

Pedro H.S. Corrêa
Vanda Jorgetti
Maria Odette R. Leite
Edson L. Arioli
João R. Batalha
Aurêlio Borelli

Serviço de Endocrinologia, Unidade de Doenças Ósteo Metabólicas e Laboratório de Investigação Médica – 25 (LIM /25) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Recebido em 14/09/1999
Revisado em 21/02/2000
Aceito em 03/03/2000

RESUMO

A osteomalacia é uma doença ósteo-metabólica em que há deficiente mineralização do osso, e é definida pela histomorfometria óssea por apresentar espessura do rebordo osteóide (O.Th) maior do que 15µm, e intervalo de tempo para mineralização (MLT) maior do que 100 dias. As principais etiologias de osteomalacia são a deficiência de ação da vitamina D e a hipofosfatemia. Neste trabalho, 14 pacientes com osteomalacia diagnosticados clínica e laboratorialmente foram divididos em dois grupos: 6 pacientes com deficiente ação de vitamina D e 8 hipofosfatêmicos. Todos os pacientes apresentaram ao exame histomorfométrico aumento do O.Th e do MLT compatível com o diagnóstico de osteomalacia. A superfície de reabsorção óssea estava aumentada no grupo com deficiência de ação da vitamina D. Em seis pacientes hipofosfatêmicos, a superfície de reabsorção óssea estava ausente, em um paciente dentro da normalidade mas em um paciente encontrava se aumentada. Conclusão: a histomorfometria dinâmica óssea através da análise dos parâmetros de formação confirmam o diagnóstico de osteomalacia, enquanto que os parâmetros de reabsorção permitem uma orientação etiológica. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2000;44/2: 148-52**)

Unitermos: Osteomalacia; Deficiência de vitamina D; Hipofosfatemias; Remodelação óssea; Doença ósteo-metabólica.

ABSTRACT

Osteomalacia is a metabolic bone disease with a deficient bone mineralization characterized histomorphometrically by an osteoid thickness (O.Th) greater than 15µm and a mineralization lag time (MLT) longer than 100 days. The main etiologies are deficient activity of vitamin D and primary hypophosphatemia. In this study we presented 14 patients with osteomalacia diagnosed clinically and through laboratory findings and divided into 2 groups: vitamin D deficient (n=6) and primary hypophosphatemia (n=8). MLT and O.Th were increased in all patients. Bone erosion surfaces were increased in the vitamin D deficient group. In the hypophosphatemic patients, the erosion surfaces were not found in 6 patients, increased in one and normal in one. It is concluded that the diagnosis of osteomalacia can be defined through the measurement of the histomorphometric parameters of bone formation while bone reabsorption parameters can suggest a possible etiology. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2000;44/2: 148-52**)

Keywords: Osteomalacia; Vitamin D deficiency; Hypophosphatemia; Bone remodeling; Metabolic bone disease.

A HISTOMORFOMETRIA ÓSSEA QUANTIFICA o processo de formação e reabsorção óssea, permitindo caracterizar as doenças ósteo-metabólicas (DOM) em bases morfológicas. Baseado nos estudos de

Parfitt e col. (1,2), o diagnóstico histomorfométrico da osteomalacia estabelece que a espessura do rebordo osteóide (O.Th) deve ser maior que 15µm e o intervalo de tempo para a mineralização (MLT) superior a 100 dias.

As duas principais etiologias de osteomalacia são a deficiência de ação da vitamina D e a hipofosfatemia (2,3). Na deficiência de ação da vitamina D há diminuição da concentração sérica de cálcio e conseqüente hiperparatireodismo secundário. O diagnóstico diferencial entre estas duas etiologias é feito através da demonstração da concentração sérica elevada do hormônio da paratireóide (PTH) na osteomalacia por deficiência de ação da vitamina D (2).

Para o estudo das DOM pela histomorfometria, o osso a ser analisado não é descalcificado devido à necessidade de visualizar o rebordo osteóide e a marcação com tetraciclina (4). A histomorfometria dinâmica óssea, inicialmente restrita a alguns centros da Europa e Estados Unidos, foi introduzido no Brasil pelo grupo de DOM do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) (5). Este trabalho visa a apresentar a análise histomorfométrica dinâmica das duas principais causas de osteomalacia: a hipofosfatêmica e a por deficiência de ação da vitamina D nos pacientes do grupo de DOM do HC-FMUSP.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

A biópsia foi realizada em 14 pacientes (9 mulheres e 5 homens) em acompanhamento no Ambulatório de DOM do HC-FMUSP. O diagnóstico de osteomalacia por deficiência de ação da vitamina D foi definido pela presença de cálcio sérico normal e atividade de paratireóide aumentada (aumento da concentração sérica do hormônio da paratireóide ou da excreção urinária do AMP cíclico). A osteomalacia por deficiência de fósforo foi diagnosticada pela diminuição do limiar renal da excreção de fósforo (TmP/GFR) (6) associada a dados laboratoriais de normalidade da função paratireoideana (tabela 1). As biópsias ósseas foram realizadas na região ântero-superior da crista ilíaca, utilizando-se a trefina de Bordier de 8mm de diâmetro, após anestesia local (7). Antes da biópsia, o procedimento foi explicado ao paciente tendo-se obtido o consentimento formal. Todos os pacientes receberam marcação prévia pela tetraciclina que obedeceu ao seguinte esquema: tetraciclina na dose de 15mg/kg por via oral nos dias 1º e 2º, 12 dias sem medicação, voltando a recebê-la no dia 15º e 16º. As biópsias foram obtidas entre o 18º e 23º dias.

Os fragmentos ósseos foram fixados em álcool a 70% e infiltrados com metilmetacrilato sem descalcificação (4). Seis cortes não consecutivos de 5µm foram

Tabela 1 - Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com osteomalacia.

Casos	Idade anos	Sexo	Diagnóstico	Ca mg/dL	P mg/dL	TmP/GFR mg/dL	FA U/L	CaU24h mg/24H	OHP mg/mg Cr	AMPc nmol/mgCr	PTH pg/mL
D1	14	F	VIT D	8,8	4,1	3,4	322	4,5		9,0	
D2	15	F	VIT D	10,2	1,6	1,8	64	43	0,105	7,9	0,30(0,27)
D3	17	F	VIT D	8,6	2,5	2,3	634	2,9		12,5	
D4	53	F	VIT D	8,9	2,2	1,9	119	206	0,109		357(72)
D5	20	M	VIT D	9,0	2,1	2,4	575	41	0,256	11,1	
D6	46	M	VIT D	8,9	1,1	1,4	122	44	0,038	6,9	75,9 (72)
M	25			9,1	2,6	2,4	284	64,1	0,107	9,8	-
DP	19			0,7	1,1	0,7	257	96,4	0,003	2,4	-
P1	15	F	P	7,9	2,7	2,1	177	90	0,047	3,0	40 (76)
P2	35	F	P	9,0	1,2	0,9	382	51	0,042		0,08 (0,27)
P3	42	F	P	9,0	1,7	0,9	35	47	0,026		51 (54)
P4	48	F	P	8,8	1,5	1,0	82	35	0,018	3,4	26 (72)
P5	50	F	P	8,9	2,5	2,1	91	23	0,077	3,4	0,11(0,27)
P6	15	M	P	9,0	1,3	0,9	250	9,7	0,023		72 (76)
P7	23	M	P	9,8	1,6	1,1	65	73	0,039	2,5	
P8	43	M	P	8,7	1,2	1,2	255	64	0,085	1,6	28 (76)
M	37			9,0	1,6	1,2*	129	42	0,045*	2,7*	-
DP	14			0,4	0,5	0,5	97	24,2	0,029	0,9	-
VR				8,5 -10,5	2,5-4,5	2,5-4,2	5-45	<250	<0,019	<4,0	

VIT D = Deficiência de ação da vitamina D; P = Hipofosfatêmico; OHP = Hidroxiprolina

PTH = Paratormônio (o limite superior do valor de referência está entre parênteses)

TmP/GRF = Limiar renal de excreção de fósforo; Ca U 24 H = Excreção de cálcio de 24 horas

V R = valor de referência; *p<0,05 (P<VIT D)

obtidos com o micrótomo de Jung K e corados com Solocromo, Goldner e Azul de Toluidina (4,8). A fluorescência da tetraciclina ao estímulo pela luz ultravioleta permitiu a análise das marcações em quatro cortes de 10µm não corados.

A análise histomorfométrica foi feita com a ajuda de oculares especiais. As medidas de volume e superfície com a ocular Zeiss tipo II, as medidas de espessura e distância com o micrômetro calibrado com ajuda da escala de Vernier.

Os parâmetros estudados foram divididos em estáticos e dinâmicos, seguindo a nomenclatura padronizada pela *American Society for Bone and Mineral Research* (9). Os termos utilizados na designação dos parâmetros foram adaptados para o português, preservando-se as abreviaturas estabelecidas por aquela sociedade. Consideramos como valores de referência para os parâmetros estáticos os determinados por Reis (10). Os valores dinâmicos normais foram os mesmos utilizados por Melsen et al. (11).

Os seguintes parâmetros estáticos foram medidos: volume trabecular - BV/TV (%) é o volume ocupado pelo osso trabecular, mineralizado ou não, expresso como porcentagem do volume ocupado pela medula e trabéculas; volume osteóide - OV/BV (%) é o volume ocupado pelo osso não mineralizado, expresso como porcentagem do volume ocupado pelo osso trabecular (mineralizado ou não mineralizado); super-

fície osteóide - OS/BS (%) é a porcentagem da superfície trabecular que está recoberta pela matriz em relação à superfície trabecular total; espessura osteóide - O.Th (µm) é a espessura do rebordo da matriz depositada nas trabéculas ósseas medida em milimicra; superfície de reabsorção - ES/BS (%) é a porcentagem da superfície trabecular que apresenta lacunas de reabsorção com a presença ou não de osteoclasto; fibrose - Fb (%) que corresponde a porcentagem de fibrose em relação ao volume da medula óssea.

Os parâmetros dinâmicos são os seguintes: superfície mineralizante MS/BS (%) corresponde à porcentagem da superfície trabecular que apresenta as duplas marcações com tetraciclina; taxa de aposição mineral - MAR (µm/dia) é a distancia média de 4 medidas entre as 2 marcações com tetraciclina, dividida pelo intervalo de tempo entre a administração das duas doses de tetraciclina, expressa em µm por dia.

A partir dessas relações foram calculados os seguintes parâmetros derivados: taxa de formação óssea - BFR/BS (µm²/µm³/d) é a que corresponde ao volume do novo osso mineralizado por superfície trabecular total por unidade de tempo, e calculado através da relação: (MAR) x (MS/BS); a taxa de aposição óssea ajustada - Aj.AR, (µm/d) que corresponde ao volume do novo osso mineralizado formado na unidade de superfície osteóide por unidade de tempo e é calculado pela relação (BFR/BS)/(OS/BS). O intervalo de

Tabela 2 - Alterações histomorfométricas dos pacientes com osteomalacia.

Casos	Diagnóstico	BV/TV %	OV/BV %	O th mm	OS/BS %	ES/BS %	Fb %	MS/BS %	MAR µm/d	BFR/BS µm ³ /µm ² /d	Aj. AR µm/d	MLT d
D1	VIT D	41,5	21,3	34,7	72,5	15,6	4,6	8	1,51	0,12	0,16	216
D2	VIT D	35,0	62,3	60,8	84,8	3,8	8,2	nm	nm	nc	nc	nc
D3	VIT D	23,5	49,5	41,1	83,9	4,4	3,2	nm	nm	nc	nc	nc
D4	VIT D	12,7	17,5	29,7	65,1	6,6	0,2	nm	nm	nc	nc	nc
D5	VIT D	29,2	29,2	42,6	69,6	18,0	6,2	nm	nm	nc	nc	nc
D6	VIT D	23,8	47,5	51,5	84,3	4,2	0	nm	nm	nc	nc	nc
M		27,6	37,9	43,4	76,7	8,8	3,7					
DP		10	17,8	11,3	8,7	6,3	3,3					
P1	P	14,7	58,1	46,0	98,6	0,9	0	nm	nm	nc	nc	nc
P2	P	23,3	43,3	35,1	78,6	0	0	nm	nm	nc	nc	nc
P3	P	34,3	51,1	51,2	91,3	0	0	nm	nm	nc	nc	nc
P4	P	24,2	32,5	41,1	83,5	0	0	nm	nm	nc	nc	nc
P5	P	20,4	46,8	51,0	76,6	6,0	0	nm	nm	nc	nc	nc
P6	P	41,5	46,0	55,7	89,2	0	0	nm	nm	nc	nc	nc
P7	P	47,2	61,0	69,5	98,3	0	0	2,5	nm	nc	nc	nc
P8	P	48,3	83,0	77,6	98,0	0	0	nm	nm	nc	nc	nc
M		31,7	52,7	53,4	89,3	0,9*						
DP		12,9	15,1	14,2	8,9	2,1						
V R		24,8±7,1	2,1±2,1	11,3±3,4	12,0±10,2	2,2±1,9	0	13±6,3	0,65±0,12	0,09±0,05	0,5±0,2	23,7±2,5

VIT D = Deficiência de ação da vitamina D; P = Hipofosfatêmico

nm = não mensurável; nc = não calculado

V R = valor de referência; *p<0,05 (PxVIT D)

O significado dos índices histomorfométricos está no texto.

tempo para a mineralização-MLT (d) que corresponde ao tempo médio entre aposição do rebordo osteóide e a sua mineralização e é calculado pela relação: (O.Th) / (Aj. AR).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos resultados foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Fixou-se em 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade.

RESULTADOS

Os pacientes do grupo com deficiência de ação da vitamina D apresentaram aumento significativo da excreção urinária de AMPc e da hidroxiprolina em relação ao grupo hipofosfatêmico (tabela 1). O limiar renal de excreção de fósforo era significativamente menor no grupo hipofosfatêmico. As dosagens de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina e excreção urinária de cálcio não foram diferentes entre os dois grupos.

Na tabela 2 são apresentados os parâmetros estáticos e dinâmicos dos pacientes. Devem ser salientados os altos valores relacionados ao tecido osteóide, OV/BV, O.Th e OS/BS. Entretanto, não havia diferença estatística entre os dois grupos como se pode observar na tabela 2 e gráfico 1. Somente foi observada a presença de fibrose nos pacientes com deficiência de ação de vitamina D. A superfície de reabsorção do grupo de deficiência de vitamina D era maior que o

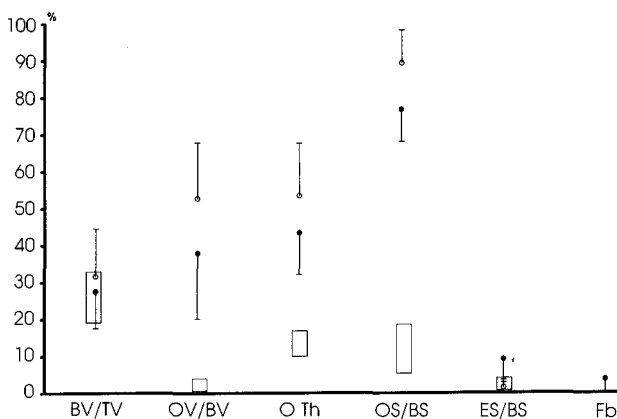


Gráfico 1 - Índices histomorfométricos dos pacientes com osteomalacia apresentados como média e desvio padrão.

○ Hipofosfatêmico; ● Deficiência de ação da vitamina D
BV/TV - volume trabecular; OV/BV - volume osteóide;
O.Th - espessura osteóide; ES/BS - superfície osteóide; Fb - fibrose;

Retângulo - valores de referência

* p < 0,05

hipofosfatêmico. Havia, entretanto, o caso P5 que apresenta superfície de reabsorção acima dos valores de referência. Em 13 dos 14 pacientes a marcação deficiente pela tetraciclina impediu o cálculo da MAR e, em consequência, de todos os índices dinâmicos.

DISCUSSÃO

A análise histomorfométrica da biópsia óssea demonstrou em todos os pacientes que a espessura osteóide era maior que 15µm e o MLT superior a 100 dias, caracterizando osteomalacia. A não marcação com tetraciclina é interpretada como MLT tendendo para o infinito.

O osteóide estava também aumentado em volume e superfície. Os parâmetros estáticos de formação óssea (OV/BV, OS/BS e O.Th) nos pacientes com hipofosfatemia não eram diferentes dos pacientes com deficiência da ação da vitamina D. A superfície osteóide encontrava-se aumentada em todos os pacientes, sendo que quatro pacientes com hipofosfatemia crônica apresentavam mais de 90% da superfície trabecular recoberta por osteóide. O volume osteóide era maior que 10% em todos os pacientes indicando que a osteomalacia é generalizada (2).

Na avaliação dinâmica da formação óssea, o paciente D1 com deficiência de ação da vitamina D apresentou as duas marcações com tetraciclina indicando um defeito de mineralização parcial. Os outros pacientes desse mesmo grupo não mostraram qualquer marcação pela tetraciclina, caracterizando um defeito da mineralização muito acentuado.

Nenhum paciente do grupo hipofosfatêmico apresentou marcação pela tetraciclina, revelando deficiência acentuada na mineralização óssea, bem como remodelação óssea muito reduzida, o que também foi observado por outros autores (12).

A superfície de reabsorção foi maior no grupo com deficiência de ação da vitamina D quando comparados aos pacientes com hipofosfatemia. O hiperparatireodismo secundário é a causa de reabsorção, bem como da fibrose peritrabecular observada nestes pacientes. Na interpretação desse parâmetro em pacientes com osteomalacia devemos considerar que a ES/BS reflete a porcentagem de reabsorção de toda a superfície trabecular. Os osteoclastos, para iniciar a reabsorção, devem aderir à superfície óssea calcificada, pois dificilmente conseguem aderir à superfície recoberta por osteóide. Portanto a superfície disponível para que essas células iniciem sua atividade é a superfície trabecular total menos a osteóide. Dos seis pacientes com deficiência de ação da vitamina D, três

apresentavam aumento da superfície de reabsorção em valores absolutos e, em 3, esses valores eram normais. Nesses últimos, a ES/BS encontrava-se dentro da normalidade pois a superfície osteóide estava muito aumentada e, conseqüentemente, havia menor superfície disponível para a reabsorção. Entretanto, a reabsorção analisada como sendo porcentagem da superfície disponível encontrava-se aumentada.

Quanto aos pacientes com hipofosfatemia, a superfície reabsorvida estava ausente em seis dos oito pacientes. Em um deles, P5, a superfície reabsorvida encontrava-se aumentada em valor absoluto. Neste paciente foram excluídas as possibilidades de osteomalacia oncogênica. A hipótese mais provável para esse aumento de reabsorção foi a hipofosfatemia (13). Na paciente P1 a superfície reabsorvida era de 0,9%, entretanto, a superfície disponível para a reabsorção era de 1,4% (100-98,6). Esta paciente, por ocasião da biópsia, encontrava-se no período da puberdade (15 anos) e, conseqüentemente, a remodelação estava aumentada, o que é evidenciado por aumento da formação e reabsorção óssea.

A biópsia transilíaca é um método seguro e que pode ser realizado em nível ambulatorial. A experiência do HC em mais de 2000 biópsias é semelhante a referida por Duncan, que encontrou 0.52% de complicações (hematoma e infecção de pele) (14). Por se tratar de método invasivo deve ser utilizado quando as dosagens bioquímicas ou exames radiológicos não forem diagnósticos, estando indicada nos quadros iniciais ou para acompanhamento da terapêutica.

A presença de MLT superior a 100 dias não associada a espessura de rebordo osteóide aumentado (O.Th menor que 15µm) não permite o diagnóstico de osteomalacia, tratando-se de uma provável função deficiente do osteoblasto que não produz matriz em velocidade normal (deficiente mineralização).

Em conclusão, o estudo da histomorfometria óssea pode definir a osteomalacia através dos parâmetros de formação óssea. A avaliação dos parâmetros de reabsorção orientam para a sua causa etiológica.

REFERÊNCIAS

1. Rao DS, Villanueva A, Mathews M. Histological evolution of vitamin D - depletion in patients with intestinal mal-

absorption or dietary deficiency. In: Frame B, Potts JT, eds. **Clinical Disorders of Bone and Mineral Metabolism**. Amsterdam: Excerpta Medica, 1983:224-6.

2. Parfitt AM. Osteomalacia. In: Avioli LV, Krane SM, eds. **Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders**, 3th ed. San Diego: Academic Press, 1998:327-86.
3. Mundy G. Osteomalacia and Rickets. In: Mundy G, ed. **Bone Remodeling and Its Disorders**, 2nd ed. London: Martin Dunitz, 1999:200-7.
4. Baron R, Vignery A, Neff L, Silverglate A, Santa Maria A. Processing uncalcified bone specimens for bone. In: Recker RR, ed. **Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation**. Florida: CRC Press, 1983:13-35.
5. Corrêa PHS. Contribuição da Histomorfometria Óssea para o Estudo de Doenças Ósseas Metabólicas. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina USP, 1984.
6. Blijvoet OL. Kidney function in calcium and phosphate metabolism. In: Avioli LV, Krane SM, eds. **Metabolic Bone Disease**. New York, Academic Press, 1977:50-140.
7. Sacker LSL, Nordin BEC. A simple bone biopsy needle. **Lancet** 1954;1:347-50.
8. Villanueva AR, Kujawa M, Mathews CHE, Parfitt AM. Identification of the mineralization front: comparisons of modified toluidine blue stain with tetracycline fluorescence. **Metab Bone Dis Rel Res** 1983;5:41-5.
9. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH. Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols and units. **J Bone Mineral Res** 1987;2:595-610.
10. Reis LM. Análise Histomorfométrica de Biópsias Ósseas de Crista Ilíaca em Uma Amostra da População Normal Brasileira. Dissertação de Mestrado Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) USP, 1998.
11. Melsen F, Moselkilde L. Tetracycline double-labelling of iliac trabecular bone in 41 normal adults. **Calcif Tiss Res** 1978;26:99-102.
12. Fraser B, Arnstein AR, Frost HM, Smith WR. Resistant osteomalacia. **Am J Med** 1965;38:134.
13. Siris ES, Clemens TL, Demster DW, Shane E, Segre GV. Tumor induced osteomalacia. **Am J Med** 1987;82:307-12.
14. Duncan H, Rao DS, Parfitt AM. Complications of bone biopsy. **Metab Bone Dis Relat Res** 1980;2:475-81.

Endereço para correspondência:

Pedro Henrique S. Corrêa
Av. Dr. Arnaldo 455, 4^a andar - Sala 4305 - LIM 25
01246-903 São Paulo, SP