observação parece contradizer estudos *in vitro* e em animais, que relataram um efeito inibitório da SI na formação óssea, na expressão de genes relacionados a osteoblastos e também na viabilidade celular de osteoblastos e osteoclastos.<sup>9-11,21</sup> No entanto, estudos com animais sobre esse assunto foram realizados em ratos urêmicos tireo-paratireoidectomizados em que as concentrações plasmáticas fisiológicas de PTH foram restauradas por infusão.<sup>9,21</sup> A incapacidade de desenvolver hiperparatireoidismo secundário representa uma limitação deste modelo. Embora válidos como dados experimentais controlados, as observações relatadas podem não ser reprodutíveis sob condições clínicas reais, onde a função renal prejudicada é mais frequentemente associada a aumentos supranormais na secreção de PTH.<sup>22</sup>

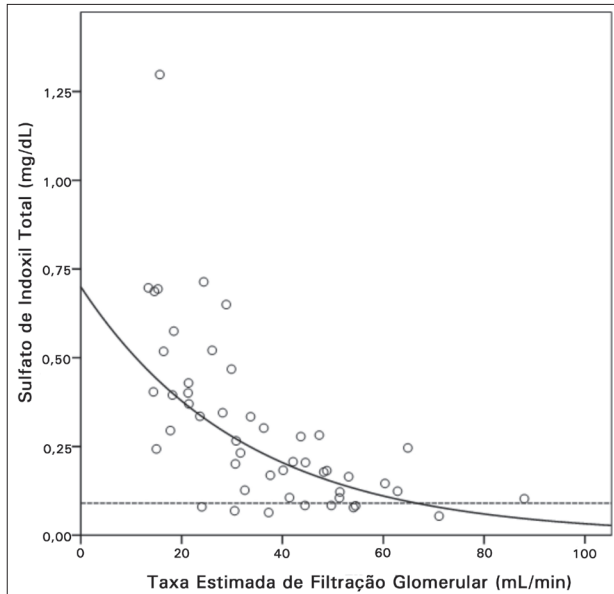
Outro ponto importante desse estudo é que confirmamos estudos anteriores que sugeriram que a baixa taxa de remodelação óssea pode caracterizar ODR no início da DRC.<sup>23</sup> Como sugerido por observações em um modelo murino de DRC sem hiperparatireoidismo secundário<sup>23</sup> e em uma série de estudos clínicos,<sup>4,24,25</sup> o discreto aumento nos níveis de PTH em DRC de estágio inicial pode não ser suficiente para contrabalançar alguns fatores supressivos já presentes no anabolismo

**TABELA 1** CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E HORMONAIAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO, POR ESTÁGIO DA DRC

	Estágio da DRC		p
	2 e 3 n = 29	4 e 5 n = 20	
Bicarbonato (mM)	24,6 ± 2,9	22,6 ± 2,9	0,03
Cálcio ionizado (mM)	1,31 ± 0,04	1,28 ± 0,07	0,1
Fosfato (mg/dL)	3,5 ± 0,6	4,3 ± 0,6	< 0,001
PTH intacto (pg/ml)	75 (41-99)	195 (99-366)	< 0,001
Fosfatase alcalina total (U/L)	113 (69-163)	118 (76-167)	0,6
bAP (U/L)	23 (17-28)	31 (21-46)	0,007
FGF-23 (pg/ml)	45,8 ± 30,1	95,8 ± 69,5	0,001
25 (OH) vitamina D (pg/ml)	33 ± 9	28 ± 10	0,05
1,25 (OH) <sup>2</sup> vitamina D (ng/dL)	38 (33-49)	33 (25-39)	0,02
Sulfato de indoxil total (mg/dL)	0,16 (0,09-0,22)	0,44 (0,35-0,68)	< 0,001
Sulfato de indoxil livre (mg/dL)	0,028 (0,025-0,032)	0,041 (0,035-0,050)	0,003

Dados listados como média ± DP ou, para variáveis com distribuição não-Gaussiana, mediana (percentil 25<sup>o</sup>-75<sup>o</sup>). bAP: fosfatase alcalina óssea específica; FGF: Fator de crescimento de fibroblastos; PTH: Hormônio paratireoideico.

**Figura 1.** Associação exponencial entre os níveis séricos totais de SI e a taxa estimada de filtração glomerular;  $r^2 = 0,47$ ,  $p < 0,001$ ,  $n = 49$ . A linha tracejada indica o valor de referência em 20 indivíduos saudáveis do grupo controle.



ósseo (tais como deficiência de hormônio gonadal, diabetes e diminuição do calcitriol).<sup>23,26</sup> É importante notar que nenhum dos pacientes incluídos no estudo já haviam sido tratados com análogos da vitamina D, cálcio ou aglutinantes de fosfato à base de alumínio ou drogas associadas a baixo volume de remodelação óssea. Assim, em contraste com relatórios anteriores sobre pacientes em hemodiálise, possíveis efeitos iatrogênicos dessas drogas não podem ser implicados na menor taxa de remodelação óssea observada neste estudo.

Uma explicação para o aparente conflito entre a nossa presente observação clínica e o trabalho pré-clínico relatado na literatura refere-se ao fato de que níveis mais altos de SI podem afetar a secreção de PTH por participação na resistência óssea ao PTH ou diminuindo a síntese/ação do calcitriol. O hiperparatireoidismo, comumente presente no estado urêmico, então substituiria clinicamente a ação inibitória local do SI sobre a remodelação óssea. Há pelo menos dois grandes argumentos a favor dessa hipótese.

**TABELA 2** PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS ÓSSEOS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO, POR ESTÁGIO DA DRC

	Estágio da DRC			Valores de referência
	2 e 3 n = 29	4 e 5 n = 20	p	
BV/TV (%)	17,02 ± 5,46	17,50 ± 5,67	0,9	20,95 ± 5,94
OV/BV (%)	0,95 (0,27-2,32)	2,31 (1,41-4,60)	0,003	2,18 ± 2,98
Ob.S/BS (%)	0,66 (0,16-1,34)	2,22 (1,05-4,35)	0,001	1,26 ± 2,44
ES/BS (%)	7,29 ± 6,72	8,72 ± 6,09	0,4	1,51 ± 1,27
Oc.S/BS (%)	0,22 (0,05-0,87)	0,70 (0,31-1,62)	0,015	0,01 ± 0,03
Fb.V (%)	0,6 (0-2)	1,5 (0,7-9,7)	0,02	< 0,5
BFR/BS (µm <sup>3</sup> /µm <sup>2</sup> /d)	0,001 (0,001-0,020)	0,010 (0,008-0,037)	0,004	0,04 ± 0,002
Mlt (d)	151 (34-655)	78 (31-181)	0,06	19 ± 7

Os dados estão listados como média ± DP (para variáveis com distribuição não-Gaussiana) ou mediana (percentil 25-75). BV/TV: Volume de osso trabecular/volume tecidual; OV/BV: Volume de osteóide/volume de osso trabecular; Ob.S/BS: Superfície de osteoblasto/superfície óssea; ES/BS: Superfície erodida/superfície óssea; Oc.S/BS: Superfície de osteoclasto/superfície óssea; Fb.V: Volume de fibrose óssea; BFR/BS: Taxa de formação óssea/superfície óssea; Mlt: Tempo de retardo da mineralização.

**TABELA 3** ASSOCIAÇÕES LINEARES UNIVARIADAS ENTRE OS NÍVEIS SÉRICOS TOTAIS DE SI E PARÂMETROS DO METABOLISMO MINERAL

	R <sup>2</sup>	β (95% CI)	p
Bicarbonato	0,13	-0,03 (-0,05- -0,007)	0,01
Cálcio ionizado	0,07	-1,1 (-2,2- -0,1)	0,1
Fosfato	0,22	0,16 (0,07-0,25)	0,001
PTH intacto	0,27	0,15 (0,08-0,23)	< 0,001
Fosfatase alcalina total	0,002	0,40 (-0,15-0,10)	0,7
Fosfatase alcalina óssea específica	0,25	0,15 (-0,02-0,32)	0,1
FGF-23	0,25	0,002 (0,001-0,003)	< 0,001
25 (OH) vitamina D	0,03	-0,004 (-0,01-0,003)	0,2
1,25 (OH) <sub>2</sub> vitamina D	0,16	-0,26 (-0,43- -0,10)	0,004

CI: Intervalo de confiança; FGF: Fator de crescimento de fibroblastos; PTH: Hormônio da paratireóide.



**TABELA 4** ASSOCIAÇÕES LINEARES UNIVARIADAS ENTRE PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS ÓSSEOS POR UM LADO E NÍVEIS DE SI SÉRICO TOTAL E PTH INTACTO DO OUTRO LADO

	Sulfato de Indoxil			PTH intacto		
	R <sup>2</sup>	β (95% CI)	p	R <sup>2</sup>	β (95% CI)	p
BV/TV	0,002	-0,002 (-0,01-0,01)	0,8	0,001	0,004 (-0,04-0,05)	0,8
OV/BV	0,15	0,07 (0,02-0,12)	0,006	0,33	0,34 (0,20-0,49)	< 0,001
Ob.S/BS	0,26	0,11 (0,05-0,17)	< 0,001	0,18	0,30 (0,10-0,50)	0,004
ES/BS	0,03	0,006 (-0,004-0,02)	0,2	0,03	0,02 (-0,16-0,06)	0,3
Oc.S/BS	0,04	0,04 (-0,02-0,10)	0,2	0,12	0,23 (0,04-0,42)	0,02
Fb.V	0,31	1,31 (0,73-1,90)	< 0,001	0,19	3,5 (1,3-5,6)	0,002
BFR/BS	0,16	0,06 (0,02-0,10)	0,004	0,14	0,19 (0,06-0,33)	0,007
Mlt	0,04	-0,04 (-0,09-0,02)	0,2	< 0,001	-0,006 (-0,19-0,18)	0,9

CI: Intervalo de confiança; as outras abreviações estão listadas junto à Tabela 2.

**TABELA 5** MODELOS DE REGRESSÃO LINEAR MULTIVARIADA. ASSOCIAÇÕES ENTRE NÍVEIS DE SI E PARÂMETROS HISTOMORFOMÉTRICOS ÓSSEOS

		β (95% CI)	p
Modelo OV/BV r <sup>2</sup> = 0,35 <sup>a</sup>	Sulfato de indoxil	0,7 (-1,0-2,4)	0,4
	PTH intacto	1,1 (0,4-1,7)	0,002
Modelo Ob,S/BS r <sup>2</sup> = 0,34 <sup>b</sup>	Sulfato de indoxil	1,6 (0,1-3,1)	0,04
Modelo Fb,V r <sup>2</sup> = 0,44 <sup>c</sup>	Sulfato de indoxil	0,2 (0,1-3,2)	0,001
	Cálcio ionizado	-0,7 (-1,2- -0,1)	0,01
Modelo BFR/BS r <sup>2</sup> = 0,24 <sup>d</sup>	Sulfato de indoxil	1,8 (-0,2-3,8)	0,07
	PTH intacto	0,5 (-0,03-1,2)	0,06

<sup>a</sup> Variáveis incluídas no modelo: sulfato de indoxil, cálcio ionizado, FGF-23, PTH intacto; <sup>b</sup> Variáveis incluídas no modelo: sulfato de indoxil; FGF-23, 1,25-OH-vitamina D<sub>3</sub>, PTH intacto; <sup>c</sup> Variáveis incluídas no modelo: sulfato de indoxil, idade, cálcio ionizado, PTH intacto; <sup>d</sup> Variáveis incluídas no modelo: sulfato de indoxil, idade, PTH intacto; As abreviações estão listadas junto à Tabela 2.

Em primeiro lugar, foi demonstrado que a uremia está associada a uma redução/dessensibilização do PTH1R, que contribui para a resistência esquelética ao PTH observada na uremia.<sup>27</sup> Importante, é que esta condição não é nem prevenida, nem corrigida pela paratireoidectomia.<sup>28</sup> Foi subsequentemente relatado que outros fatores além do PTH presentes no ultrafiltrado urêmico reduziram a geração de AMPc estimulada por PTH em culturas de células semelhantes a osteoblastos por meio de uma diminuição nos níveis de PTH1R RNAm.<sup>29</sup> Mais especificamente, Nii-Kono e colaboradores demonstraram que o SI reduziu a produção de AMPc induzida por PTH, a expressão do gene PTH1R e viabilidade celular em culturas primárias de osteoblastos.<sup>10</sup> Assim, as toxinas urêmicas e, particularmente, o SI, podem estar diretamente envolvidos no desenvolvimento da resistência óssea ao PTH. Esta última condição pode estimular a síntese de PTH, agravando o hiperparatireoidismo secundário e causando maior taxa de remodelação óssea nos estágios tardios da DRC. De acordo com esta hipótese, os nossos pacientes com DRC em estágio

inicial, que apresentaram níveis discretamente elevados de iPTH, mas com níveis séricos significativamente elevados de SI, tiveram taxa de formação óssea excessivamente baixa. Isto possivelmente reflete uma ação inicial, preponderante inibitória do SI sobre a remodelação óssea antes da grande elevação dos níveis de PTH.

Em segundo lugar, a disponibilidade de calcitriol pode ser afetada pelo SI. Além dos fatores clássicos conhecidos por reduzirem a síntese de calcitriol (isto é, diminuição da massa renal, hiperfosfatemia, elevados níveis de FGF-23 e acidose metabólica), também foi comprovado que o plasma urêmico livre de fosfato inibe diretamente a atividade da 1α-hidroxilase e, conseqüentemente, diminui a disponibilidade de calcitriol.<sup>30</sup> O calcitriol exerce a sua ação biológica por ligação ao receptor nuclear de vitamina D (VDR). Sob condições normais, o calcitriol suprime a secreção de PTH por ligação direta ao VDR na glândula paratireóide. Patel e colaboradores,<sup>31</sup> elegantemente demonstraram que VDR isolados a partir de ratos

com insuficiência renal e, posteriormente, incubados com ultrafiltrado urêmico apresentaram uma redução na capacidade específica de ligação do DNA, que não pode ser explicado pela expressão prejudicada de VDR. Os autores concluíram que as toxinas presentes no ultrafiltrado urêmico interagiram com o VDR para prejudicar a capacidade de ligação do DNA dentro de células e poderia, assim, diminuir a resposta do calcitriol na insuficiência renal. Embora outros estudos identificaram uma função das purinas neste processo,<sup>32,33</sup> é provável que haja outros compostos envolvidos. Ao estudar subfrações de plasma urêmico, Hsu e colaboradores<sup>32</sup> ainda demonstraram que outras substâncias, incluindo o SI, também podem interferir no metabolismo do calcitriol. Além disso, um estudo preliminar mostrou que ratos com insuficiência renal alimentados com uma dieta rica em proteína apresentaram níveis significativamente mais baixos de calcitriol do que animais alimentados com uma dieta normal, na ausência de diferenças entre os grupos na ingestão de fosfato e clearance de creatinina.<sup>32,34</sup> Uma vez que uma maior ingestão proteica resulta em níveis mais altos de SI,<sup>35</sup> esta observação sugere ainda que o SI tem efeito negativo sobre a síntese de calcitriol. Nossa descoberta de uma associação negativa entre 1,25 D e níveis séricos de SI na presente coorte corrobora essa hipótese.

As questões importantes do nosso estudo incluem a primeira avaliação já feita em ambiente clínico de fatores bioquímicos e hormonais relacionados ao metabolismo mineral e à histomorfometria óssea e sua associação com o SI, um protótipo de toxina urêmica ligada à proteína em pacientes assintomáticos, virgens de tratamento, em diferentes estágios de DRC de pacientes em pré-diálise. As limitações deste estudo incluem o pequeno tamanho da amostra. Além disso, devido à relação inversa entre a taxa de filtração glomerular e níveis de SI (conforme ilustrado na Figura 1), não é possível diferenciar se a associação observada entre esta toxina urêmica e parâmetros histomorfométricos não depende da perda da função renal. Na verdade, esse desenho epidemiológico transversal do estudo não permite a análise de relações causa-efeito. Assim, o presente estudo deve ser considerado como gerador de hipóteses, que devem ser testadas em estudos de perfusão em animais, e depois confirmados por estudos clínicos intervencionistas.

## CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstraram que a toxina urêmica SI está positivamente associada à taxa de formação óssea, ao volume osteoide, à superfície de osteoblastos e ao volume de fibrose em uma condição de DRC - possivelmente por aumentar a secreção de PTH (através de um aumento da resistência óssea ao PTH ou através de inibição do calcitriol) - sugerindo que o SI pode desempenhar um papel na patogênese ou ODR na situação de pré-diálise.

## AGRADECIMENTOS

Daniela V. Barreto e Fellype C. Barreto receberam bolsas de pós-doutorado do Conselho Regional Picardy/Universidade Jules Verne de Picardy e bolsas de pós-doutorado do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

## REFERÊNCIAS

1. 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. PMID: 16641930 DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ki.5000414>
2. Malluche H, Faugere MC. Renal bone disease 1990: an unmet challenge for the nephrologist. *Kidney Int* 1990;38:193-211. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.1990.187>
3. Malluche HH, Ritz E, Lange HP, Kutschera L, Hodgson M, Seiffert U, et al. Bone histology in incipient and advanced renal failure. *Kidney Int* 1976;9:355-62. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.1976.42>
4. Coen G, Mazzaferro S, Ballanti P, Sardella D, Chicca S, Manni M, et al. Renal bone disease in 76 patients with varying degrees of predialysis chronic renal failure: a cross-sectional study. *Nephrol Dial Transplant* 1996;11:813-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.ndt.a027404>
5. Cejka D, Herberth J, Branscum AJ, Fardo DW, Monier-Faugere MC, Diarra D, et al. Sclerostin and Dickkopf-1 in renal osteodystrophy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:877-82. DOI: <http://dx.doi.org/10.2215/CJN.06550810>
6. Niwa T, Takeda N, Tatematsu A, Maeda K. Accumulation of indoxyl sulfate, an inhibitor of drug-binding, in uremic serum as demonstrated by internal-surface reversed-phase liquid chromatography. *Clin Chem* 1988;34:2264-7. PMID: 3141084
7. Niwa T, Ise M. Indoxyl sulfate, a circulating uremic toxin, stimulates the progression of glomerular sclerosis. *J Lab Clin Med* 1994;124:96-104. PMID: 8035108
8. Motojima M, Hosokawa A, Yamato H, Muraki T, Yoshioka T. Uraemic toxins induce proximal tubular injury via organic anion transporter 1-mediated uptake. *Br J Pharmacol* 2002;135:555-63. PMID: 11815391 DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0704482>
9. Iwasaki Y, Yamato H, Nii-Kono T, Fujieda A, Uchida M, Hosokawa A, et al. Administration of oral charcoal adsorbent (AST-120) suppresses low-turnover bone progression in uraemic rats. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:2768-74. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfl311>
10. Nii-Kono T, Iwasaki Y, Uchida M, Fujieda A, Hosokawa A, Motojima M, et al. Indoxyl sulfate induces skeletal resistance to parathyroid hormone in cultured osteoblastic cells. *Kidney Int* 2007;71:738-43. PMID: 17264878 DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ki.5002097>

11. Mozar A, Louvet L, Godin C, Mentaverri R, Brazier M, Kamel S, et al. Indoxyl sulphate inhibits osteoclast differentiation and function. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27:2176-81. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfr647>
12. Goto S, Fujii H, Hamada Y, Yoshiya K, Fukagawa M. Association between indoxyl sulfate and skeletal resistance in hemodialysis patients. *Ther Apher Dial* 2010;14:417-23. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-9987.2010.00813.x>
13. Tomiyama C, Carvalho AB, Higa A, Jorgetti V, Draibe SA, Canziani ME. Coronary calcification is associated with lower bone formation rate in CKD patients not yet in dialysis treatment. *J Bone Miner Res* 2010;25:499-504. PMID: 19594321 DOI: <http://dx.doi.org/10.1359/jbmr.090735>
14. Meert N, Eloit S, Waterloos MA, Van Landschoot M, Dhondt A, Glorieux G, et al. Effective removal of protein-bound uraemic solutes by different convective strategies: a prospective trial. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:562-70. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfn522>
15. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3<sup>rd</sup>, Feldman HI, et al.; CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604-12. PMID: 19414839
16. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 1987;2:595-610. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.5650020617>
17. Dos Reis LM, Batalha JR, Muñoz DR, Borelli A, Correa PH, Carvalho AB, et al. Brazilian normal static bone histomorphometry: effects of age, sex, and race. *J Bone Miner Metab* 2007;25:400-6. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00774-007-0778-4>
18. Melsen F, Mosekilde L. Tetracycline double-labeling of iliac trabecular bone in 41 normal adults. *Calcif Tissue Res* 1978;26:99-102. PMID: 737565 DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02013242>
19. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002;39:S1-266.
20. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2003;42:S1-201. PMID: 14520607
21. Iwasaki-Ishizuka Y, Yamato H, Nii-Kono T, Kurokawa K, Fukagawa M. Downregulation of parathyroid hormone receptor gene expression and osteoblastic dysfunction associated with skeletal resistance to parathyroid hormone in a rat model of renal failure with low turnover bone. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:1904-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfh876>
22. Llach F, Bover J. Renal osteodystrophies. In: Brenner BM, ed. *The Kidney*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders; 2000. p.2103-86.
23. Lund RJ, Davies MR, Brown AJ, Hruska KA. Successful treatment of an adynamic bone disorder with bone morphogenetic protein-7 in a renal ablation model. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:359-69. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/01.ASN.0000109671.99498.08>
24. Hernandez D, Concepcion MT, Lorenzo V, Martinez ME, Rodriguez A, De Bonis E, et al. Adynamic bone disease with negative aluminium staining in predialysis patients: prevalence and evolution after maintenance dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 1994;9:517-23.
25. Carvalho AB, Lobao RR, Cuppari L, Draibe SA, Ajzen H. Does hypophosphataemia induce hypoparathyroidism in pre-dialysis patients? *Nephrol Dial Transplant* 1998;3:12-4.
26. Gal-Moscovici A, Sprague SM. Role of bone biopsy in stages 3 to 4 chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:S170-4. DOI: <http://dx.doi.org/10.2215/CJN.01100307>
27. Ureña P, Kubrusly M, Mannstadt M, Hrubby M, Trinh MM, Silve C, et al. The renal PTH/PTHrP receptor is down-regulated in rats with chronic renal failure. *Kidney Int* 1994;45:605-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.1994.79>
28. Ureña P, Mannstadt M, Hrubby M, Ferreira A, Schmitt F, Silve C, et al. Parathyroidectomy does not prevent the renal PTH/PTHrP receptor down-regulation in uremic rats. *Kidney Int* 1995;47:1797-805. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.1995.248>
29. Disthabanchong S, Hassan H, McConkey CL, Martin KJ, Gonzalez EA. Regulation of PTH1 receptor expression by uremic ultrafiltrate in UMR 106-01 osteoblast-like cells. *Kidney Int* 2004;65:897-903. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00472.x>
30. Hsu CH, Patel S. Uremic plasma contains factors inhibiting 1 alpha-hydroxylase activity. *J Am Soc Nephrol* 1992;3:947-52.
31. Patel SR, Ke HQ, Vanholder R, Koenig RJ, Hsu CH. Inhibition of calcitriol receptor binding to vitamin D response elements by uremic toxins. *J Clin Invest* 1995;96:50-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI118061>
32. Hsu CH, Vanholder R, Patel S, De Smet RR, Sandra P, Ringoir SM. Subfractions in uremic plasma ultrafiltrate inhibit calcitriol metabolism. *Kidney Int* 1991;40:868-73. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.1991.287>
33. Hsu CH, Patel SR, Young EW, Vanholder R. Effects of purine derivatives on calcitriol metabolism in rats. *Am J Physiol* 1991;260:F596-601. PMID: 1849367
34. Hsu CH, Patel S. Factors influencing calcitriol metabolism in renal failure. *Kidney Int* 1990;37:44-50. PMID: 2299808 DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.1990.6>
35. Marzocco S, Dal Piaz F, Di Micco L, Torraca S, Sirico ML, Tartaglia D, et al. Very low protein diet reduces indoxyl sulfate levels in chronic kidney disease. *Blood Purif* 2013;35:196-201. DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000346628>